

**Т. С. Тодосійчук¹, Л. М. Шинкаренко¹,
В. О. Федоренко², Л. І. Басілія²**

¹Націонал. техн. ун-т України "КПІ", Київ;

²Львів. держ. ун-т

ОДЕРЖАННЯ МУТАНТІВ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* ЗІ ЗМІНЕНОЮ БАКТЕРІОЛІТИЧНОЮ АКТИВНІСТЮ

Показана принципова можливість одержання продуцентів літичного ферментного комплексу широкого спектра дії *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* зі зміненою біосинтетичною здатністю.

Вивчена спонтанна та індукована мутагеном (*N*-метил-*N*-нітрозосечовиною) мінливість 5 варіантів штаму за здатністю лізувати клітини *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus delbrueckii*.

Відібрано найбільш активні варіанти, що перевищують активність вихідного штаму в 2–2,5 рази, для подальшої селекційно-генетичної роботи та можливого практичного застосування.

Ключові слова: бактеріолітична активність, штам, клон, мутагенез, тест-культура

Культура *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* синтезує літичний ферментний комплекс широкого спектра дії по відношенню до грампозитивних та грамнегативних бактерій, у тому числі патогенних. Направлена селекція продуцента з використанням заданих тест-культур дає змогу вплинути на спектр літичної активності штаму.

Наявність у ферментному комплексі специфічних протеїназ і пептидаз, *N*-ацетил-глюкозамідазної та *N*-ацетил-мурамідазної активностей [1, 3, 6, 7, 9] допускає зміну співвідношення окремих ферментів у комплексі, підсилення активності деяких з них, загальне підвищення сумарної бактеріолітичної активності і часткову зміну спрямованості дії комплексу.

Дослідження останніх років показують принципову можливість застосування мутагенної обробки (фізичними методами, хімічними реагентами) для одержання штамів мікроорганізмів з новими властивостями або зі зміненими первісними характеристиками [2, 4, 5, 8].

Метою даної роботи було вивчення спонтанної та індукованої мутагеном *N*-метил-*N*-нітрозосечовиною мінливості 5 варіантів *S. recifensis* var. *lyticus* за ознакою бактеріолітичної активності і одержання штамів із підвищеною цільовою активністю. Проведені дослідження є етапом генетико-селекційної роботи з продуцентом літичного ферментного комплексу *S. recifensis* var. *lyticus* (колекційний номер ВКПМ-ДНПІ-6681).

Матеріали і методи Об'єктом дослідження служили 5 варіантів культури *S. recifensis* var. *lyticus*: S4, M4, Л6, Л7, К70. Варіант S4 відібрали при вирощуванні на сольовому середовищі, де єдиним джерелом органічного живлення були клітини *Staphylococcus aureus* 209; Л6, Л7, М4 — на середовищі, де за єдине джерело органічного живлення правили клітини *Lactobacillus delbrueckii* var. *bulgaricus*. Варіант К70 не проходив додаткового відбору.

Для вивчення спонтанних варіантів за ознакою бактеріолітичної активності окремі клони цих культур (114–120 клонів) пересівали уколом на сольове середовище такого складу (%): NaCl — 0,6; K₂HPO₄ — 0,05; FeSO₄, CaCl₂, MgCl₂, CuSO₄ — по 0,001; агар — 2,5 (Bacto Agar, "Ferak").

Як єдине джерело органічного живлення в середовище вносили прогріту до 90 °С протягом 10 хв суспензію клітин *S. aureus* 209, вирощену на МПА, або суспензію клітин *L. delbrueckii* var. *bulgaricus*, вирощених на середовищі MRS та ліофільно висушених. Концентрація внесених тест-культур становила $9 \cdot 10^9$ клітин на 1 мл середовища, що відповідає додаванню до 900 мл середовища 100 мл суспензії відмитих клітин з оптичною густиною 0,4 опт. од. (при 540 нм).

Культури вирощували в термостаті при 28 °С впродовж 7 діб. Бактеріолітичну активність кожного клону оцінювали за здатністю лізувати тест-культуру, що вносили в середовище, і характеризували індексом літичної активності (ІЛА), який одержували діленням значення діаметра зони лізису навколо колонії на значення діаметра самої колонії.

Після цього відібрали клони з підвищеною бактеріолітичною активністю і пересівали їх на середовище Чапека такого складу (г/л): глюкоза — 20,0;

Таблиця 1. Динаміка мінливості спонтанних варіантів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* за здатністю до лізису *S. aureus* 209

Варіант	Час вирощування, доби	Кількість перевічених клонів	Індекс літичної активності, ІЛА _{ср.}	Стандартне відхилення, δ	Коефіцієнт варіації ІЛА, %	Стандартна похибка, %
S4	3	120	1,8	0,5	25,0	0,1
	4	120	2,2	0,5	21,0	0,1
	5	120	2,6	0,5	18,0	0,1
	7	120	3,2	0,6	20,0	0,1
M4	3	119	1,5	0,4	24,0	0,1
	4	119	1,9	0,4	23,0	0,1
	5	119	2,2	0,5	24,0	0,1
	7	119	2,7	0,5	17,0	0,1
Л6	3	120	1,5	0,2	16,0	0,1
	4	120	1,8	0,3	16,5	0,1
	5	120	1,9	0,3	15,5	0,1
	7	120	2,1	0,4	20,0	0,1
Л7	3	120	1,5	0,2	14,5	0,1
	4	120	1,8	0,3	17,0	0,1
	5	120	1,9	0,3	16,0	0,1
	7	120	2,3	0,2	10,5	0,1
К70	3	80	1,5	0,2	13,0	0,1
	4	80	1,5	0,3	17,5	0,1
	5	80	1,8	0,3	15,5	0,1
	7	80	2,0	0,2	11,5	0,1

$K_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ — 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,5; NaCl — 0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,1; $CaCO_3$ — 3,0; агар — 20,0; м'ясна вода — 150 мл.

П'ятидобові культури піддавали дії мутагену — N-метил-N-нітрозосечовини (МНС) в дозі 30 мкг/мл на протязі 2 год.

Мутагенну обробку спор окремих варіантів культури *S.recifensis* var. *lyticus* здійснювали за такою методикою: по 1 мл спорової суспензії варіантів у дистильованій воді переносили в центрифужні пробірки "Eppendorf" і центрифугували для осадження спор протягом 10 хв при 12 тис. об/хв. Спори ресуспендували в 1 мл 0,05 М фосфатного буфера (рН 6,0) з МНС (30 мкг/мл). В контрольну пробірку додавали фосфатний буфер.

Інкубацію культури з МНС і контрольних проб проводили в термоміксері "Eppendorf" впродовж 2 год.

Для припинення дії мутагену спори осаджували центрифугуванням при 12 тис. об/хв на протязі 10 хв. Відмивали від мутагену спори в 0,05 М фосфатному буфері (рН 7,0) і знову центрифугували в тих же умовах. Відмивання проводили двічі.

Спори висівали на середовище Чапека та інкубували в термостаті при 28 °С 5 діб. Після цього підраховували число колоній в контрольних і дослідних чашках, визначали титр і відсоток виживання спор кожного варіанта. Визначення бактеріолітичної активності клонів, одержаних після мутагенної обробки, проводили в такий же спосіб, як і спонтанних варіантів *S. recifensis* var. *lyticus*.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою програми Statgrafic SG 26.

Таблиця 2. Динаміка мінливості спонтанних варіантів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* за здатністю до лізису *L. delbrueckii*

Варіант	Час вирощування, доби	Кількість перевірених клонів	Індекс літичної активності, ІЛА _{сер.}	Стандартне відхилення, δ	Коефіцієнт варіації ІЛА, %	Стандартна похибка, %
S4	3	115	0,4	1,0	273,0	0,1
	4	115	0,7	1,5	191,0	0,1
	5	115	1,5	2,0	118,0	0,2
	7	115	2,0	2,0	102,0	0,2
M4	3	115	2,2	1,0	38,0	0,1
	4	115	3,1	0,5	22,0	0,1
	5	115	3,6	0,5	18,0	0,1
	7	115	4,2	0,5	14,0	0,1
Л6	3	119	2,5	1,0	29,0	0,1
	4	119	3,4	0,5	15,0	0,1
	5	119	3,8	0,5	13,5	0,1
	7	119	4,0	0,5	13,0	0,1
Л7	3	118	2,0	0,5	29,0	0,1
	4	118	3,1	0,5	16,0	0,1
	5	118	3,7	0,5	14,0	0,1
	7	118	4,1	0,5	10,0	0,1
K70	3	80	1,5	1,0	57,5	0,1
	4	80	2,7	1,0	32,0	0,1
	5	80	3,3	1,0	23,0	0,1
	7	80	3,6	1,0	20,0	0,1

Результати та їх обговорення. На першому етапі роботи вивчали мінливість спонтанних клонів у досліджуваних варіантів за здатністю лізувати *S. aureus* 209 як єдине джерело органічного живлення (табл. 1).

Спостерігали збільшення середнього значення ІЛА окремих клонів всіх досліджених варіантів з 3-ї до 7-ї доби росту, але вони відрізнялися за часом прояву бактеріолітичної активності. Очевидно, у деяких варіантів цільова активність є індуцибельною і її прояв пов'язаний із впливом тест-культури, що вноситься у середовище.

На 7-у добу росту найвищими виявилися показники ІЛА у варіантів S4(3,2) та M4(2,7). На кожному етапі визначення здатності до лізису клітин стафілокока середнє значення ІЛА окремих клонів варіанта S4 було вищим, ніж цей показник клонів інших варіантів. Ця різниця найбільш значна між варіантами S4 та K70, який раніше не підлягав селекції на середовищі з додаванням клітин індуктора. Це підтверджує припущення про доцільність підтримуючої селекції даного продуцента за допомогою періодичних пасажів на мінеральному середовищі з додаванням клітин мікроорганізмів, що поєднують у собі роль лімітуючого живильного фактора та індукуючого агента.

Суттєві зміни в мінливості окремих клонів варіантів у динаміці їх росту

Таблиця 3. Динаміка мінливості варіантів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*, оброблених мутагеном МНС

Варіант	Час вирощування, доби	Кількість перевічених клонів	Вживання, %	Індекс літичної активності, ІЛА _{сеп.}	Стандартне відхилення, δ	Коефіцієнт варіації ІЛА, %	Стандартна похибка, %
Тест-культура <i>L. delbrueckii</i>							
Л6-1	3	103	0,4	1,0	2,0	130,0	0,1
	4	103		1,9	2,0	92,0	0,2
	5	103		2,5	2,0	68,0	0,2
	7	103		3,3	2,0	55,0	0,2
S4-2	3	101	13,0	1,4	1,5	106,0	0,1
	4	101		2,4	2,0	81,0	0,2
	5	101		3,0	2,0	61,0	0,2
	7	101		4,0	2,0	50,0	0,2
S4-1	3	104	2,5	0,7	1,0	148,0	0,1
	4	104		1,5	1,5	94,0	0,1
	5	104		2,2	1,5	66,0	0,1
	7	104		3,8	1,0	27,5	0,1
M4-1	3	105	2,2	0,5	1,0	268,0	0,1
	4	105		0,7	1,5	209,0	0,1
	5	105		1,2	2,0	143,0	0,2
	7	105		2,5	2,0	82,0	0,2
Тест-культура <i>S. aureus</i>							
S4-2	3	85	0,2	1,3	0,2	14,0	0,1
	4	85		1,8	0,3	16,0	0,1
	5	85		2,5	0,3	11,5	0,1
	7	85		3,6	0,4	10,0	0,1
Л6-2	3	83	0,1	1,3	0,2	11,5	0,1
	4	83		1,4	0,2	15,0	0,1
	5	83		1,8	0,2	11,0	0,1
	7	83		2,1	0,3	14,0	0,1

відсутні, тому відбір плюс-варіантів (клонів, ІЛА яких більший від середнього значення ІЛА клонів штаму на дві величини стандартного відхилення ІЛА) при селекційній роботі можливий вже на 3-ю добу росту культури (табл. 4).

Другий етап досліджень полягав у вивченні мінливості спонтанних клонів варіантів S4, Л6, Л7, М4 та К70 за здатністю до лізису культури *L. delbrueckii* (табл. 2). Абсолютна більшість клонів варіанта S4 на 3-ю і 4-у добу росту не лізувала клітин тест-культури, а на 5-у та 7-у добу кількість таких клонів знижувалася до 58,0 та 53,5 % відповідно. Однак серед спонтанних варіантів S4 виявилися клони з дуже високими ІЛА.

Вірогідно, існує можливість одержання штамів *S. recifensis* var. *lyticus* зі специфічною активністю по відношенню до певного патогену. Але така специфічність не є абсолютною і серед варіантів S4 можливий пошук ревертантів зі здатністю лізувати клітини інших культур.

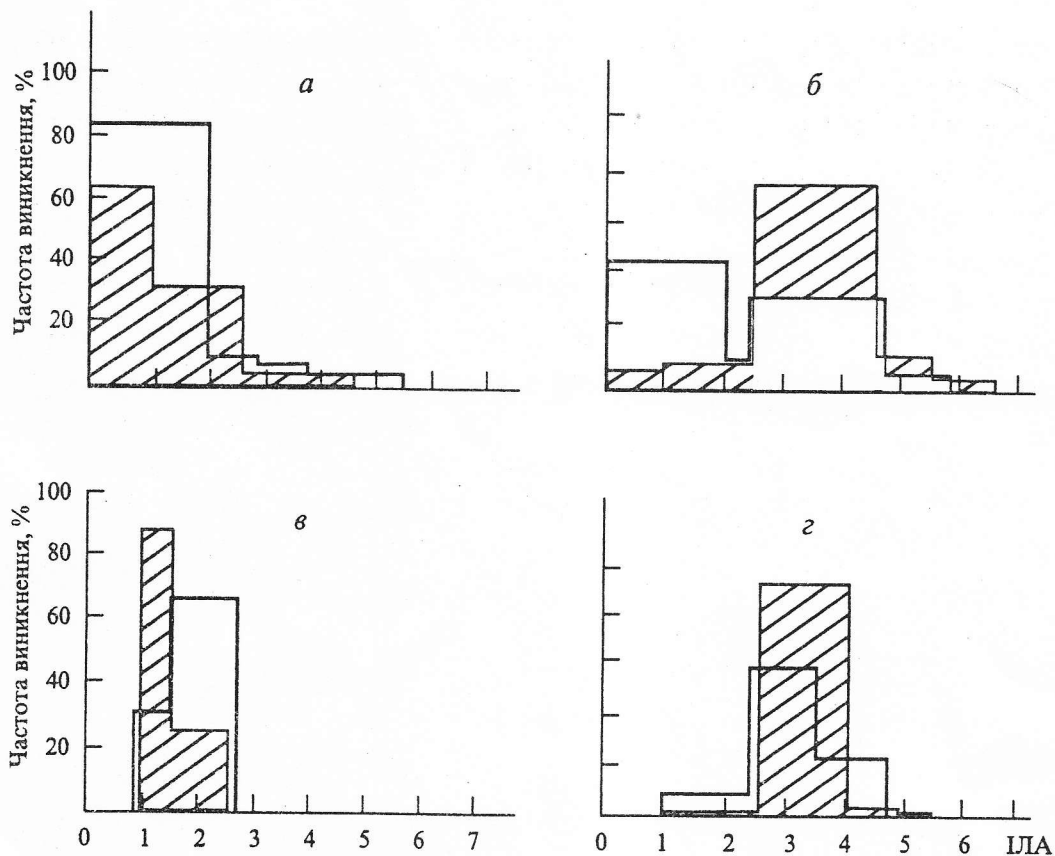
При дослідженні спонтанного розсіву М4, Л6, Л7 та К70 помічено, що із збільшенням часу їх вирощування відбуваються суттєве зростання середнього ІЛА (в 2 рази і більше) та одночасно зниження мінливості культури-продуцента за досліджуваною ознакою. Така тенденція не спостерігається при визначенні ІЛА цих варіантів щодо клітин стафілокока. Слід також зазначити, що досліджувані культури характеризуються більшою мінливістю за здатністю лізувати *L. delbrueckii*, ніж *S. aureus* 209, про що свідчать значення коефіцієнтів варіації.

Одержані на попередніх етапах окремі плюс-варіанти штамів оброблялися мутагеном — N-метил-N-нітрозосечовиною. Були відібрані варіанти, що

Таблиця 4. Частота виникнення плюс- і мінус-варіантів при розсіві штаму *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* та варіантів, оброблених мутагеном МНС

Варіант	Час вирощування, доби	Спонтанні варіанти/оброблені мутагеном, %			
		<i>L. delbrueckii</i>		<i>S. aureus</i>	
		плюс-варіант	мінус-варіант	плюс-варіант	мінус-варіант
S4	3	6,9/3,9	86,0/64,0	5,8/8,2	0/0
	4	7,9/1,9	82,5/42,3	3,3/4,8	0/0
	5	1,8/0	58,0/25,0	2,5/3,6	0,8/1,2
	7	2,6/4,0	53,5/2,9	4,2/4,8	1,7/1,2
М4	3	1,7/9,5	4,5/86,7	4,2/—	0/—
	4	2,6/7,6	0,8/79,0	5,9/—	0/—
	5	1,8/3,9	0/63,5	2,5/—	0/—
	7	5,3/1,0	0/32,7	2,5/—	1,0/—
Л6	3	0/1,9	3,4/59,2	5,8/6,0	0/0
	4	0,8/1,0	1,7/40,8	2,5/2,4	2,5/0
	5	1,7/0	2,5/27,0	5,0/2,4	0,8/2,4
	7	4,3/0	0,8/20,5	4,2/0	2,5/1,2
Л7	3	0,8/0	2,5/—	5,0/—	0/—
	4	0/—	1,7/—	3,3/—	3,3/—
	5	3,4/—	1,7/—	3,3/—	4,2/—
	7	3,4/—	3,4/—	5,0/—	0,8/—
К70	3	1,3/—	16,5/—	5,0/—	0/—
	4	0/—	3,8/—	1,3/—	0/—
	5	0/—	2,5/—	6,3/—	0/—
	7	0/—	2,5/—	2,5/—	1,3/—

Примітка: “—” — мутагеном не оброблялися.



Розподіл величин ІЛА клонів варіанта S4 до обробки МНС (□) та після неї (▨):
 а, б — середовище з *L. delbrueckii*; в, г — середовище з *S. aureus*; а, в — 3-я доба росту;
 б, г — 7-а доба росту.

характеризувалися максимальними ІЛА у поєднанні з найменшими термінами прояву бактеріолітичної активності в процесі росту. Варіанти, клони яких використовували для мутагенної обробки, мали меншу мінливість у порівнянні з іншими. Як показали результати мутагенної обробки відібраних варіантів (табл. 3), обробка мутагеном МНС викликає значне зростання мінливості культури за здатністю до лізису *L. delbrueckii* та частки мінус-варіантів (рівень ІЛА менший, ніж середній, на дві величини стандартного відхилення). В той же час мутагенізація приводить до появи 2–5 % варіантів S4-1, S4-3 та M4-1 з дуже високими ІЛА.

Мутагенна обробка варіантів S4-2 та Л6-2 не збільшує їх мінливість за здатністю до лізису *S. aureus*. Дія мутагену, що знижує виживання спор до 0,1–0,2 %, дозволяє одержати до 8 % плюс-варіантів.

Спонтанні клони досліджених варіантів розрізняються між собою і за літичною активністю у відношенні до різних тест-культур. Максимальну стафілолітичну активність (ІЛА = 3,2) проявляв варіант S4, що тривалий час піддавався селекції на середовищі з внесенням *S. aureus*. В той же час спонтанні клони S4 не виявляли високої активності щодо *L. delbrueckii*. Після мутагенної обробки картина змінилася: саме цей варіант, маючи найбільші серед інших ІЛА, виявив максимальні як стафілолітичну, так і лактолітичну активність.

При порівнянні ІЛА клонів S4 до обробки мутагеном і після неї на 3-ю та 7-у добу росту на середовищі з *L. delbrueckii* помітний перерозподіл його величин (рисунок): знижується кількість клонів штаму-мутанта з ІЛА менше 2 (на 7-у добу в 8–10 разів) і підвищується відсоток клонів з ІЛА 2,5–6 (в

2–2,5 раза). Культивування на середовищі, що містить *S. aureus*, також свідчить про зменшення частки клонів з низькими значеннями ІЛА та збільшення кількості високоактивних клонів, але не таке значне (в 1,5–2 рази).

Дія мутагену виявилася і в уповільненні швидкості синтезу ферментного комплексу у основної маси варіантів штаму. Після обробки сумарний максимальний прояв бактеріолітичної активності припадає на 5-7-у добу росту, в той час як у вихідних варіантів максимальну активність (у відношенні до кінцевої) спостерігали на 4–6-у добу.

Збільшення літичної активності комплексу, очевидно, можна пояснити зміною спрямованості біосинтетичної здатності *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* у бік підвищення процентного вмісту N-ацетилмурамідази. Цей фермент, що руйнує β -1-4-глікозидний зв'язок у муреїні клітинної стінки мікроорганізмів, відіграє важливу роль в процесі лізису клітини, забезпечує умови для прояву активності інших компонентів комплексу – пептидаз, протеїназ.

Таким чином, в результаті проведеної роботи вивчена динаміка мінливості спонтанних варіантів *S. recifensis* var. *lyticus* за здатністю до лізису *L. delbrueckii* та *S. aureus*. Визначений вплив мутагенної обробки МНС на мінливість ознаки бактеріолітичної активності, показана ефективність цієї обробки культури для підвищення цільової активності комплексу, що синтезується. Одержані варіанти S4, що перевищують вихідний штам за цільовою активністю у 1,5–2 рази по відношенню до *S. aureus* та у 2–2,5 рази – до *L. delbrueckii*. Результати роботи є основою для проведення подальших генетико-селекційних досліджень.

Т. С. Тодосійчук¹, Л. Н. Шинкаренко¹, В. А. Федоренко², Л. И. Базилия²

¹Национал. техн. ун-т Украины "КПИ", Киев;

²Львов. гос. ун-т

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR. *LYTICUS* С ИЗМЕНЕННОЙ БАКТЕРИОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Резюме

Показана принципиальная возможность получения продуцентов литического ферментного комплекса широкого спектра действия *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* с измененной биосинтетической способностью.

Изучена спонтанная и индуцированная мутагеном (N-метил-N-нитрозомочевинной) изменчивость 5 вариантов штамма по способности лизировать клетки *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus delbrueckii*.

Отобраны наиболее активные варианты, превышающие активность исходного штамма в 2–2,5 раза, для дальнейшей селекционно-генетической работы и возможного практического использования.

Ключевые слова: бактериолитическая активность, штамм, клон, мутагенез, тест-культура

T. S. Todosijchuk, L. M. Shinkarenko, V. O. Fedorenko*, L. I. Basilija*

National Technical University of Ukraine "KPI", Kyiv;
Lviv State University*

OBTAINING OF MUTANTS OF *STREPTOMYCES RECIFENSIS* VAR *LYTICUS*
WITH CHANGED BACTERIOLYTIC ACTIVITY

Summary

A possibility of obtaining strains with changed biosynthetic ability from *Streptomyces recifensis* v. *lyticus* (producer of a complex of lytic enzymes with a wide spectrum of action) has been demonstrated.

Spontaneous variability and that induced by the N-methyl-nitrourea mutagenesis of file variants of the initial strain have been studied in respect of lytic activity against cells of *Staphylococcus aureus* and *Lactobacillus delbrueckii*. The most active variants have been selected for the further genetic experiments and possible practical use.

The lytic activity of the selected variants exceeds more than twice that of the initial strain.

Key words: producers, lytic enzyme complex, bacteriolytic activity, mutagenic treatment

The author's address: T. S. Todosijchuk, Chemistry and Technology Faculty of the National Technical University of Ukraine, "KPI"; 37 Peremogi Pr., Kyiv, 252056, Ukraine

1. Бабенко Ю. С., Килочек Т. П., Соколова И. Е. и др. Синтез и свойства комплекса литических ферментов // Тез. докл. VII Всесоюз. съезда микробиол. о-ва. — Алма-Ата, 1985. — Т. 2. — С. 13.
2. Давниченко Л. С. Роль процессов репарации в индукции N-нитрозометилмочевинной летальных и мутационных процессов в бактериальной клетке: Автореф. ... канд. биол. наук. — М., 1980. — 18 с.
3. Захарова И. Я., Павлова И. П. Литические ферменты микроорганизмов. — Киев: Наук. думка, 1985. — 216 с.
4. Митрофанов Ю. А., Олимпиенко Г. С. Индуцированный мутационный процесс эукариот (механизмы мутагенеза). — М.: Наука, 1980. — 264 с.
5. Мутагенез микроорганизмов: Сб. статей / Отв. ред. М. Х. Шигаева. — Алма-Ата: Наука, 1970. — 115 с.
6. Соколова И. Е. Выделение и свойства литических эндопептидаз штамма *Act. recifensis* var. *lyticus* 2435 // Материалы IV съезда Укр. микробиол. о-ва. — Киев: Наук. думка, 1984. — Ч. 1. — С. 88.
7. Соколова И. Е., Ставицкая В. И. Литические гексозаминидазы из *Act. recifensis* var. *lyticus* 2435 // III Всесоюз. конф. "Биосинтез ферментов микроорганизмами": Тез. докл. — Пущино, 1986. — С. 210.
8. Химический мутагенез / Под ред. Г. Г. Порощенко. — М., 1986. — 204 с. (Итоги науки и техники / ВИНТИ. Сер. Общая генетика; Т9).
9. Шинкаренко Л. Н. Литические ферменты из *Act. recifensis* var. *lyticus* 2435 и условия, влияющие на их биосинтез: Дис. ... канд. биол. наук. — Днепропетровск, 1979. — 130 с.

Одержано 27.02.96