

candidiasis – 25%, the association of bacterial vaginosis with nonspecific vaginitis 3%. At dysbiotic disturbances of microflora of urogenital tract in high concentrations representatives of *Mobiluncus spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginalis*, *Enterobacteriaceae spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Spp.*, *Velionella spp.*, *Candida spp.* The main causes of the above dysbiotic disorders in these age groups are associated with endocrine disorders, stress, allergies, climate change, changes in local and general immune status (decreased circulating immune complexes, decreased Ig A, increased Ig G), unsystematic antibacterial therapy and reception hormonal drugs, contraceptive use, inflammatory diseases of the female genital organs, frequent change of sexual partners, surgical and diagnostic interventions, dysfunction and microbial status of the intestine.

Key words: PCR, urinary tract, dysbiosis, reproductive age.

Рецензент – проф. Небесна З. М.
Стаття надійшла 09.10.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-4-158-253-259

УДК 57:577.152.34:577.151.5:579:579.6

Погорелова А. М., Соколова І. Є., Виноградова К. О., Гаврилюк В. Г., Скляр Т. В.

АНАЛІЗ СКЛАДУ ФЕРМЕНТІВ ГРУНТОВИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ

Дніпровський національний університет (м. Дніпро)

pogorelovaanet@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота виконана в рамках ініціативної теми «Біологічні основи функціонування мікробіоценозів навколишнього середовища та організму людини», № державної реєстрації 0119U100097.

Вступ. Стрептоміцети вже давно привертають до себе увагу дослідників у галузях промислової мікробіології, біотехнології та генної інженерії як продуценти різноманітних корисних речовин. Зараз майже 17 % біологічно активних вторинних метаболітів мікроорганізмів (близько 7600 із 43000 відомих) виділено саме із стрептоміцетів. Їх відмінною особливістю є здатність до синтезу амінокислот та їх похідних, екстрацелюлярних ензимів, антибіотиків, авермектинів, біоінсектицидів, стимуляторів росту, вітамінів, пігментів, ароматичних сполук, лактонів – від простих восьмичленних до різних конденсованих макролактонів [1,2].

В наш час продукти біосинтезу стрептоміцетів застосовуються в різних галузях: у сільському господарстві – для лікування і профілактики бактеріальних і грибкових інфекцій, як стимулятори росту і домішки у корм тварин тощо; у харчовій промисловості – при консервуванні харчових продуктів з максимальним збереженням поживних речовин; у наукових дослідженнях – для інгібування певних етапів біохімічних перетворень, руйнування клітин з метою виділення субклітинних структур, при культивуванні вірусів, у генетичних дослідженнях тощо [1,3,4,5].

Завдяки лабільності ферментативного апарату, представники роду *Streptomyces* легко пристосовуються до мінливих умов середовища, а висока антагоністична активність дозволяє їм пригнічувати життєдіяльність інших бактерій. Вони здатні мінералізувати стійкі і важкодоступні для інших мікроорганізмів органічні речовини, такі як хітин, целюлоза, геміцелюлоза, лігнін, водний гумус, фенольні сполуки, клітинні стінки бактерій і грибів [6].

Одними з головних сполук, що синтезують стрептоміцети, є ферменти, в тому числі гідролітичні, зокрема протеїнази, амілази, ліпази, целюлази, ДНК-ази, літичні ензими та інші. Літичні ферменти, за дією на субстрат, можна розділити на бактеріолітичні, міко- і дріжджелітичні. Ензими, що активно лізують

гриби та дріжджі, часто менш активно діють на бактеріальні клітинні стінки, і навпаки [7].

Лізис бактерій під дією літичних ферментів здійснюється шляхом гідролізу певних зв'язків у клітинній стінці, що приводить до загибелі клітин. Бактеріолітичні ензими поділяють на три основні групи: глікозидази, амідази та ендopeптідази. Перша група – глікозидази – представлена двома ферментами – β -1,4-N-ацетилмурамідазою і β -1,4-N-глюкозамінідазою. Фермент β -1,4-N-ацетилмурамідаса (лізоцим ацетилмурамової кислоти та 4-им атомом вуглецю N-ацетилглюкозаміну в молекулах пептидоглікану. Фермент β -1,4-N-глюкозамінідаза руйнує зв'язок між 1-им атомом вуглецю N-ацетилглюкозаміну і 4-им атомом N-ацетилмурамової) гідролізує β -1,4-глікозидний зв'язок між 1-им вуглецевим атомом N-кислоти [8]. Глікозидази виявляють як пряму літичну дію, так і діють у комплексі з іншими літичними ферментами, а також беруть участь у вуглецевому метаболізмі продуцента. До складу літичних ферментів входить також N-ацетилмурамід-L-аланіламідаса (амідаза), що розщеплює зв'язок між мурамовою кислотою полісахариду і пептидною частиною пептидоглікану [9]. Ще однією групою літичних ферментів є ендopeптідази, які гідролізують пептидні зв'язки в пептидоглікані бактерій [10]. Виявлено декілька різних за субстратною специфічністю ендopeптідаз – одні розщеплюють зв'язок гліцил-гліцин в перехресно-зв'язуючих містках, інші – зв'язок гліцил-аланін тощо. Встановлено, що саме присутність ендopeптідаз у ферментних комплексах продуцентів *S. griseus* 11-84, *Bacillus sp.* 739 та *Lysobacter sp.* XL1 визначає повне руйнування клітинної стінки бактерій [11].

Окрім специфічних ендopeптідаз стрептоміцети синтезують також протеїнази з більш широким спектром дії. Вони здатні гідролізувати безліч амідів і складних ефірів, включаючи більшість специфічних субстратів пепсину, трипсину, хімотрипсину, папаїну, катепсину С, карбоксипептідази, амінотрипептідази, гліцил-лейциндипептідази, імінодипептідази, а також пептиди з включенням D-амінокислот [12]. Найбільш активними продуцентами протеїназ є такі види стрептоміцетів, як *Streptomyces*

clavuligenus, *S. griseus*, *S. rimosus*, *S. thermoviolaceus*, *S. thermovulgaris*, *S. fradiae* [13,14].

Значний біосинтетичний потенціал та неймовірна гетерогенність стрептоміцетів визначають актуальність пошуку нових продуцентів та поглиблене вивчення відомих культур [13,15,16].

Метою роботи було проведення аналізу активності ферментів у штамів стрептоміцетів, виділених з ґрунтів Дніпропетровської області.

В завдання роботи входили: визначення складу ферментів у культуральній рідині штамів стрептоміцетів, виділених з ґрунту, і порівняння їх активностей зі штамми *Streptomyces recifensis*, отриманими на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології ДНУ ім. О. Гончара; фракціонування білкових комплексів стрептоміцетів шляхом гель-фільтрації на сефадексі G-75 та порівняння їх літичних активностей.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктами досліджень були: штами стрептоміцетів, нещодавно виділені з ґрунту: *Streptomyces sp.* 31 і 35; селекціоновані варіанти *S. recifensis var. lyticus*: 2P-15 (рифампіцинстійкий), П-29 (протопластований), 2.2, 5.2 і 6.2 (трансформовані фрагментами ДНК *S. aureus*); продуцент авермектинів *Streptomyces avermitilis* AC-2179.

Вирощування стрептоміцетів спочатку здійснювали на агаризованих середовищах Гаузе і Чапека, а потім на рідкому ферментаційному середовищі наступного складу (у г/л): соєве борошно – 6, CaCO₃ – 4,2; макро- та мікроелементи (у мл/л): 10 % розчин CaCl₂ – 2; 0,5% FeSO₄ – 1,1; 5 % MnCl₂ – 0,1; 0,02 % ZnSO₄ – 0,1; 5,6 % MgCl₂ – 1; 9,5 % NH₄NO₃ – 1,6 мл; 2,5% K₂PO₄ – 1,1; 1 н NaOH – 0,6. Після стерилізації додавали 5,9 мл стерильної 20 % глюкози. Стрептоміцети вирощували на ферментативному середовищі у цукрових пробірках з робочим об'ємом 15,0 мл глибинним шляхом на качалці (72 год, 28°C, 220 об/хв). Культуральну рідину охолоджували, відділяли від міцелію і застосовували для визначення ферментативних активностей і отримання препаратів. Зберігали при температурі +4°C або заморожували.

Літичну активність визначали турбідиметричним методом [17]. Як тест-культури (субстрати) використовували суспензії *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Candida lipolytica*. Інкубацію проводили на водяній бані протягом 30 хв при 55°C. Літичну активність оцінювали у % лізису по зменшенню щільності мікробної суспензії в процесі інкубації, а також в Од/мл. За одиницю літичної активності приймали таку кількість ферменту, яка знижувала оптичну щільність бактеріальних суспензій на 0,001 за 1 хв. в 1 мл реакційної суміші при розведенні ферменту, здатному забезпечити лізис на 25-30 %. Питому літичну активність розраховували в Од/мг білку. Білок визначали спектрофотометрично при 280 нм на СФ26 за допомогою калібрувального графіку, побудованого за альбуміном. Вихід літичної та питомої активностей перераховували на загальний об'єм препарату.

Протеолітичну активність визначали за методом Ансона в модифікації Авіженіса та Савіцкайте [18]. До 1 мл розчину ферменту додавали 1мл 2 % розчину казеїну та інкубували 10 хв при 50°C. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл холодної ТХО. Зразки фільтрували для відділення негідролізованого білку і визначали оптичну густину фільтратів при 280 нм на СФ-26.

За одиницю питомої протеолітичної активності приймали таку кількість ферменту, яка за 1 хв утворює неосаджений ТХО продукт, що містить 1 мкМ тирозину, у перерахунку на 1 мг білку.

Амілолітичну активність визначали за класичним методом [19], заснованим на властивості ферменту α-амілази гідролізувати крохмаль. Реакційна суміш містила 1 мл 1,2% розчину крохмалю, 0,6 мл 0,2 М ацетатного буферу (рН 5,5), 0,2 мл 0,5 М розчину NaCl та 0,2 мл розчину ферменту. Інкубували протягом 10 хвилин при 50°C. Реакцію зупиняли додаванням 2 мл 1 М розчину HCl. В контрольні проби фермент вносили після кислоти. Для здійснення колориметричної реакції в градуйовані пробірки вносили по 0,2 мл реакційної суміші, 0,5 мл 1Н HCl та 0,01 М йодного реагенту. Об'єм доводили до 5 мл. Вимірювали оптичну щільність на ФЕК 26 (620 нм). За одиницю амілолітичної активності приймали таку кількість ферменту, яка протягом 30 хв розщеплює 10 мг крохмалю.

Для отримання ферментних препаратів та їх часткового очищення до 100 мл культуральної рідини додавали двохкратний об'єм охолодженого ацетону і витримували протягом 2 годин у морозильній камері при -5°C, після чого відділяли утворений осад в центрифугі K24 (20 хв., 15 тис. об/хв., -10°C). Ацетоніві препарати розчиняли в 5 мл 0,01 М ацетатного буфера з рН 5,5 і зберігали у морозильній камері при -5°C.

Для фракціонування ферментних препаратів застосовували метод гель-фільтрації на сефадексі G-75. Препарат (5 мл) наносили на колонку з робочим об'ємом гелю 40 мл. Елюцію проводили 0,01 М ацетатним буфером (рН 5,5) зі швидкістю 0,5 мл/хв. Фракції збирали по 2 мл і в них визначали вміст білку та ферментативну активність.

Результати дослідження та їх обговорення. Для оцінки і порівняння біосинтетичної активності досліджуваних стрептоміцетів в їх культуральній рідині визначали білок, літичну, протеолітичну та амілолітичну активності. Результати, представлені у **таблиці 1**. Аналіз отриманих даних демонструє відсутність чіткої кореляції між концентраціями білку і рівнем біосинтезу гідролітичних ензимів. Так, *Streptomyces recifensis* 2P-15, який мав один з найнижчих показників білку (0,573 мг/мл), виявився одним з найактивніших продуцентів літичних, протеолітичних та амілолітичних ензимів.

Всі досліджувані стрептоміцети виявляли здатність до лізису клітин *Bacillus subtilis* (**таблиця 1**). Питома літична активність відносно бацил коливалась залежно від продуценту у межах 100-273 Од/мг білку. Низька активність відмічена в диких ґрунтових штамів *Streptomyces sp.* 31 і 35. Найбільші рівні літичної активності були встановлені для *S. recifensis* 2.2 (193 Од/мг), 2P-15 (273 Од/мг) і П-29 (175 Од/мл), причому у варіанта 2P-15 вона була суттєво вищою порівняно з варіантами 2.2 і П-29.

Що стосується *Staphylococcus aureus*, то їх клітинні стінки були більш стійкими до дії літичних ферментів. Половина досліджуваних штамів зовсім не виявили здатності лізувати клітини стафілококів. Проте, варіанти *S. recifensis*, селекціоновані на кафедрі мікробіології, вірусології та біотехнології Дніпровського національного університету, а саме *S. recifensis* 2P-15, П-29, 2.2 і 5.2 продемонстрували доволі високий рівень питомої літичної активності відносно *S. aureus*

– відповідно 317,6; 243,4; 271,8 і 110 Од/мг.

Більшість штамів, здатних лізувати клітини дріжджів *Candida lipolytica*, були представниками селекціонованих варіантів *S. recifensis* 2P-15, П-29, 2.2 та 5.2 з відповідною питомою літичною активністю 30,2; 29,6; 24,7 і 35,6 Од/мг (таблиця 1). Серед диких ґрунтових штамів стрептоміцетів лізис дріжджів було виявлено лише у *Streptomyces sp.* 31, питома літична активність якого склала 32,1 Од/мг білку. Зовсім не проявили дріжджелітичну активність такі продуценти, як *Streptomyces sp.* 35, *S. avermitilis* AC-2179 і *S. recifensis* 6.2.

Більший рівень бактеріолітичної активності варіантів *S. recifensis* порівняно з дикими штамми стрептоміцетів можна пояснити тим, що протягом ряду років проводилась селекція *S. recifensis* та оптимізувались середовища з метою активної синтезу бактеріолізинів.

Дані таблиці 1 свідчать, що серед усіх досліджуваних стрептоміцетів найбільш активним продуцентом протеїназ є рифампіцинстійкий варіант *Streptomyces recifensis* 2P-15. Він мав найбільшу питому протеолітичну активність (17,3 Од/мг $\times 10^{-4}$). Середні показники були відмічені у диких штамів *Streptomyces sp.* 35 і 31, а також у селекціонованих варіантів *S. recifensis* 5.2 і 2.2. Щодо амілолітичної активності, то найбільш активними продуцентами були дикий штам *Streptomyces sp.* 31 і варіанти *S. recifensis* 2P-15 і П-29 з питомою активністю 6,49; 3,88 і 2,94 Од/мг білку відповідно. Середній рівень дії амілаз встановлено для *Streptomyces sp.* 35, *S. recifensis* 2P-15, П-29, 5.2, 2.2. Культури *S. avermitilis* AC-2179 і *S. recifensis* 6.2 мали найменші кількісні показники як протеолітичної, так і амілолітичної активності.

Наступним завданням роботи було проведення порівняльного аналізу білків у ферментних комплексах найбільш перспективних штамів і встановлення наявності в їх складі літичних ферментів. Для цього проводили фракціонування частково очищених ацетонових ферментних препаратів шляхом гель-фільтрації. Ацетонові препарати були отримані із культуральної рідини трьох штамів *S. recifensis*: П-29, 2.2 і 5.2. Ці штами були обрані не випадково. Вони є селекціонованими варіантами вихідного штаму *Streptomyces recifensis var. lyticus* 2435, причому *S. recifensis* П-29 був отриманий шляхом регенерації штучно отриманих протопластів вихідного штаму і тому є найменш генетично зміненим. Варіанти *S. recifensis* 2.2 і 5.2 являють собою рекомбінантні варіанти, створені шляхом трансформації клітин стрептоміцета фрагментами ДНК *S. aureus* і мають суттєві генетичні зміни в геномі, що було підтверджено появою резистентності до ряду антибіотиків [1].

Гель-фільтрацію здійснювали на колонці з сефадексом G-75. Фракції збирали по 2 мл. У фракціях визначали вміст білку спектрофотометричним методом та літичну активність. Як тест-культуру в даному експерименті застосовували клітини *S. aureus*,

Таблиця 1 – Ферментативні активності в культуральній рідині стрептоміцетів

№ 3/п	Штами стрептоміцетів	Концентрація білку, мг/мл	Питома літична активність, Од/мг відносно тест-культур			Питома протеолітична активність, Од/мг $\times 10^{-4}$	Питома амілолітична активність, Од/мг
			<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Candida lipolytica</i>		
1.	<i>Streptomyces recifensis</i> 2P-15	0,573	317,6	273	30,2	17,3	3,88
2.	<i>Streptomyces recifensis</i> П29	0,742	243,4	175	29,6	3,2	2,94
3.	<i>Streptomyces recifensis</i> 2.2	0,863	271,8	193	24,7	5,9	2,31
4.	<i>Streptomyces recifensis</i> 5.2	0,926	110,0	122	35,6	7,3	2,31
5.	<i>Streptomyces recifensis</i> 6.2	0,531	0	157	0	1,8	1,74
6.	<i>Streptomyces avermitilis</i> AC-2179	0,635	0	168	0	0,2	1,64
7.	<i>Streptomyces sp.</i> 31	0,851	0	110	32,1	4,0	6,49
8.	<i>Streptomyces sp.</i> 35	0,999	0	100	0	5,5	2,84

оскільки саме стафілококи, із трьох застосовуваних тест-культур, мають найбільш щільні клітинні стінки, для гідролізу яких потрібна дія одразу декількох груп бактеріо-літичних ферментів, зокрема літичних

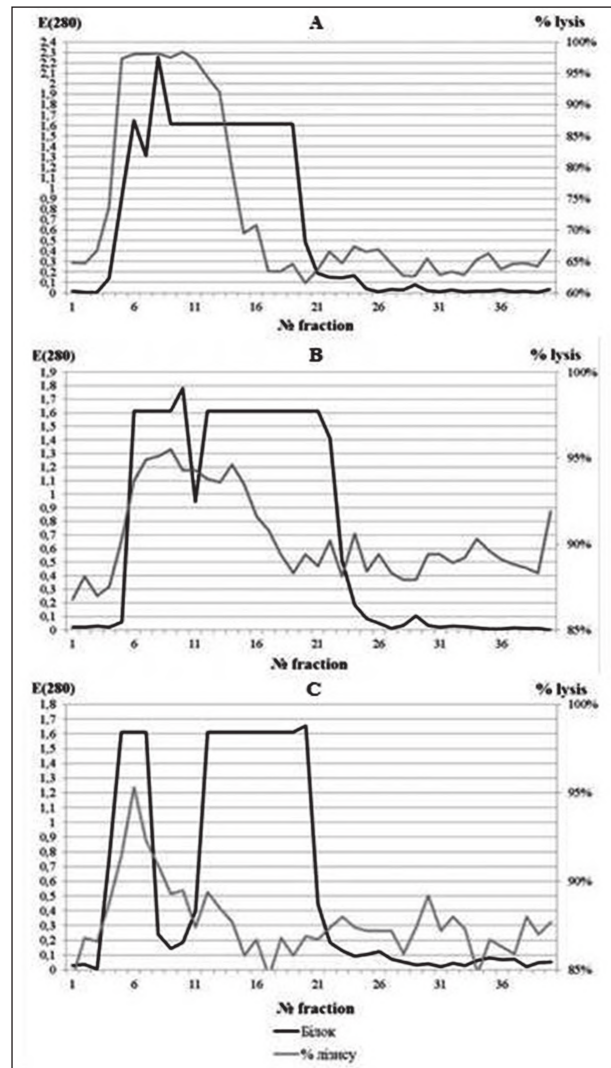


Рисунок 1 - Фракціонування на сефадексі G-75 літичних ферментів штамів *S. recifensis*: П-29 (А), 2.2 (В) і 5.2 (С).

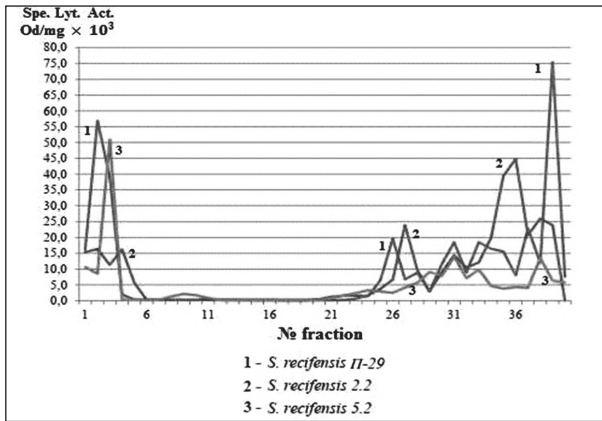


Рисунок 2 – Питома літична активність у фракціях після гелі-фільтрації на сефадексі G-75.

ендопептидаз та глікозидаз. На **рис. 1 (А, В, С)** представлені результати фракціонування ферментних препаратів із культуральної рідини 3-х найбільш активних штамів стрептоміцетів.

Як видно з **рис. 1 А**, білковий профіль штаму *S. recifensis* П-29 після гелі-фільтрації на сефадексі G-75 містить два добре виражених піки і довге плато (фракції 9-19) в області, де відбувається елюція високомолекулярних білків. Саме ці фракції забезпечують найбільш ефективне руйнування клітин стафілококу – відсоток лізису досягає 97-98 %. Починаючи з 20-ої фракції відбувається елюція білків з середньою та низькою молекулярною масою, які теж проявляють стафілолітичну дію і забезпечують лізис на рівні 65-68 %. Проте, як видно з **рис. 2**, питома літична активність (в Од/мг білку) була найбільшою у низькомолекулярних білків.

У білковому профілі штаму *S. recifensis* 2.2 (**рис. 1 В**) має місце коротке плато та один пік (фракція 10) в зоні високомолекулярних білків і довге плато (фракції 12-21) в області білків з середньою молекулярною масою, яке нагадує плато при розподілі білків штаму *S. recifensis* П-29. Літична активність у % лізису в даній області графіку була найвищою і складала 94-96%. В зоні розподілу низькомолекулярних білків кількість білку була незначною, проте з доволі високою літичною дією. Саме у цій зоні (**рис. 2**) було відміче-

Таблиця 2 – Порівняльна характеристика ферментних комплексів варіантів *Streptomyces recifensis* після гелі-фільтрації на сефадексі G-75

Білкові фракції	Показники загального виходу білку та літичної активності	Штами стрептоміцетів		
		<i>S. recifensis</i> П-29	<i>S. recifensis</i> 2.2	<i>S. recifensis</i> 5.2
З високою молекулярною масою (1-20)	Вихід білку, мг	49,0	47,7	42,4
	Середній % лізису	80,7	91,6	88,3
	Вихід літичної активності, Од	11351,2	12902	12423,2
	Вихід питомої активності, Од × 10 ³	2873,8	1616,0	1666,3
З низькою молекулярною масою (21-40)	Вихід білку, мг	2,0	8,4	3,6
	Середній % лізису	64,8	89,2	87,3
	Вихід літичної активності, Од	9128,0	12552,0	12271,2
	Вихід питомої активності, Од × 10 ³	265,5	1134,8	203,8

но найвищі показники питомої літичної активності (26,0–44,8 Од/мг білку × 10³).

При аналізі графіку на **рис. 1 С** помітно, що білковий профіль *S. recifensis* 5.2 був подібний до такого у *S. recifensis* 2.2, а саме, при елюції виявлені два великих піки з переходом у плато в зоні високомолекулярних білків, а також 5 маленьких піків в області низькомолекулярних білків. Однак у *S. recifensis* 5.2 кількість низькомолекулярних білків була вищою, ніж у *S. recifensis* 2.2. Високу активність спостерігали у фракціях 5-8 (відповідно 91, 95, 92 і 91 %). Порівняно з іншими продуцентами *S. recifensis* 5.2 дає меншу кількість фракцій з великим % лізису, тому імовірно він має і меншу кількість бактеріолізинів. Це підтверджується і кривою питомої активності для даного штаму (**рис. 2**).

У зоні розділення білків з низькою молекулярною масою видно, що незважаючи на подібність кривих, кожний штам має певні особливості розподілу літичної активності. Раніше [20,21] було показано, що дана група білків у вихідного штаму *S. recifensis* var. *lyticus* 2435 представлена специфічними літичними ендопептидазами, які здатні руйнувати пептидні мостики в молекулах пептидоглікану бактеріальної клітинної стінки, що і спричиняє лізис.

Кількість ендопептидаз, як видно з **рис. 2**, коливається у різних варіантів *S. recifensis*. Так, у протопластованого варіанту П-29 кількість виявлених ендопептидаз становить 6, а у *S. recifensis* 2.2 і *S. recifensis* 5.2 – по 4. Крім того, останній 6-й пік (у правій частині графіку) при розділенні білків штаму П-29 має найвищу питому активність – 75,3 Од/мг білку × 10³. Варіант *S. recifensis* 2.2 також виявився достатньо активним за рахунок інших піків – 1-го, 3-го і 4-го, які мали відповідні показники активності – 23,9; 44,8 і 26,0 Од/мг білку × 10³.

За результатами, представленими у **таблиці 2**, видно, що у всіх трьох досліджуваних варіантів *S. recifensis* загальний вихід білків з високою молекулярною масою мав близькі значення, хоча у варіанту П-29 цей показник був дещо вищий – 49,0 мг/мл. Що стосується низькомолекулярних білків, переважно представлених літичними ендопептидазами, то їх концентрація у варіанту 2.2 була значно вищою порівняно з іншими стрептоміцетами (8,4 мг/мл проти 2,0 і 3,6 мг/мл – у варіантів П-29 і 5.2).

Порівняльний аналіз виходу літичної активності при фракціонуванні ферментів трьох стрептоміцетів показав, що найбільш активним є варіант 2.2. Він мав найвищий вихід літичної активності, як для білків з високою (12902 Од), так і низькою молекулярною масою (12552 Од). Проте, за показником питомої літичної активності варіант П-29 мав самий високий вихід для білків з високою молекулярною масою (2873,8 Од×10³), що був у 1,7 і 1,8 рази більшим порівняно з варіантами 5.2 і 2.2. Це може свідчити про наявність у варіанту П-29 не тільки протеїназ, що притаманні для всіх варіантів *S. recifensis*, а й інших гідролаз з літичною дією і, зокрема, специфічних глікозидаз. Останні здатні руйнувати

гліканові ланцюги у складі муреїну клітинної стінки стафілококу, чим зумовлюється більш ефективний лізис клітин. Вихід питомої активності літичних ендopeптидаз серед білків з низькою молекулярною масою був найбільшим у варіанта 2.2 і складав 1134,8 Од × 10³, що було у 4,3 і 5,6 рази більше, ніж у варіантів – П-29 і 5.2. Таким чином, можна констатувати, що хоча варіант П-29 мав більш широкий спектр ферментів, але загальна стафілолітична активність була вищою у варіанту *S. recifensis* 2.2 за рахунок більшої кількості специфічних літичних ендopeптидаз.

Висновки. Аналіз отриманих даних демонструє відсутність чіткої кореляції між концентраціями загального білку і рівнем біосинтезу певних ензимів. Всі досліджувані штами розчинювали клітини *B. subtilis* і тільки селекціоновані варіанти (*S. recifensis* 2P-15, П-29, 2.2 і 5.2) спричиняли лізис клітин *S. aureus*. Дріжджелітична активність стрептоміцетів була низькою, а у деяких штамів вона зовсім не виявлялась. Найбільш активним продуцентом протеїназ

був рифампіцистийкий варіант *S. recifensis* 2P-15, а високу амілолітичну активність продемонстрували варіанти *Streptomyces sp.* 31, 2P-15 і П-29. Порівняльний аналіз виходу літичної активності при фракціонуванні ферментів на сефадексі G-75 показав, що найбільш активним є варіант 2.2. Він мав найвищий вихід стафілолітичної активності, як для білків з високою, так і низькою молекулярною масою.

Перспективи подальших досліджень. Наступним етапом дослідження буде оптимізація поживних середовищ, для виходу максимальної кількості ферментів високопродуктивних штамів, а також перевірка впливу ензимів на життєздатність і розвиток рослин та бактерій фітопатогенів. Деякі з досліджуваних штамів можуть слугувати об'єктами для подальшої оптимізації синтезу ферментів та створення штамів-надпродуцентів і отримання на їх основі високоєфективних ферментних препаратів.

Література

1. Babenko LP, Sokolova IYe. Biosyntetychna aktyvnist transformanta *Streptomyces resifensis*. Visnyk DNU. 2009;1(7):10-4. [in Ukrainian].
2. Enany S, editor. Basic Biology and Applications of Actinobacteria. London: IntechOpen Limited; 2018. 122 p. DOI: 10.5772/intechopen.72033
3. Gaydasheva II. Kultivirovanie shtamma *Streptomyces lateritius* 19/97 M: perspektivy sozdaniya biopreparata dlya stimulyatsii rosta i zaschityi rasteniy ot bolezney [avtoreferat]. Moskva: Inst. Iesa im. VN Sukacheva; 2011. 21 s. [in Russian].
4. Jain PK, Jain R, Jain PC. Production of industrially important enzymes by some actinomycetes producing antifungal compounds. Hindustan Antibiot Bull. 2003 Feb-2004 Nov;45-46(1-4):29-33.
5. Kachiprath B, Solomon S, Jayanath G, Philip R. Mangrove microflora as potential source of hydrolytic enzymes for commercial applications. Indian J Geomarine Sci. 2019 May;48(5):678-84.
6. Hopwood DA. *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York: Oxford University Press; 2007. 272 p.
7. Theis T, Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. Cell Mol. Life Sci. 2004 Feb;61(4):437-55. DOI: 10.1007/s00018-003-3231-4
8. Varbanecz LD, Myshak KV, Macelyux OV, Gudzenko OV, Safronova LA, Pryxodko VO. α-amilazy *Bacillus subtilis*. Mikrobiol. zhurn. 2006;68(2):30-8. [in Ukrainian].
9. Uyar F, Baysal Z, Dog M, Ru V. Purification and some characterization of an extracellular α-amylase from a thermotolerant *Bacillus subtilis*. Ann Microbiol. 2003 Jan;53(3):315-22.
10. Guglielmetti S, Zanoni I, Balzaretto S, Miriani M, Taverniti V, De Noni I, et al. Murein Lytic Enzyme TgaA of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 Modulates Dendritic Cell Maturation through Its Cysteine- and Histidine-Dependent Amidohydrolase/Peptidase (CHAP) Amidase Domain. Appl Environ Microbiol. 2014 Sep;80(17):5170-7. DOI: 10.1128/AEM.00761-14
11. Aktuganov GE, Galimzyanova NF, Melentev AI, Kuzmina LYu. Vnekletochnyye gidrolazyi shtamma *Bacillus sp.* 739 i ih uchastie v lizise kletochnykh stenov mikromitsetov. Mikrobiologiya. 2007;76(4):471-9. [in Russian].
12. Yugina NA, Habibrahmanova AI, Mihaylova EO, Shulaev MV. Proteoliticheskaya aktivnost mikroorganizmov, vydelennykh iz aktivnogo ila ochistnykh sooruzheniy MUP «Vodokanal» g. Kazani. Vestnik Kazan. teh-go un-ta. 2015;18(19):279-81. [in Russian].
13. Abdelwahed NAM, Danial NE, El-Ahmady El-Naggar N, Mohamed AA. Optimization of alkaline protease production by *Streptomyces ambofaciens* in free and immobilized form. Am J Biochem Biotechnol. 2013 Dec 28;10(1):1-13. DOI: 10.3844/ajbbsp.2014.1.13
14. Shaikh M, Shafique M, Naz S, Jabeen N, Nawaz H, Khan Z, et al. *Streptomyces sp.* MM-3 from rhizosphere of *Psidium Guajava*: A potential candidate for protease with dehairing properties. Pak J Bot. 2018;51(2):735-742.
15. Akhtar N, Mahmud ASM, Khan MS, Taznin T, Haque ME, Sultana S. Effects of Cultural Conditions on the Production of Extracellular Protease by *Streptomyces albolongus* and *Streptomyces aburaviensis*. Enzyme Engineering. 2013 Jan;2(2):10-5. DOI: 10.4172/2329-6674.1000110
16. Jayasree D, Tadikamal S, Subba Rao CH, Venkateshwar Rao J, Narasu ML. Enhancement of alkaline protease production isolated from *Streptomyces pulveraceus* using response surface methodology. Int J Pharm Pharm Sci. 2012 Jan;4(3):226-31.
17. Karpenko OV. Naukovi zasady stvorenniya biotekhnologiy poverkhnivoaktyvnykh rehovyn z polifunkcionalnyimi vlastyvostyamy [avtoreferat]. Kyiv: Nacz. kn-t kharch. tekhn; 2015. 44 s. [in Ukrainian].
18. Avizhenis VYu, Savitskayte IM. Nekotorye svoystva proteoliticheskikh fermentov preparatov. Trudy AN Lit. SSSR ser. V. 1969;2(49):181-91. [in Russian].
19. Dason R, Elliot D, Elliot U, Dzhons K. Spravochnik biohimika. Moskva: Mir; 1991. 544 s. [in Russian].
20. Sokolova IYe, Babenko YuS. Vyidelenie i ochistka liticheskikh proteinaz iz *Streptomyces recifensis* var. lyticus 2435. Prikl. biohim. i mikrobiologiya. 1991;27(1):53-60. [in Russian].
21. Sokolova IE, Kylochek TP, Vinnikov AI. A biosynthesis activity of soil streptomycete. Mikrob. zhurnal. 2004;66(6):10-7.

АНАЛІЗ СКЛАДУ ФЕРМЕНТІВ ҐРУНТОВИХ СТРЕПТОМІЦЕТІВ

Погорелова А. М., Соколова І. Є., Виноградова К. О., Гаврилюк В. Г., Скляр Т. В.

Резюме. Стрептоміцети вже давно привертають до себе увагу дослідників у галузях промислової мікробіології, біотехнології та генної інженерії як продуценти різноманітних корисних речовин. Зараз майже 17 % біологічно активних вторинних метаболітів мікроорганізмів (близько 7600 із 43000 відомих) виділено саме із стрептоміцетів.

Одними з головних сполук, що синтезують стрептоміцети, є ферменти, в тому числі гідролітичні, зокрема протеїнази, амілази, ліпази, целюлази, ДНК-ази, літичні ензими та інші. Літичні ферменти, за дією на субстрат, можна розділити на бактеріолітичні, міко- і дріжджелітичні. Завдяки лабільності ферментативного апарату представники роду *Streptomyces* мають високу антагоністичну активність, що пригнічує життєдіяльність інших бактерій і грибів.

Значний біосинтетичний потенціал та висока гетерогенність стрептоміцетів визначають актуальність пошуку нових продуцентів та поглиблене вивчення відомих культур.

У роботі представлені результати дослідження ферментативних активностей диких та селекціонованих штамів стрептоміцетів, виділених з ґрунтів Дніпропетровської області. При визначенні складу ферментів у культуральній рідині продуцентів було встановлено, що всі досліджувані штами розчинювали клітини *B. subtilis* і тільки селекціоновані варіанти (*S. recifensis* 2P-15, P-29, 2.2 і 5.2) спричиняли лізис клітин *S. aureus*. Дріжджелітична активність стрептоміцетів була низькою, а у деяких штамів (*Streptomyces* sp. 35, *S. avermitilis* AC-2179 і *S. recifensis* 6.2) вона зовсім не виявлялась. Найбільш активним продуцентом протеїназ був рифампіцинстійкий варіант *S. recifensis* 2P-15. Високу амілолітичну активність продемонстрували варіанти *Streptomyces* sp. 31, 2P-15 і P-29. Порівняльний аналіз виходу літичної активності при фракціонуванні ферментів на сефадексі G-75 показав, що найбільш активним є варіант 2.2. Він мав найвищий вихід стафілолітичної активності, як для білків з високою, так і низькою молекулярною масою.

Ключові слова: стрептоміцети, літичні ферменти, глікозидази, ендопептидази, протеїнази, амілази, гель-фільтрація.

АНАЛИЗ СОСТАВА ФЕРМЕНТОВ ПОЧВЕННЫХ СТРЕПТОМИЦЕТОВ

Погорелова А. Н., Соколова И. Е., Виноградова К. О., Гаврилюк В. Г., Склад Т. В.

Резюме. Стрептомицеты уже давно привлекают к себе внимание исследователей в области промышленной микробиологии, биотехнологии и генной инженерии как продуценты различных полезных веществ. Сейчас почти 17 % биологически активных вторичных метаболитов микроорганизмов (приблизительно 7600 из 43000 известных) выделено именно из стрептомицетов.

Одними из главных соединений, которые синтезируются стрептомицетами, являются ферменты, в том числе гидролитические – протеиназы, амилазы, липазы, целлюлазы, ДНК-азы, литические энзимы и др. Литические ферменты по действию на субстрат можно разделить на бактериолитические, мико- и дрожжелитические. Благодаря лабильности ферментативного аппарата представители рода *Streptomyces* имеют высокую антагонистическую активность, которая угнетает жизнедеятельность других бактерий и грибов.

Значительный биосинтетический потенциал и высокая гетерогенность стрептомицетов определяют актуальность поиска новых продуцентов и углубленное изучение известных культур.

В работе представлены результаты исследования ферментативных активностей диких и селекционированных штаммов стрептомицетов, выделенных из почв Днепропетровской области. При определении состава ферментов в культуральной жидкости продуцентов было установлено, что все исследуемые штаммы растворяли клетки *B. subtilis* и только селекционированные варианты (*S. recifensis* 2P-15, P-29, 2.2 и 5.2) вызывали лизис клеток *S. aureus*. Дрожжелитическая активность стрептомицетов была низкой, а у некоторых штаммов (*Streptomyces* sp. 35, *S. avermitilis* AC-2179 и *S. recifensis* 6.2) она совсем не проявлялась. Наиболее активным продуцентом протеиназ был рифампициноустойчивый вариант *S. recifensis* 2P-15. Высокую амилолитическую активность продемонстрировали варианты *Streptomyces* sp. 31, 2P-15 и P-29. Сравнительный анализ выхода литической активности при фракционировании ферментов на сефадексе G-75 показал, что наиболее активным является вариант 2.2. Он имел наиболее высокий выход стафилолитической активности, как для белков с высокой, так и с низкой молекулярной массой.

Ключевые слова: стрептомицеты, литические ферменты, глікозидази, ендопептидази, протеїнази, амілази, гель-фільтрація.

COMPOSITION ANALYSIS OF SOIL STREPTOMYCETES ENZYMES

Pogorelova A. M., Sokolova I. Ye., Vinogradova K. O., Gavrilyuk V. G., Sklyar T. V.

Abstract. Streptomycetes have for a long time attracted attention of researchers in the fields of industrial microbiology, biotechnology and genetic engineering as producers of various nutrients. At present, almost 17 % of the biologically active of microbial secondary metabolites (about 7600 of the 43000 known) are isolated from streptomycetes.

Nowadays, the products of streptomycete biosynthesis are used in various fields: in agriculture – for the treatment and prevention of bacterial and fungal infections, as growth stimulators and additives in animal feed, etc.; in the food industry – at canning of foodstuff with the maximum preservation of nutrients; in scientific research – to inhibit certain stages of biochemical transformations, cell destruction in order to isolate subcellular structures, in the cultivation of viruses, in genetic research, etc.

Some of the main compounds that synthesize streptomycetes are enzymes, including hydrolytic, in particular proteinases, amylase, lipase, cellulase, DNAses, lytic enzymes and others. Lytic enzymes, by acting on the substrate, can be divided into bacteriolytic, myco- and yeast-lytic. Due to the lability of the enzymatic apparatus, members of the genus *Streptomyces* have a high antagonistic activity, which suppress the activity of other bacteria and fungi.

Significant biosynthetic potential and incredible heterogeneity of streptomycetes determine the relevance of search for new producers and in-depth study of known microorganisms.

Purpose: to determine the composition of enzymes in the culture liquid of strains; fractionation of protein complexes by gel filtration on Sephadex G-75 and comparison of their lytic activities.

When determining the composition of enzymes in the culture fluid of the producers, it was found that all studied strains dissolved *B. subtilis* cells and only selected variants (*S. recifensis* 2P-15, P-29, 2.2 and 5.2) caused lysis of *S. aureus* cells. The yeast-lytic activity of streptomycetes was low, and in some strains (*Streptomyces* sp. 35, *S. avermitilis* AC-2179 and *S. recifensis* 6.2) it was not detected at all. The most active producer of proteinases was the rifampicin-resistant variant of *S. recifensis* 2P-15, and high amylolytic activity was demonstrated by variants of *Streptomyces* sp. 31, 2P-15 and P-29. Comparative analysis of lytic activity in the fractionation of enzymes on Sephadex G-75 showed that the most active is variant 2.2. It had the highest yield of staphylolytic activity for both high and low molecular weight proteins.

Conclusions. Studies indicate a fairly high heterogeneity of the composition of enzyme complexes produced by streptomycetes. However, apparently, there are basic sets of genes encoding the most needful groups of enzymes, among which lytic enzymes, proteinases and amylase play an important role in the manifestation of antagonistic activity and food needs. Therefore, some of the studied strains can be used as objects for further optimization of enzyme synthesis, creation of overproducing strains and obtaining on their basis highly effective enzyme preparations.

Key words: streptomycetes, lytic enzymes, glycosidases, endopeptidases, proteinases, amylases, gel filtration.

Рецензент – проф. Небесна З. М.
Стаття надійшла 22.10.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-4-158-259-263

УДК 579.61+616-008.87/-001.4+616.036.8/615.281.9

¹Поточилова В., ¹Руднева К., ²Покас О., ²Вишнякова Г.

ЧУТЛИВІСТЬ ДО АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ ТА ФЕНОТИПОВЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФАКТОРІВ РЕЗИСТЕНТНОСТІ У ШТАМІВ НЕФЕРМЕНТУЮЧИХ ГРАМ-НЕГАТИВНИХ БАКТЕРІЙ – ЗБУДНИКІВ РАНОВИХ ІНФЕКЦІЙ

¹Комунальне неприбуткове підприємство «Київська обласна клінічна лікарня» (м. Київ)

²ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В. Громашевського НАМН України» (м. Київ)

vika.ptch@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом НДР «Вивчення біологічних властивостей музейних та сучасних штамів умовно-патогенних мікроорганізмів – збудників ранових інфекцій», № державної реєстрації 0119U0020141.

Вступ. Інфікування рани у хворих відбувається найчастіше умовно патогенними мікроорганізмами, які володіють стійкістю до різних груп антибіотиків [1-3]. Резистентність основних збудників до найбільш часто вживаних антибактеріальних препаратів може досягати 70-100% [4]. Видовий спектр збудників інфекційних ускладнень і їх антибіотико-чутливість залежать від кліматичних і регіональних особливостей, від антибактеріальних препаратів, які застосовуються у відділеннях [5]. У дослідженні, виконаному в госпіталі на південному заході Нігерії, провідними збудниками ранової інфекції виявилися *P. aeruginosa* і *Proteus mirabilis*, частка яких становила 53,6 і 10,7%, відповідно [6]. Ретроспективний аналіз, проведений за дванадцятирічний період в опіковому центрі Шанхая, показав, що частіше зустрічалися *Staphylococcus spp.* (38,2%), *A. baumannii* (16,2%), *P. aeruginosa* (10,4%) [7]. Ретроспективний аналіз видового складу мікроорганізмів, виділених від пацієнтів з ранами, які перебували у відділенні інтенсивної терапії в США штату Луїзіана показав, що провідними збудниками інфекційних ускладнень у хворих виявилися *P. aeruginosa* (26,2%), *S. aureus* (11,5%), *Candida albicans* (7,0%) [8].

Провідними збудниками ранових інфекцій в країнах Європи та СНД є представники роду *Staphylococcus*, неферментуючі Грам-негативні бактерії (НФГНБ) – *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, та ентеробактерії – *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* [9-16]. Чисельне співвідношення мікроорганізмів варіює між різними стаціонарами, проте загальним трендом останніх років в усіх країнах світу є значне зростання частки серед збудників ранових інфекцій Грам-негативних бактерій, що часто проявляють множинну резистентність до антибіотиків [17-23].

Грамнегативні неферментуючі бактерії, такі як *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, залишаються найбільш

значущими збудниками нозокоміальних інфекцій [24,25,26]. *Acinetobacter* має низьку природну чутливість до більшості бета-лактамних антибіотиків, включаючи пеніциліни та цефалоспорины, а *Pseudomonas* – природну резистентність до інгібітор захищених ампіцилінів, цефалоспоринів, тайгецикліну, крім того володіє надзвичайною здатністю набувати резистентність до антибіотиків всіх відомих класів [26]. В зв'язку з цим для лікування інфекцій, спричинених даними збудниками, зазвичай використовують карбапенеми. Однак, в теперішній час одна з найбільш значущих проблем терапії інфекцій є глобальний ріст стійкості до даної групи препаратів, пов'язаний з розповсюдженням штамів, продукуючих метало-бета-лактамази [26].

Мета дослідження. Вивчення видового складу збудників ранових інфекцій у хворих хірургічного профілю, визначення фенотипів резистентності та чутливості до антибіотиків НФГНБ.

Об'єкт і методи дослідження. Об'єктами досліджень були 103 штами умовно-патогенних мікроорганізмів, виділених з ран пацієнтів, які перебували на лікуванні у хірургічному відділенні КНП КОР «Київська обласна клінічна лікарня».

Посів біологічного матеріалу здійснювали на селективні та диференційно-діагностичні поживні середовища: 5% кров'яний агар, середовище Ендо, жовточно-сольовий агар, ентерококагар, середовище Сабуро, цукровий бульйон. Посів здійснювали кількісним методом секторного посіву за Голдом [27]. Ідентифікацію виділених мікроорганізмів проводили до виду і типу загально прийнятими методами [28]. У деяких випадках для остаточної ідентифікації ентеробактерій та НФГНБ використовували API 20 E та API 20 NE (*BioMerieux*, Франція), або з використанням мікробіологічного аналізатора VITEK 2 CompactSystem виробництва *BioMerieux*, Франція.

Вміст умовно патогенних мікроорганізмів (УПМ) у досліджуваному матеріалі визначали кількістю колонієутворюючих одиниць в 1 г (КУО/г) або в 1 мл біологічного матеріалу. Критерієм діагностичної значущості для УПМ вважали 10⁵ та вище КУО в 1 мл (г) матеріалу.