Отримання і характеристика мутантів штаму streptomyces sioyaensis, стійких до дії рифампіцину

ЗМІСТ

ВСТУП

. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

.1 Мутації та їх види

.1.1 Спонтанний мутагенез

.1.2 Індукований мутагенез

.2 Тіопептидні антибіотики і сіоміцин

.3 Мутації актиноміцетів, що впливають на їх антибіотичну активність

. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

.1 Об’єкт досліджень

.2 Середовища для культивування

.3 Методи досліджень

. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

.1 Характеристика штаму S. sioyaensis Lv81 за ознакою стійкості до антибіотиків

.2 Мутагенна обробка штаму S. sioyaensis Lv81

.3 Отримання і порівняльна характеристика рифампіцин-резистентних мутантів штаму S. sioyaensis Lv81

ВИСНОВКИ

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

ВСТУП

Антибіотики - це речовини мікробного, рослинноно або тваринного походження, їх напівсинтетичні та синтетичні аналоги й похідні, що вибірково пригнічують життєздатність мікроорганізмів, вірусів, найпростіших, грибів, а також затримують ріст пухлин. Термін «антибіотик» був введений в літературу Ваксманом у 1942 році.

Широкий спектр дії різних антибіотиків обумовлює їх різноманітне застосування в медицині, різних галузях народного господарства, в наукових дослідженнях.

Актиноміцети - прокаріотичні міцеліальні грам-позитивні мікроорганізми, природнім місцем існування яких є грунт.

Як грунтові мікроорганізми, актиноміцети відіграють важливу екологічну роль. Однак увагу дослідників вони привертають насамперед як одні з найважливіших об’єктів біотехнології. Більше 60% біологічно активних сполук мікробного походження і дві третини антибіотиків - це метаболіти актиноміцетів. Так, 80% з них синтезують представники роду Streptomyces.

Серед антибіотиків актиноміцетного походження важливе місце займають протипухлинні препарати.

В результаті багаторічного використання антибіотиків ракові клітини розвинули мутаційну стійкість до них. Також природні штами актиноміцетів характеризуються відносно низькою антибіотичною продуктивністю. Тому ведеться пошук, як нових протиракових антибіотиків, так і нових штамів, які б володіли більш високим рівнем антибіотичної продуктивності.

Висока вартість цих препаратів зумовлена порівняно низькою антибіотичною активністю штамів-продуцентів та їх здатністю синтезувати складні суміші кінцевих продуктів, з яких лише один або два мають терапевтичну цінність.

Підвищений рівень біосинтезу антибіотиків може залежати, як від генів, що відповідають за синтез, так і від генів, що забезпечують стійкість до власного та інших антибіотиків. Особливий інтерес викликають мутації стійкості до антибіотиків, які впливають на процеси транскрипції, трансляції, транспорту метаболітів та морфогенез актиноміцетів (аміноглікозиди, рифампіцин, макроліди) [1, 2, 3, 4, 5, 8].

Об’єктом нашої роботи був штам Streptomyces sioyaensis Lv81 - продуцент тіопептидного антибіотика сіоміцину. Сіоміцин виявляє антибіотичну активність проти грам-позитивних бактерій, в тому числі Mycobacterium tuberculosis, S. aureus та S. pneumoniae. Він здатний інгібувати ріст збудника малярії Plasmodium falciparum,. Цей антибіотик також володіє протипухлинними властивостями і є перспективним в терапії ракових захворювань.

Метою нашої роботи було одержання спонтанних та індукованих ультрафіолетом рифампіцин-резистентних мутантів Streptomyces sioyaensis Lv81 та визначення зміни їх антибіотичної активності. Для досягнення цієї мети було поставлено наступні завдання:

дослідити спектр стійкості штаму S. sioyaensis до антибіотиків з різним механізмом дії;

дослідити вплив рифампіцину на життєздатність штаму S. sioyaensis;

отримати і проаналізувати спонтанні Rifr -мутанти штаму S. sioyaensis;

дослідити зміни антибіотичної активності спонтанних Rifr- мутантів S. sioyaensis;

отримати і проаналізувати УФ-індуковані Rifr -мутанти штаму S. sioyaensis; актиноміцет мутант антибіотична sioyaensis

дослідити зміни антибіотичної активності УФ-індукованих Rifr- мутантів S. sioyaensis.

Курсова робота виконана в науково-дослідній лабораторії № 42 - селекції та генної інженерії продуцентів антибіотиків, кафедри генетики та біотехнології біологічного факультету Львівського національного університету імені Івана Франка.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Актиноміцети відносять до грам-позитивних міцеліальних спороносних бактерій, які мають типову клітинну стінку і є чутливими до антибіотиків специфічних до грам-позитивних бактерій [8].володіють здатністю синтезувати вторинні метаболіти, цінні для людини. Вони виробляють близько 70 % всіх відомих антибіотиків. Антибіотичний синтез починається коли культура входить у стаціонарну фазу і співпадає з початком морфологічної диференціації.

Ці організми розвиваються у формі мультинуклеоїдного міцелію, розмножуються і розповсюджуються за допомогою спор, які містять по одному нуклеоїду та формуються на кінцівках гіфів. Штами Streptomyces формують ланцюжки спор на повітряному міцелії. У ланцюжку міститься від трьох до декількох десятків спор. Потрапляючи в поживне середовище, спора проростає, утворивши одну - три ростові трубки. Вони галузяться, в результаті чого виникає субстратний міцелій, що формує колонію. Міцеліальний ріст забезпечує пристосованість цих організмів до основного середовища їхнього існування - грунту. Складна програма диференціації здійснюється в культурі у відповідь на низку сигналів, природа яких ще не до кінця з’ясована (погіршення умов живлення, досягнення певної густини клітин у популяції тощо). Вона включає утворення повітряних гіфів та спор, збільшення синтезу деяких позаклітинних ферментів, синтез вторинних метаболітів, зокрема антибіотиків [5].

Інтенсивні дослідження актиноміцетів дали змогу визначити низку важливих генетичних особливостей. Їхній ДНК властивий дуже високий Г+Ц - склад (для Streptomyces - 70 - 74% ). Геном Streptomyces представлений лінійною хромосомою. Ця хромосома є надзвичайно велика як для бактерій (8 Мв), в порівнянні з 4 Мв в E. coli і B. subtilis. Геном містить більш як 7000 генів, це на 20% більше, ніж у дріжджів. Кінці хромосоми містять теломерні ділянки - довгі (24 - 600 т.п.н.) інвертовані повторення нуклеотидних послідовностей, з ковалентно зв’язаними білками. Непостійність хромосоми викликана тим, що довгі (до 2 Мв) нестабільні послідовності на кінцях хромосоми піддаються частим спонтанним делеціям/ампліфікаціям, без значного впливу на ріст і розвиток організму. Такі спонтанні зміни генотипу можуть викликати зміни в морфології колоній, пігментації чи інших фенотипових рисах, але не вплинути на життєздатність [5, 8].

Порівняно з іншими бактеріями, в геномах актиноміцетів міститься багато генів, які контролюють вторинний метаболізм. У S. coelicolor А3(2) виявлено кластери генів продукції 22 вторинних метаболітів, у S. avermitilis - 30, а також кластери генів регуляторних білків, зокрема, різноманітних σ-субодиниць РНК-полімерази, які беруть участь в експресії певних груп генів у відповідь на зміни середовища, транскрипційні регулятори. Окрім здатності до синтезу великої кількості вторинних метоболітів, актиноміцетам властива природна стійкість як до власних, так і до інших антибіотиків. Ці їхні особливості є, очевидно, результатом виробленої у ході еволюції пристосованості до такого мінливого середовища існування, як грунт [8].

.1 Мутації та їх види

Мутації - це структурні зміни генетичного матеріалу, що призводять до порушень біохімічного гомеостазу і в кінцевому результаті - до появи нових властивостей у клітини чи організму. Термін «мутація» вперше був запропонований Г. Де Фрізом в його класичній праці «Мутаційна теорія». Викладені в цій роботі основні положення мутаційної теорії зберегли своє значення і сьогодні [1, 4].

Основні тези мутаційної теорії Г. Де Фріза такі:

Мутація виникає раптово, без всіяких перехідних форм;

Нові форми, що виникли внаслідок мутацій, досить стійкі;

В протилежність неспадковим змінам мутації не утворюють безперервних рядів, не групуються навкруги середнього типу (моди);

Мутації проявляються по-різному і можуть бути як корисними, так і шкідливими;

Вірогідність виявлення мутацій залежить від кількості досліджених особин;

Одні і ті ж мутації можуть виникати багаторазово.

Залежно від способу виникнення мутацій їх поділяють на спонтанні, що постійно виникають у природі без очевидних причин і з певною частотою, та індуковані мутації, що виникають у відповідь на дію різноманітних факторів середовища.

За виявом у гетерозиготи мутації поділяють на домінантні та рецесивні. Більшість мутацій, що виникають спонтанно або індукуються чинниками зовнішнього середовища, є рецесивними і лише деякі з них - домінантні. Рецесивність мутацій дуже важлива для існування виду, оскільки мутації в своїй переважній більшості за даних умов є шкідливими.

За відношенням до норми або так званого дикого типу розрізняють мутації прямі, за яких гени дикого типу перетворюються в алельні форми, та супресорні і зворотні мутації, за яких відновлюється дикий фенотип. Повернення мутанта до дикого фенотипу (тобто реверсія) найчастіше є результатом супресії, тобто іншої мутації. Зворотні мутації, за яких ушкоджений ген повністю відновлює свою будову і перетворюється у вихідний ген дикого типу, бувають рідко.

За локалізацією в еукаріотній клітині мутації поділяють на ядерні, якщо мутації відбуваються у ДНК ядра, та цитоплазматичні, якщо мутації відбуваються в ДНК цитоплазми.

За місцем виникнення розрізняють генеративні мутації, що виникають у статевих клітинах та їх попередниках, і передаються спадково та соматичні, які утворюються в клітинах тіла і не приймають участі у розмноженні. Соматичні мутації ведуть до появи генетичних мозаїків, у яких зміненою є лише частина організму, що розвинулася в результаті мітотичного поділу мутантної клітини.

За фенотиповим виявом мутації поділяють на морфологічні, фізіологічні та біохімічні.

Морфологічні - це мутації, що проявляються тими чи іншими змінами будови клітин та організмів, структури колоній прокаріотів тощо. Фізіологічні - супроводжуються порушенням фізіологічних функцій. Біохімічні - мутації, для яких встановлена суть основних порушень обміну речовин, в першу чергу на рівні білкових молекул.

За впливом на адаптивну здатність клітин і організмів мутації поділяють на наступні:

а) корисні мутації - за фенотиповим проявом імітують адаптивні модифікації і тому сприяють збереженню виду за даних умов;

б) нейтральні мутації - не впливають на жуттєздатність клітин і організмів;

в) субвітальні мутації - знижують життєздатність організмів на 10 - 50 %;

г) напівлетальні мутації - знижують життєздатність організмів на 50 - 90 %;

д) летальні - призводять до загибелі 100 % організмів, що мають таку мутацію;

е) умовно-летальні мутації - проявляються лише за певних умов.

Залежно від змін генотипу розрізняють генні або точкові мутації - зміни структури ДНК у межах одного гена, тобто при цих мутаціях зміни стосуються тільки одного нуклеотиду, хромосомні мутації або хромосомні перебудови - порушення структури хромосом, геномні мутації - випадкові зміни кількості окремих хромосом або кількості хромосомних наборів [1, 4].

За зміною структури ДНК мутації поділяють на вставки, делеції, транзиції і трансверсії. Вставки - це вбудовування окремих нуклеотидів і ДНК. Делеції - це перебудови, які спричиняють втрату ділянки хромосоми. Делеції у прокаріот зустрічаються рідко. У випадку транзицій має місце заміна одного пурину (піримідину) на інший пурин (піримідин). Трансверсії - це мутації, при яких відбувається заміна пурину на піримідин і навпаки. Мутації, що супроводжуються поверненням ділянки ДНК на 1800, дістали назву інверсій. Дуплікації - це повторення якого-небудь фрагменту ДНК.

Місенс мутації - це мутації із зміненим змістом, при яких одна амінокислота замінюється на іншу. Ці мутації будуть мати фенотипічний прояв в залежності від розташування.

Нонсенс мутації. Заміна основ може бути такою, що перетворить кодон у який-небудь з трьох нонсенс-триплетів: УАГ, УАА, УГА, що не транслюються і ведуть до передчасної термінації поліпептидного ланцюга [1, 4].

Пошкодження ДНК не завжди приводить до появи мутацій. У клітинах бактерій існують ферментні системи репарації, здатні усувати пошкоджені ділянки ДНК.

.1.1 Спонтанний мутагенез

Спонтанні або природні мутації виникають з певною частотою (1\*10-5 - 1\*10-9) без будь-яких видимих причин. Темп мутування залежить не тільки від генотипу, але й від фізіологічного стану клітин чи організму - від віку, стадії розвитку та інших умов.

Основні причини спонтанних мутацій:

Помилки реплікації ДНК (порушення 3’-5’ екзонуклеазної активності ДНК-помімераз);

Спонтанні таутомерні зміни азотистих основ, що порушують «канонічне» спарювання азотистих основ під час реплікації ДНК;

Спонтанні пошкодження ДНК (гідроліз N-глікозидного зв’язку, що призводить до втрат азотистих основ, дезамінування азотистих основ);

Пошкодження ДНК продуктами метаболізму клітин (вільними радикалами тощо);

Інсерції мобільних генетичних елементів.

Було встановлено, що існують в природі фактори спонтанного мутагенезу. До таких факторів відносять:

природна радіація.

спонтанно виникаючі хімічні сполуки, що викликають мутаційний процес.

вплив екстремальних температур.

гени-мутатори

Є гени, які можуть як збільшувати частоту мутацій інших генів (гени-мутатори), так і зменшувати її (гени-антимутатори).

Спонтанний мутагенез є результатом різних впливів, які можуть призвести до пошкодження генетичних структур протягом життєвого циклу організму. Цей процес є основним джерелом природної мінливості мікроорганізмів і лежать в основі їх еволюції [1, 4].

.1.2 Індукований мутагенез

Індукований мутагенез став сьогодні одним із основнох шляхів отримання нових вихідних форм для селекції. Водночас штучний мутагенез став частиною генетичного аналізу, бо використання мутацій для маркування генетичного матеріалу стало традиційним для генетичних досліджень[1, 4].

Мутагенами називають фізичні та хімічні чинники, що спричиняють структурні зміни генетичного матеріалу. Мутагени індукують мутації в дозах, які одночасно спричиняють летальний ефект. Одні з них, наприклад, ультрафіолет, виявляють найбільший мутагенний ефект у дозах, при яких виживання клітин становить від 0,1до 1,0 %. Інші, наприклад, N-метил-N’-нітро-N-нітрозогуанідин, ефективний в дозах, при яких виживання значно вище - від 10 до 50 %.

Дія мутагенів залежить від багатьох факторів, насамперед:

) концентрації мутагену в середовищі або дози опромінення УФ чи іонізуючими променями;

) тривалості дії мутагену;

) хімічного складу та pH середовища, в якому містяться клітини;

) температури;

) титру клітин у середовищі;

) типу клітин (вегетативні клітини або спори) та стадії їхнього життєвого циклу [1, 4].

Мутагенний ефект ультрафіолетового опромінення виявляється лише у клітинних моношарах, таких як мікроорганізми, пилок, спори, поверхневі клітини шкіри і т. п. Це пояснюється низькою проникливістю тканини для ультрафіолетових променів. Найбільш мутагенним виявилось опромінення з довжиною хвилі 260 нм, бо воно поглинається молекулами ДНК. Фотони ультрафіолетового світла мають малу енергію (3 - 5 еВ), яка не може спричинити іонізації молекул. Під їх дією виникає лише збудження молекул, що в подальшому призводить до хімічних змін: утворення димерів тиміну, гідратації цитозину і урацилу, розриву водневих зв’язків і зшиванню ДНК з білками.

Під впливом ультрафіолетового опромінення виникають як генні мутації, так і перебудови хромосом. В межах зростання відносно невеликих доз опромінення частота мутацій зростає прямо пропорційно, а в межах високих доз кількість мутацій на одиницю затраченої енергії зменшується.

Серед димерів піримідинів циклобутанового типу, що утворюються за впливу ультрафіолетового опромінення на ДНК, найчастіше виникають димери тиміну, на долю яких випадає до 40 % всього числа димерів. Димери ТС (тимін-цитозин) і СС (цитозин-цитозин) зустрічаються дещо рідше. Підраховано, що кожний такий димер викликає затримку реплікації ДНК на 10 - 15 с, і за відсутності репаративних процесів накопичення згаданих змін могло б призвести до дуже серйозних наслідків. Однак, завдяки репарації, ці ушкодження ДНК частково або повністю усуваються і тому можуть розглядатися лише як передмутаційні зміни [1, 4, 5].

У клітинах бактерій функціонує декілька систем репарації пошкоджень, зумовлених мутагенами. Однією з них є фотореактивація та репарація спорових фотопродуктів. Цей процес відкрив наприкінці 40-х років ХХ століття А. Кельнер, котрий довів, що опромінення S. griseus видимим світлом впливає на його чутливість до УФ. Фотореактивація розглядається як безпомилкова репарація, що не призводить до появи мутацій. Однак не всі димери видаляються у ході цього процесу [1, 4].

Сьогодні в центрі уваги генетичних досліджень знаходиться хімічний мутагенез, що має дуже важливе значення для екології, сільського господарства та медицини. Перші хімічні мутагени були відкриті в 30-х В.В. Сахаровим, М.Ю. Лобашовим і С.М. Гершензоном. Через деякий час ці дослідження досягли широкого розмаху завдяки дослідженням І.А. Рапопорта і Ш. Ауербах, які вперше виявили 100-% мутагенний ефект у окремих хімічних сполук - супермутагенів. Хімічні мутагени - це речовини, які викликають хімічні перетворення, що супроводжуються змінами у структурі ДНК.метил-N’-нітро-N-нітрозогуанідин (НГ) належить до сполук, які алкілюють ДНК, - найсильніший з хімічних мутагенів. До цієї групи належать також диалкілсульфати (диметилсульфат, диетилсульфат), алкілалкансульфати (метилметансульфонат, етилметансульфонат), N-нітрозосполуки та діазоалкани (N-алкіл-N-нітрозосечовина, N-алкіл-N’-нітро-N-нітрозогуанідин, пропіленоксид), бетапропіолактон, етиленіміни, іприти (сірчистий іприт, азотистий іприт). Ці сполуки є електрофілами, спорідненими до нуклеофільних центрів біологічних макромолекул. НГ утворює кон’югати з глутатіоном. У відповідному стані глутатіон є нуклеофілом і реагує з електрофільними сполуками. Реакція НГ з цистеїновим залишком глутатіону призводить до утворення діазометану - високореактивної метилуючої сполуки, яка власне, й спричиняє мутагенний ефект [1, 4 ,5].

В азотистих основах ДНК є багато сайтів, здатних реагувати з алкілуючими агентами. У залишку аденіну це N1, N3, N6 та N7; гуаніну - N1, N2, N3, N6, N7 та О6; цитозину - N3, N4 та О2; тиміну - N3, О2 та О4. Загалом атоми основ азоту є більш нуклеофільні, ніж атоми кисню. Найбільш реактивними є сьомий атом азоту в гуаніні та третій атом азоту в аденіні. Підлягають алкілуванню також й залишки фосфорної кислоти, у результаті чого виникають фосфотриефіри. Близько 85% пошкоджень ДНК, спричинених НГ, це метильовані азотисті основи, а 14% - фосфотриефіри.

Алкілування пуринів спричиняє неферментативний гідроліз глікозидних зв’язків та появу в ДНК апуринових сайтів [5].

.2 Тіопептидні антибіотики і сіоміцин

Тіопептидні антибіотики - це високоорганізовані макроциклічні пептиди, які містять у своєму складі сірку. Вони є інгібіторами синтезу білка у бактерій. Незважаючи на хімічну і таксономічну різноманітність, багато з них володіють подібними біологічними властивостями. Ці антибіотики здатні інгібувати ріст, таких небезпечних антибіотико резистентних патогенів, як метицилін-резистентний Staphylococcus aureus, пеніцилін-резистентний Streptococcus pneumoniae та ванкоміцин-резистентні ентерококи [12].

Першим тіопептидним антибіотиком, який вдалося виділити у 1954р. був тіострептон (продуцент Streptomyces azureus). Цей вторинний метаболіт виявився ефективним проти грам-позитивних бактерій і за своїм ефектом був схожий на пеніцилін. Проте, незважаючи на свою перспективність, він так і не був впроваджений для клінічного використання через токсичність та низьку розчинність у воді. Згодом було відкрито ще цілий ряд тіопептидних антибіотиків, серед яких були сіоміцин (продуцент Streptomyces sioyaensis), тіопептин (продуцент Streptomyces tateyamensis).



Рисунок1.1.

Структурна формула сіоміцину А.

Сіоміцин - це група з 4-ох тіопептидів. Сіоміцин є природним аналогом тіострептону і відрізняється від останнього наявністю дегідроаланін-валінового залишку.

Сіоміциновий комплекс був вперше виділений із S. sioyaensis в 1959 році і виявив активність проти грам-позитивних бактерій і мікобактерій. Подальша очистка необробленого препарату протягом 10 років показала, що цей сірковмісний тіопептидний антибіотик насправді складається з головного елемента, сіоміцину А (рис. 1.1.), і числа мінорних компонентів, сіоміцин В, С і D, останній з яких був виділений на 21 рік після відкриття первинного антибіотичного комплексу. Сіоміцин В одержали з сіоміцину А протягом зберігання, а сіоміцини С і D є природніми продуктами S. sioyaensis. Підтверджено, що сіоміцин відрізняється від тіострептону лише в дегідроаланін-валіновій одиниці замість аланін-ізолейцинового залишку [6].

Сіоміцин містить в своїй структурі центральний макроциклічний домен з тіазольними кільцями, дегідроаланіновий хвіст і пептидну основу. Пептидну основу складають такі амінокислоти: аланін, валін, треонін, пролін, лізин, гліцин, аспарагінова кислота, глутамінова кислота, цистеїн і триптофан.

Сіоміцин виявляє антибіотичну активність проти грам-позитивних бактерій в т.ч. проти Mycobacterium tuberculosis, проти пухлин і проти збудника малярії Plasmodium falciparum [6, 17, 19, 20].

Синтез тіострептону регулюється кластером генів tsr (рис.1.2, табл. 1.1), який складається з 21 відкритої рамки зчитування (ORF). Ці дані підтверджують рибосомний синтез пептидних попередників тіострептону та постртрансляційну модифікацію. 58-амінокислотний пептидний попередник TsrH складається з 41-амінокислотної послідовності головного пептиду (LP) і 17-амінокислотної послідовності структурного пептиду (SP). Послідовність (SP) є ідентична пептидній основі тіострептону. В центрі tsr кластеру генів знаходиться 7 ORF ( tsrJKLMNOS ), продукти яких каталізують перетворення пептидного попередника TsrH в тіострептонову макроциклічну структуру [12].

Циклодегідратаза TsrO, гомологічна до циклогідратази PatD (38% подібності і 22% ідентичності), разом із білком TsrM каталізують нуклеофільну атаку цитозину в бічному ланцюзі, що в кінцевому результаті призводить до утворення тіазольних кілець. Білки TsrJ і TsrK, гомологічні в N- (25% подібності і 11% ідентичності) і C-кінцевих ділянках (30% подібності і 15 % ідентичності) з SpaB Bacillus subtilis, ймовірно важливі для дегідратації серинових і треонінових залишків в утворенні дегідроамінокислот [12]., також гомологічна до N-кінцевої послідовності SpaB Bacillus subtilis (24%подібності і 11% ідентичності), теж виконує функцію дегідратуючого агента.і TsrL не проявляють гомології до інших білків з відомими функціями. Вони каталізують кінцевий етап синтезу 26-членної макроциклічної структури.

Функціональне завдання решти ORF всередині tsr кластеру генів - дозрівання інтермедіату в тіострептон. Серед їхніх продуктів є:- метилтрансфераза;- піридоксальфосфатвмісна амінотрансфераза;- гідролаза;- ацил-КоА-дегідрогеназа;- полікетидциклаза;- дегідрогеназа/редуктаза;- Р450 епоксидаза;- ацил-КоА-синтетаза;- гідролаза/естераза [12].

Синтез сіоміцину не відрізняється від синтезу тіострептону (рис.1.2, табл. 1.1). Він регулюється sio кластером генів. Всередині цього кластеру генів є ген sioH, який кодує 61-амінокислотний пептидний попередник SioH, що містить 17-амінокислотну послідовність(SP), яка є ідентичною до (SP) послідовності TsrH. Функції sioJKLMNOS продуктів є ідентичними до функцій tsrJKLMNOS продуктів, адже вони кодують подібні ферменти для схожої центральної частини молекули антибіотика. Інактивація гену sioO повністю зупиняє синтез сіоміцину, підтверджуючи тим самим свою необхідність для цього процесу. Ці дані підтверджують загальний принцип синтезу тіопептидних антибіотиків [12, 13].



Рисунок 1.2. Кластер генів та біосинтетичний шлях тіострептону та сіоміцину A [12].

Таблиця 1.1.

Гени задіяні в біосинтезі тіострептону і сіоміцину А [12]



1.3 Мутації актиноміцетів, що впливають на їх антибіотичну активність

Актиноміцети мають генетичні детермінанти стійкості до власних антибіотиків, і, на відміну від більшості бактерій, їм властива множинна резистентність і до тих антибіотиків, які вони не синтезують. Гени синтезу антибіотиків знаходяться у хромосомі. У кластерах генів синтезу антибіотиків зазвичай є також гени стійкості до них. Їхнє функціонування може бути конститутивним або індукуватися під час синтезу антибіотиків [2, 3].

Для актиноміцетів, як й інших бактерій, відомі такі основні механізми захисту від антибіотиків:

їхня ензиматична інактивація;

модифікація мішені дії антибіотика;

стійкість, зумовлена змінами транспортування антибіотика через клітинну мембрану [5].

Для актиноміцетів характерним є поєднання різних способів захисту від антибіотиків.

Ензими, що модифікують антибіотики, виявлені у багатьох актиноміцетів - продуцентів аміноглікозидних антибіотиків. Зустрічаються 2 типи їхньої модифікації, а саме: N-метилювання аміногруп та О-фосфорилювання залишків гідроксилів. Ферментами, що приймають участь у цих процесах є ацетилтрансфераза та фосфотрансфераза.

Посттранскрипційне метилювання рибосомної РНК із використанням S-аденозил-метіоніну як кофактора є механізмом, який зумовлює стійкість багатьох актиноміцетів до антибіотиків, мішенню дії яких є рибосома. Метилювання проходить по двох сайтах 16SрРНК: Залишку гуаніна G-1405 і аденіна А-1408. Метильовані продукти набувають позитивного зараду і не взаємодіють з аміноглікозидами [5].

Мембранні транспортні системи, що визначають стійкість актиноміцетів до антибіотиків містять білки, що належать до двох груп:

АВС-транспортери, використовують енергію АТФ для транспортування сполук через мембрану проти градієнту концентрації;

білки, що транспортують антибіотики з допомогою протон-залежного трансмембранного електрохімічного градієнта.

Серед генів мембранних транспортних систем виявлено такі, які визначають стійкість до екзогенних антибіотиків, і такі, які контролюють експортування власних антибіотиків під час їхнього синтезу. Наприклад, білок OleB виявляють у клітинах S. antibioticus під час синтезу олеандоміцину. Він зв’язує та експортує з клітини глікозильований олеандоміцин [5].виявляють високу ступінь адаптації до екстремальних поживних обмежень, включаючи синтез і секрецію антибіотиків, та формування повітряного міцелію. Багато досліджень показали, що відповідь організму на несприятливі умови середовища залежить від зростання кількості гуанозинтетрафосфату (ppGpp), який синтезується у відповідь на приєднання ненавантаженої тРНК до А-сайту рибосоми.

Зменшення запасів ГТФ корелює з ініціацією морфологічної диференціації, що супроводжується збільшенням концентрації внутрішньоклітинних ppGpp і рppGpp.

Головну роль в процесі диференціації відіграє Rel-контроль, опосередкований продуктами генів relA та relC. Цими продуктами є ppGpp синтаза ти рибосомний білок L11, що необхідний для активації попереднього. Ініціація початкових шляхів синтезу вторинних метаболітів починається після розвитку повітряного міцелію та формування спор [10, 14].

(р)ppGpp синтезується з ГТФ і АТФ з допомогою relA генного продукту, який активується приєднанням ненавантаженої тРНК до А-сайту через процес, що потребує 50S-рибосомного білка L11. Відповідно клітини, які не здатні синтезувати (р)ppGpp, бо мають мутантний RelA чи L11 білок, не можуть ініціювати морфологічну та фізіологічну диференціацію (relA і relC мутанти). Якщо здатність нагромаджувати (р)ppGpp клітинами буде відновлена, то процеси біосинтезу антибіотика відбуваються на належному рівні.

У ауксотрофних мутантів найкраща споруляція відбувається на середній концентрації амінокислот, оскільки ця концентрація є настільки зменшеною, що в певний момент зупиняє ріст та ініціює споруляцію, а також є достатньою для білкового синтезу, який є необхідним для нормального проходження процесу споруляції. Часткове обмеження амінокислотами спричиняє швидке збільшення (р)ppGpp і зменшення кількості ГТФ [10, 14].

Представники роду Streptomyces є особливо цікавими, оскільки вони синтезують велику кількість антибіотиків, важливих в промисловості та медицині. Ініціація продукції антибіотика, часто згадується як «фізіологічна диференціація», зазвичай відбувається протягом переходу між вегетативним ростом і морфологічною диференціацією організму. Розпізнавання сигналів, що запускають процес диференціації є важливим в регуляції початку морфологічної і фізіологічної диференціації. Було відкрито, що морфологічна диференціація запускається зменшенням кількості ГТФ, тоді як фізіологічна - збільшенням вмісту ppGpp [2, 3].

В E.coli ppGpp може впливати на експресію генів, змінюючи вибірковість РНК-полімерази (РНКП). Багато генетичних досліджень E.coli доводять, що РНКП є мішенню ppGpp регуляції.

На біосинтез вторинних метаболітів можуть впливати також мутації стійкості до інших антибіотиків. Ряд досліджень, присвячених впливу мутацій стійкості до стрептоміцину показали, що такі мутації можуть відновлювати синтез антибіотиків у relA і relC мутантів. Секвенування ДНК показало, що це є точкова мутація в гені rpsL, продуктом якого є рибосомний білок S12. Тут має місце заміна однієї з амінокислот цього білка, внаслідок чого синтез антибіотика відбувається без участі ppGpp. Відомо, що у штаму S. lividans такою мутацією є заміна лізину на глутамін або аргінін у 88 положенні [2, 3, 10, 14].чутливий домен є близький до rif-зв’язуючого домену β-субодиниці РНКП. Її структура показує, що rif-кластер включений в активний центр РНКП E.coli, доводячи, що певні мутації в rif-зв’язуючому домені впливають на активність РНКП і можуть впливати на функцію сусіднього ppGpp-зв’язуючого домену. Відповідно ослаблена здатність синтезувати антибіотики у relA і relC мутантів може бути відновлена введенням певних rifr-мутацій в β-субодиниці РНКП.

Вивчаючи придатність rifr-мутацій, було знайдено, що біосинтез антибіотиків активується введенням rif-мутації в ген rpoB. Більше того, не дивлячись на те, що B. subtilis в нормі не синтезує антибіотика нелтрегалозадіаміну, введення певної rifr rpoB-мутації активує здатність бактерії синтезувати даний антибіотик [2, 3, 7, 9, 10, 14].

В селекції високоактивних штамів продуцентів антибіотиків ефективним є отримання мутантів стійких до дії кількох антибіотиків.

Прикладом такого дослідження може бути робота Tamehiro N. із співавторами. Вони працювали з промисловим штамом Streptomyces albus SAM-X, продуцент саліноміцину. Було проведено ряд експериментів по створенню потрійних мутантів, стійких одночасно до гентаміцину, стрептоміцину та рифампіцину. На першому етапі роботи було відібрано мутант КО600, який був стійкий до стрептоміцину. Цей мутант володів підвищеною здатністю до синтезу саліноміцину, тому саме з ним продовжили роботу. На основі цього мутанта було сконструйовано новий штам КО605, що був стійкий до стрептоміцину і до гентаміцину одночасно. Рівень синтезу саліноміцину цього подвійного мутанта був у 1,25 раза вищий, ніж у стрептоміцин резистентного штама КО600. Наступним етапом роботи було сконструювати потрійний мутант, стійкий одночасно до трьох антибіотиків: стрептоміцину, гентаміцину і рифампіцину. На основі мутанта КО605 було сконструйовано такий потрійний мутант - КО606. Проаналізувавши його рівень антибіотичної активності було показано, що цей мутант синтезує антибіотика в 1,26 раза більше, ніж подвійний мутант КО605 [16].

Також цікаві результати були отримані при проведенні робіт з метою підвищення антибіотичної активності штаму S. coelicolor А(3)2, при використанні такого ж комбінування мутацій стійкості до різних антибіотиків. При використанні спонтанного мутагенезу, отримували мутанти, стійкі до стрептоміцину, рифампіцину та гентаміцину. Рівень синтезу актинородину такими мутантами був у 1,6 - 3 рази вищий від вихідного штаму. Наступним етапом цієї роботи було сконструювати подвійні мутанти, введенням rifr або genr-мутацій в strr-мутант. Це призводило до збільшення рівня утворення антибіотика у 1,7 - 2,5 разів в порівнянні з одиночними мутаціями стійкості до антибіотиків. При конструюванні потрійних мутантів (strr rifr genr), було виявлено, що продукція актинородину зросла у 48 разів у порівнянні з вихідним штамом [10, 14].

Отже, для отримання високоактивних штамів - продуцентів антибіотиків, необхідно вивчити та вміло використовувати метод направленого індукованого мутагенезу, для зміни структури та експресії генів біосинтезу антибіотиків та первинних метаболітів. Також важливим моментом для отримання мутантів з високою антибіотичною активністю є вивчення генів, які контролюють стійкість до власного та інших антибіотиків, а також механізму їх дії.

Таким чином, використання селекційних підходів та сучасних генно-інженерних маніпуляцій є важливим моментом у конструюванні штамів - продуцентів протипухлинних антибіотиків. А висока вартість цих препаратів, зумовлена порівняно низькою антибіотичною активністю штамів-продуцентів та їх здатністю синтезувати складні суміші кінцевих продуктів, з яких лише один або два мають терапевтичну цінність, надає все більшої актальності пошуку надпродуцентів цих антибіотиків [2, 3].

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

.1 Об’єкт досліджень

В роботі був використаний актиноміцетний штам S. sioyaensis Lv81, а також Sarcina lutea як тест-культура для визначення антибіотичної активності.

.2 Середовища для культивування

. Соєве середовище № 14 (СС-14)

соєва крупа 10,0 г2,5 г

агар 7,5 г

вода водопровідна до 0,5 л7,2

Стерилізація при 0,7 - 0,9 атм - 45 хв

. Вівсяне середовище

вівсяна крупа 32,0 г

агар 12,0 г

вода водопровідна до 0,5 л7,2

Стерилізація при 0,7 - 0,9 атм - 45 хв.

.Триптозний агар

агар 10 г

триптон 5 г

дріжджовий екстракт 5 г5 г

глюкоза 1 г

вода водопровідна до 1 л7,8

Стерилізація при 0,5 - 0,7 атм - 45 хв.

.Мінімальне середовище Хопвуда

К2НРО4 0,8 г

КОН 0,3 г

МgSО4×7Н2О 0,2 г0,01 г

аспарагін 0,05 г

агар 17 г

вола дистильована до 1 л7-7,5

Стерилізація при 0,5 - 0,7 атм - 45 хв.

Після стерилізації додати 10 мл 40% глюкози.

.3 Методи

Опромінення штаму S. sioyaensis ультрафіолетовими променями

Спори досліджуваного штаму обробляли УФ-променями з довжиною хвилі 260-280 нм; джерело УФ-променів - лампа Medicor BLM - 12. Час обробки становив 120 с. До і після обробки мутагеном проводили послідовні шестикратні розведення спорової суспензії і висівали її на соєве середовище №14. Порівнювали число колоній, утворених спорами, які вижили після опромінення, з числом колоній, що виникли із неопромінених спор, і визначали процент виживання.

.4 Визначення антибіотичної активності штаму S. sioyaensis

Експрес-аналіз антибіотичної активності вище зазначеного штаму проводили шляхом визначення індексу продуктивності (ІП). З газону штаму, що ріс 6 діб, вирізали агарові блоки і накладали на газон тест-культури. Після цього навколо колоній S. sioyaensis, що синтезували сіоміцин, утворювалися зони пригнічення росту тест-культури, за діаметром яких ви­зна­чали індекс продуктивності (ІП) досліджуваних клонів. ІП визначали як відношення діаметру зони пригнічення росту тест-культури антибіотиком до діаметра блока.

Визначення резистентності штаму до антибіотиків

Здійснювали методом дифузії в агар за допомогою дисків з антибіотиками. Спори штаму засівали газоном на чашки Петрі з середовищем. Після цього на кожну чашку клали по 4-5 паперових диски з антибіотиками. виробництва фірми LACHEMA (Чехія) (канаміцин, еритроміцин, тетрациклін) і виробничого об'єднання “Ферейн” (Росія) (хлорамфенікол, олеандоміцин, мономіцин, ріфампіцин, стрептоміцин, гентаміцин,оксацилін, бензилпеніци­лін, карбеніцилін, ампіцилін, цефалотин, поліміксин М і лінкоміцин). На 2 і 5 добу вимірювали діаметри зон пригнічення росту досліджуваних штамів навколо дисків. Резистентність досліжуваних штамів до рифампіцину визначали методом титрування спор на агаризовані середовища із зростаючими концентраціями антибіотика. Контролем служили варіанти досліду, в яких спори висівали на ці ж середовища без антибіотиків.

Виділення мутантів актиноміцетів зі зміненою стійкістю до антибіотиків

Мутанти, стійкі до антибіотиків, отримували шляхом висіву суспензій спор або міцеліальних фрагментів на соєве середовище №14 із різними концентраціями антибіотиків. Колонії, що виростали на середовищах з антибіотиком, пересівали на матричні чашки і робили повторну перевірку їх резистентності, як описано вище.

Визначення стабільності ознак резистентності мутантів до антибіотиків проводили шляхом посіву спор і міцеліальних фрагментів після їхнього зберігання на косяках з антибіотиками та без них, та наступним пересівом репліками на середовища з відповідною концентрацією антибіотика.

Статистичну обробку результатів з усіх експериментів, проводили за допомогою програми Microsoft Excel.

3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

Об’єктом роботи був штам S. sioyaensis Lv81 - продуцент тіопептидного антибіотика сіоміцину. Штам вирощували на соєвому середовищі № 14, оскільки воно є дешевими та зручним у приготуванні, а також на вівсяному для отримання спор. Штам S. sioyaensis Lv81 на СС-14 утворює колонії круглої форми, повітряний міцелій білого кольору. Досліджуваний штам утворює спори темно-сірого кольору на 5-6 добу росту. Вивчали вплив мутацій стійкості до рифампіцину на рівень антибіотичної активності.

.1 Характеристика штаму S. sioyaensis Lv81 за ознакою стійкості до антибіотиків.

Ми досліджували спектр стійкості штаму до 16 антибіотиків різного механізму дії на повноцінному середовищі СС-14 та мінімальному середовищі Хопвуда (МС). Для цього було використано метод дифузії в агар за допомогою дисків з антибіотиками.

З табл. 2.1 видно, що для штаму S. sioyaensis, як і для більшості стрептоміцетів, характерна стійкість до усіх β-лактамних антибіотиків, а також стійкість до поліміксину. Особливістю досліджуваного штама було те, що він виявляв високу чутливість до еритроміцину та олеандоміцину. Відомо, що багатьом актиноміцетам властивий MLSr-фенотип (стійкість до макролідів, лінкозамінів та стрептограмінів, забезпечується функціонуванням гена erm). Така резистентність досягається за рахунок метилювання 23S РНК. При подальшому вивченні було помічено, що S. sioyaensis, виявлє значну чутливість до рифампіцину, стрептоміцину та канаміцину. Варто відзначити, що в зоні інгібування росту еритроміцином та рифампіцином, на 5 добу росту виростали еритроміцин- та рифампіцин-стійкі клони S. sioyaensis.

Рівень резистентності штама S. sioyaensis до рифампіцину вивчено методом титрування, за даними якого були побудовані криві виживання. Титрування спор на зростаючих концентраціях рифампіцину (рис. 3.3) виявило, що 46% їх виживало при 0,01 мкг/мл антибіотика. При збільшенні кількості рифампіцину в середовищі, відсоток виживання спор зменшувався від 3,4×10-4 до 2,67×10-6. Концентрація рифампіцину при цьому збільшувалася від 0,05 до 0,5 мкг/мл. При вищих концентраціях антибіотика, росту штама не спостерігали (рис. 3.1).

Отримання і характеристика рифампіцин-резистентних мутантів штаму S. sioyaensis.

Спонтанні рифампіцин-резистентні (Rifr) мутанти штаму S. sioyaensis відбирали на середовищі, яке містило 0,5 мкг/мл рифампіцину. Частота виникнення Rifr-мутантів становила 10-6. Відомо, що спонтанні мутанти бактерій, стійкі до антибіотиків, виникають із частотою 10-5-10-7. Було отримано 210 спонтанних Rifr-мутантів. Мутанти S. sioyaensis поділили на групи за рівнем стійкості до рифампіцину за допомогою методу відбитків. До I групи увійшли мутанти, які були стійкими до концентрації рифампіцину 5-20 мкг/мл туди увійшло 96,2% мутантів. До II групи увійшли мутанти стійкі до 50-100 мкг/мл, їх кількість становила 3,8%. Серед Rifr-мутантів II групи було виділено мутанти Rif49S і Rif50S, які росли на середовищі із концентрацією рифампіцину 100мкг/мл.

Ми дослідили спектр стійкості мутантів Rif49S і Rif50S до 16 антибіотиків різного механізму дії на середовищі СС-14 та порівняли результати в вихідним штамом (табл. 3.3). Ми виявили, що обидва мутанти, як і вихідний штам, були стійкими до β-лактамних антибіотиків. Мутант Rif49S, як і Rif50S, на відміну від S. sioyaensis, набув стійкості до рифампіцину, про що свідчить відсутність зони пригнічення навколо диска з антибіотиком. Обидва мутанти стали чутливими до поліміксину. Мутант Rif49S є більш чутливим до олеандоміцину, еритроміцину, гентаміцину і канаміцину ніж вихідний штам та Rifr-мутант Rif50S. У порівнянні із S. sioyaensis, його Rifr-мутант Rif50S набув стійкості до тетрацикліну.

|  |  |
| --- | --- |
|  | Відсоток виживання, % |
| Конц. Rif мкг/мл | Rif49S | Rif50S |
| 100 | 100 | 90 |
| 500 | 85 | 73 |
| 1000 | 11 | 3 |

концентраціями рифампіцину 100, 500 і 1000 мкг/мл, ми виявили, що мутант Rif49S є дещо стійкішим до рифампіцину ніж Rif50S (рис. 3.4, табл. 3.4).



Рисунок 3.4. Виживання Rifr-мутантів Rif49S та Rif50S на зростаючих концентраціях рифампіцину. 1 - Rif49S, 2 - Rif50S, 3 - S.sioyaensis.

.2 Мутагенна обробка штаму S. sioyaensis Lv81

Для отримання індукованих рифампіцин-резистентних мутантів штаму S. sioyaensis Lv81 було використано ультрафіолетове опромінення.

Спори штаму S. sioyaensis Lv81 опромінювали ультрафіолетовим промінням протягом 120с, відсоток виживання при цьому становив 0,7. Після УФ-обробки спор S. sioyaensis частота виникнення клонів, стійких до рифампіцину, зростала на порядок. Літературні дані вказують на ефективність пошуку мутантів у разі виживання спор після обробки УФ в межах 0,1-1,0%.

Таблиця 3.1.

Чутливість штаму S. sioyaensis Lv81до антибіотиків із різним механізмом дії

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Група антибіотиків | Антибіотики | Зона пригнічення 3 доба | Зона пригнічення 5 доба |
| MLS | Олеандоміцин | 30 | 30 |
|  | Лінкоміцин | 10 | 10 |
|  | Еритроміцин | 43 | 39 |
| β-лактами | Бензилпеніцилін | 0 | 0 |
|  | Оксацилін | 0 | 0 |
|  | Карбеніцилін | 0 | 0 |
|  | Цефалотин | 0 | 0 |
|  | Ампіцилін | 0 | 0 |
| Аміноглікозиди | Канаміцин | 20 | 20 |
|  | Стрептоміцин | 25 | 25 |
|  | Гентаміцин | 14 | 14 |
|  | Неоміцин | 11 | 11 |
| Інші | Хлорамфенікол | 16 | 16 |
|  | Рифампіцин | 29 | 29 |
|  | Тетрациклін | 12 | 12 |
|  | Поліміксин | 0 | 0 |

Таблиця 3.2.

Виживання штаму S. sioyaensis Lv81 на середовищах із зростаючими концентраціями рифампіцину.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| конц. рифампіцину, мкг/мл | % виживання | lg % виживання  |
| 0 | 100 | 2 |
| 0,01 | 46,47 | 1,66 |
| 0,05 | 3,4×10-4 | -3,4 |
| 0,1 | 1,29×10-4 | -3,8 |
| 0,2 | 1,06×10-5 | -4,97 |
| 0,5 | 2,67×10-6 | -5,5 |

3.3 Отримання і порівняльна характеристика рифампіцин-резистентних мутантів штаму S. sioyaensis Lv81

Спонтанні рифампіцин-резистентні (Rifr) мутанти штаму S. sioyaensis Lv81 відбирали на середовищі, яке містило 0,5 мкг/мл рифампіцину. Частота виникнення їх була 10-5. Обробка спор УФ-опроміненням привела до підвищення частоти виникнення мутантів на порядок. Було отримано 210 спонтанних та 368 індукованих Rifr-мутантів штаму S. sioyaensis Lv81. Отримані Rifr-мутанти вивчали за рівнем антибіотичної активності методом агарових блоків із використанням тест-культури Sarcina lutea.

Порівнявши між собою показники антибіотичної активності Rifr-мутантів, спонтанних клонів вихідного штаму та його ж клонів оброблених ультрафіолетом (рис.3.2), виявлено, що індекс продуктивності та частка “плюс”-варіантів були найвищими серед клонів вихідного штаму обробленого УФ і становив 6,1±0,08 та 15,3 ±0,03%, відповідно. Частка “мінус”-варіантів була найвищою серед індукованих Rifr-мутантів і становила 3,5±0,03%. Коефіцієнт варіації рівня синтезу сіоміцину УФ індукованих Rifr-мутантів був найвищим серед всієї досліджуваної вибірки клонів і дорівнював 49,7%.

Однак, серед спонтанних Rifr-мутантів, нами було виявлено два високорезистентних мутанти Rif49S і Rif50S (стійкі до 100 мкг/мл рифампіцину в середовищі), клони яких володіли підвищеною антибіотичною активністю у порівнянні з спонтанними клонами S. sioyaensis та його ж клонами обробленими УФ (ІП Rif49S становив 6,4±0,1, частка “плюс”- варіантів - 20,8±0,06%).







Таблиця 3.3.

Чутливість спонтанних Rifr-мутантів Rif49S і Rif50S та S. sioyaensis Lv81 до антибіотиків із різним механізмом дії.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Група антибіотиків | Антибіотик | Зона пригнічення 3 доба |
|  |  | S.sioyaensis Lv81 | Rif49S | Rif50S |
| MLS | Олеандоміцин Лінкоміцин Еритроміцин | 30 10 43 | 45 17 52 | 30 13 43 |
| β-лактами | Ампіцилін Бензилпеніцилін Оксацилін Карбеніцилін Цефалотин | 0 0 0 0 0 | 0 0 0 0 0 | 0 0 0 0 0 |
| аміноглікозиди | Стрептоміцин Гентаміцин Канаміцин Неоміцин | 25 14 20 11 | 32 32 45 29 | 29 26 35 16 |
| інші | Хлорамфенікол Рифампіцин Тетрациклін Поліміксин | 16 29 12 0 | 22 0 9 9 | 24 0 0 8 |

Висновки

В результаті багаторічного використання антибіотиків ракові клітини розвинули мутаційну стійкість до них. Також природні штами актиноміцетів характеризуються відносно низькою антибіотичною продуктивністю. Тому ведеться пошук, як нових протиракових антибіотиків, так і нових штамів, які б володіли більш високим рівнем антибіотичної продуктивності.

Висока вартість цих препаратів зумовлена порівняно низькою антибіотичною активністю штамів-продуцентів та їх здатністю синтезувати складні суміші кінцевих продуктів, з яких лише один або два мають терапевтичну цінність.

Підвищений рівень біосинтезу антибіотиків може залежати, як від генів, що відповідають за синтез, так і від генів, що забезпечують стійкість до власного та інших антибіотиків. Особливий інтерес викликають мутації стійкості до антибіотиків, які впливають на процеси транскрипції, трансляції, транспорту метаболітів та морфогенез актиноміцетів (аміноглікозиди, рифампіцин, макроліди).

Дослідили спектр стійкості штаму S. sioyaensis Lv81 до антибіотиків з різним механізмом дії.

Дослідили вплив рифампіцину на життєздатність штаму S. sioyaensis Lv81.

Отримали і проаналізували спонтанні та індуковані rifr-мутанти штаму S. sioyaensis Lv81.

Дослідили зміни антибіотичної активності спонтанних rifr-мутантів S. sioyaensis Lv81.

Список використаної літератури

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика: Мир. 1987. с.7-71.

. Громико О., Кириченко Н., Федоренко В. Мутанти Streptomyces nogalaster ІМЕТ 43360 з підвищеним рівнем синтезу протипухлинного антибіотика ногаламіцину // Вісник Львів. ун-ту, сер. біол. 2009. Вип.35. С.121-127.

. Дубицька Л., Заворотна С., Осташ Б., Громико О., Басілія Л., Федоренко В. Характеристика ознак стійкості до антибіотиків у продуцентів протипухлинних антибіотиків Streptomyces globisporus 1912, Streptomyces peucetius ATCC 29050 та Streptomyces peucetius subsp. caesius ATCC 27952 // Вісник Львів. ун-ту, сер. біол. 2000. Вип.25. С.49-60.

. Инге-Вечтомов С.Г. Генетика с основами селекции: М.: Высш. шк., 1989. С.290-369.

. Федоренко В., Осташ Б., Гончар., Ребець. Великий практикум з генетики, генетичної інженерії та аналітичної біотехнології мікроорганізмів: Львів: Видавн. центр. ЛНУ ім І. Франка. 2010. С.13-87.

. Bagley M., Dale J., Merritt E., Xin Xiong. Thiopeptide Antibiotics // Chem. Rev. 2005. 405. P. 685-714.

. Carata E., Peano C., Tredici S., Ferrari F., Tala A., Corti G., Bicciato S., Bellis G., Alifano P. Phenotypes and gene expression profiles of Saccharopolyspora erythraea rifampicin-resistant (rif) mutants affected in erythromycin production // Microbial Cell Factories. 2009. P. 1-15.

. Hopwood D. Forty years of genetics with Streptomyces: from in vivо through in vitro to in silico // Microbiology. 2009. 145. P. 2183-2202.

. Hu H., Zhang Q., Ochi K. Activation of Antibiotic Biosynthesis by Specified Mutations in theGene (Encoding the RNA Polymerase β Subunit) of Streptomyces lividans // Journal of Bacteriology. 2002. Vol. 184, No. 14. P. 3984-3991.

. Hesketh A., Sun J., Bibb M. Induction of ppGpp synthesis in Streptomyces coelicolor A3(2) grown under conditions of nutritional sufficiency elicits actII-ORF4 transcription and actinorhodin biosynthesis // Molecular Microbiology. 2001. 39(1). P.136-144.

. Lai C., Xu J., Tozawa Y., Okamoto-Hosoya Y., Yao X., and Ochi K. Genetic and physiological characterization of rpoB mutations that activate antibiotic production in Streptomyces lividans // Microbiology. 2008. 148. P. 3365-3373.

. Liao R., Duan L., Lei C., Pan H., Ding Y., Zhang Q., Chen D., Shen B., Yu Y., Liu W. Thiopeptide Biosynthesis Featuring Ribosomally Synthesized Precursor Peptides and Conserved Posttranslational Modifications // Chembiol. 2009. 16. P. 141-147.

. Myronovskyy M., Ostash B., Ostash I.,Fedorenko V. A Gene Cloning System for the Siomycin Producer Streptomyces sioyaensis NRRL - B5408 // Folia Microbiol. 2009. 54 (2). P.91-96.

. Ochi K. From Microbial Differentiation to Ribosome Engineering // Biotechnol. Biochem. 2009. 71 (6). P. 1373-1386.

. Shima J., Hesketh A., Okamoto S., Kavamoto S., Ochi K. Induction of Actinorhodin by rpsL mutation That Confer Streptomycin Resistance in Streptomyces lividans and Streptomyces coelicolor A(3)2 // Journal of Bacteriology. 1996. Vol. 178, No. 24. P. 7276-7286.

. Tamehiro N., Hosaka T., Jun Xou et al. Innovative Approach for Improvement of Antibiotic Overproducing Industrial Strain of Streptomyces albus // Applied and Environmental. Microbiology. 2003. Vol. 69. № 11. P. 6412-6417.

. Wakisaka Y., Nagasaki T., Minato H. Fermentative preparation of S35-Siomycin, a sulfur containing peptide antibiotic // The journal of antibiotics. 1973. P. 104-106.

. Xu J., Tozawa Y., Lai C., Hayashi H., Ochi K. A rifampicin resistance mutation in the rpoB gene confers ppGpp-independent antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2) // Mol Genet Genomics. 2010. 268. P. 179-189.

. Yagi S., Kitai S., Kimura T. Oxidation of elementalsulfur to Thiosulfate by Streptomyces // Applied Microbiology. 1971. Vol. 22. No. 2 P.157-159.

. Yagi S., Kitai S., Kimura T. Stimulative Effect of Elemental Sulfur on Siomycin Production by Streptomyces sioyaensis // Applied Microbiology. 1971. Vol. 22. No. 2 P.153-156.