

8. Laughlin, R. D. Needle Temperature measurement by Infrared Pyrometry [Text] / R. D. Laughlin // Textile Research Journal. — 1963. — Vol. 33, № 1. — P. 35–39. doi:10.1177/004051756303300105
9. Moeller, F. Um die Hitzebarriere bei der Nahmaschinen [Text] / F. Moeller // Deutsche Nahmaschinen-Zeitung. — 1964. — Vol. 85, № 10. — P. 16–17.
10. Mattes, M. Die Abhandigkeit der Scheuerfestigkeit von der Drehung der Gespinste [Text] / M. Mattes, A. Keworkian // Melliland Textilberichte. — 1943. — № 24. — P. 56–64.
11. Nemeth, E. Prufung der Scheuerbestandigkeit von Nahzwirnen [Text] / Endre Nemeth // Faserforschung und Textiltechnik. — 1962. — Vol. 13, № 8. — P. 364–369.
12. Nestler, R. Fadenzug kraftuntersuchungen an Industrie-Nahmaschinen [Text] / R. Nestler, R. Brihtswein // Bekleidung und Maschinwaren. — 1966. — № 2. — P. 3–7.
13. Smith, J. C. Stress-Strain Relationships in Yarns Subjected to Rapid Impact Loading: Part VIII: Shock Waves, Limiting Breaking Velocities, and Critical Velocities [Text] / Jack C. Smith, Josephine M. Blandford, Kathryn M. Towne // Textile Research Journal January. — 1962. — Vol. 32, № 1. — P. 67–76. doi:10.1177/004051756203200109
14. Stein, W. Fadenbruche an Idustrienahmaschinen [Text] / W. Stein // Zeitschrift ges. Textilindustrie. — 1968. — Vol. 70, № 12. — P. 875–880.
15. Rormarionowski, W. Rdzeniowa Przedza [Text] / Wladislaw Rormarionowski // Przegląd włokien. — 1966. — Vol. 20, № 1. — P. 27.
16. Winkler, F. Scheuerprufund an Einzelfasern [Text] / F. Winkler // Faserforschung und Textiltechnik. — 1956. — № 7. — P. 16–18.
17. Wieszlak, W. Badania Warunbow tworzenia sie petli w maszynie szuacych [Text] / W. Wieszlak, W. Nowacki // Odzież. — 1968. — Vol. 19, № 7. — P. 197–205.
18. Михайлова, Н. В. Разработка изолирующей специальной одежды для очистки емкостей от агрессивных сред [Текст]: дис. ... канд. техн. наук: 05.19.04 / Нина Васильевна Михайлова. — Хмельницкий, 2006. — 181 с.

#### ОБОСНОВАНИЕ КРИТЕРИЕВ ОЦЕНКИ РАЗРУШЕНИЯ ОБРАЗЦОВ МАТЕРИАЛА ВЫШИВАЛЬНЫМИ ИГЛАМИ

В работе приведены результаты исследований, связанные с обоснованием критериев оценки разрушения образцов мате-

риала вышивальными иглами № 75; 80; 90 и 100. Для оценки степени разрушения проб использовались такие критерии, как изменение значений разрывных характеристик и коэффициента воздухопроницаемости.

**Ключевые слова:** степень разрушения материала, пленка, вышивальная игла, шаг стежка, критерии оценки.

*Рипка Галина Анатоліївна, старший викладач, заступник завідувача кафедри легкої і харчової промисловості, Східноукраїнський національний університет ім. В. Даля, Северодонецьк, Україна.*

*Мазнев Євген Олександрович, кандидат технічних наук, доцент, завідувач кафедри легкої і харчової промисловості, Східноукраїнський національний університет ім. В. Даля, Северодонецьк, Україна.*

*Мичко Анатолій Андрійович, доктор технічних наук, професор, кафедра легкої і харчової промисловості, Східноукраїнський національний університет ім. В. Даля, Северодонецьк, Україна.*

*Ретка Галина Анатоліївна, старший преподаватель, заместитель заведующего кафедрой легкой и пищевой промышленности, Восточноукраинский национальный университет им. В. Даля, Северодонецк, Украина.*

*Мазнев Евгений Александрович, кандидат технических наук, доцент, заведующий кафедрой легкой и пищевой промышленности, Восточноукраинский национальный университет им. В. Даля, Северодонецк, Украина.*

*Мычко Анатолий Андреевич, доктор технических наук, профессор, кафедра легкой и пищевой промышленности, Восточноукраинский национальный университет им. В. Даля, Северодонецк, Украина.*

*Ripka Galina, Volodymyr Dahl East Ukrainian National University, Severodonetsk, Ukraine.*

*Mazniev Ievgen, Volodymyr Dahl East Ukrainian National University, Severodonetsk, Ukraine.*

*Mychko Anatoly, Volodymyr Dahl East Ukrainian National University, Severodonetsk, Ukraine.*

УДК 575.224.46

DOI: 10.15587/2312-8372.2015.40552

**Громико О. М.,  
Буцяк А. В.,  
Федоренко В. О.,  
Тодосійчук Т. С.**

## ОТРИМАННЯ ВИСОКОАКТИВНИХ СТРЕПТОМІЦИН-РЕЗИСТЕНТНИХ ПРОДУЦЕНТІВ БАКТЕРІОЛІЗИНІВ *STREPTOMYCES ALBUS*

Досліджено та показано доцільність застосування *N*-метил-*N'*-нітро-*N*-нітрозогуанідину (НГ), а також використання мутації стійкості до стрептоміцину в селекції продуцента бактеріолітичного ферментного комплексу *Streptomyces albus* 2435. Встановлено умови мутагенної обробки НГ та концентрація стрептоміцину, що дали змогу отримати мутанти *S. albus* 105 і 107 з підвищеною у 1,6 разів здатністю до синтезу бактеріолізинів.

**Ключові слова:** *Streptomyces albus* 2435, надпродуцент, бактеріолізину, селекція, нітрозогуанідін, стрептоміцин.

### 1. Вступ

Значна частина антимікробних субстанцій, що є сьогодні основною препаратів для медицини, ветеринарії та інших галузей, продукується мікроорганізмами. Тому

продовжуються пошук нових продуцентів бактеріолізинів та роботи з підвищення активності відомих культур.

Традиційні методи селекції мікробних продуцентів біологічно активних речовин лишаються актуальними, оскільки дають змогу отримувати надпродуценти

з високим рівнем синтезу цільових продуктів. Сучасні прийоми відбору і створення високоактивних продуцентів пов'язані з оптимізацією схеми селекції, в якій традиційні методи використовуються у модифікаціях або нових комбінаціях [1].

Очевидно, що об'єктами селекції стають культури, що синтезують продукти, які мають перспективи широкого застосування у різних галузях господарства та промисловості. До таких культур належить штам *Streptomyces albus* 2435 — продуцент бактеріолітичного ферментного комплексу, на основі якого розроблена промислова технологія отримання різних готових форм препаратів-антисептиків.

## 2. Аналіз літературних даних та постановка завдання

Практичне використання будь-якого продуцента передбачає постійну селекційну роботу за підтримки та підвищення його біосинтетичної здатності, яка має загальну тенденцію до зниження внаслідок природної гетерогенності мікробних популяцій. Аналіз сучасних методів та прийомів в селекції мікробних продуцентів біологічно активних речовин свідчить про важливе значення генотипу вихідного штаму для отримання над продуцентів, а також про доцільність багатостадійної обробки культури послідовно різними типами мутагенів [2–4].

Так, використання УФ-випромінювання дало змогу отримати надпродуценти родів *Bacillus* та *Coniothyrium* з підвищеним у 2–10 разів рівнем біосинтезу ферментів [5, 6], ступінчаста обробка УФ-випромінюванням та хімічними мутагенами стала ефективною в селекції продуцентів антибіотиків та ферментів родів *Streptomyces*, *Pseudomonas* та інших [3, 4].

НГ належить до сполук, що алкілюють ДНК-найсильніших з хімічних мутагенів. Мутаген утворює кон'югати з глутатионом ( $\gamma$ -глутамілцистеїнглутіном), що у відновленому стані є нуклеофілом і реагує з електрофілітними сполуками. Реакція НГ з цистеїновим залишком глутатіону призводить до утворення діазометану — високореактивної метилуючої сполуки, яка, власне, й спричиняє мутагенний ефект. Тому НГ широко застосовують у селекції мікробних продуцентів ферментів та антибіотиків, як окремо, так і у комбінаціях з іншими мутагенами та селективними факторами.

Прикладом ступінчатого відбору може слугувати селекція продуцента фермента авермектинового комплексу з застосуванням ультрафіолету та НГ. Відбираючи на кожній ступені варіант, що перевищує по активності вихідний, вдалося в результаті послідовного відбору з застосуванням збагаченого ферментаційного середовища збільшити активність продуцента майже в 20 разів [7]. В селекції продуценту ліпази *Asp. japonicus* штам піддавали дії ультрафіолету,  $\text{HNO}_2$  та НГ. Ліпазна активність найкращих варіантів-мутантів перевищує активність вихідного штаму на 276 % [8].

Надпродуценти промислового фермента альфа-амілази, що є представниками різних родів (*Bacillus licheniformis* та *Alternaria tenuissima*) були отримані за допомогою комбінованого мутагенезу з застосуванням етилметансульфонату та НГ [9], а також ультрафіолету та етилметансульфонату [10].

У селекції продуцента бактеріолітичних ферментів *Streptomyces recifensis* var. *lyticus* були використані про-

топластування та селективний відбір регуляторних мутантів, стійких до рифампіцину [11]. Отримані мутанти мали підвищену у 2,5 рази стафілолітичну активність, але втратили здатність до лізису дріжджових клітин. На основі даних іонообмінної хроматографії встановлено, що в пулі його екстрацелюлярних білків зросла частка літичних протеаз. Генноінженерними методами на основі штаму *S. recifensis* 2R-15 цієї ж культури була створена колекція рекомбінантних штамів, стійких до нових видів антибіотиків. Аналіз біосинтетичної активності рекомбінантів виявив його суттєві відмінності порівняно з вихідним штамом та перерозподіл ферментів комплексу у бік підвищення у 3 рази протеолітичної активності [12].

Не зважаючи на загальні закономірності, отримання надпродуцента певної культури лишається справою тривалого підбору типу та дози мутагену, а також схеми обробки.

Бактеріолітичний ферментний комплекс, продуцентом якого є культура актиноміцета *S. recifensis* var. *lyticus* (реідентифікована як *Streptomyces albus* [13]) містить глікозидази, літичні ендопептидази, мурамідази, протеїнази та амілази, комплексна дія яких призводить до руйнування широкого спектру мікробних клітин [14]. На основі вихідної культури *S. recifensis* var. *lyticus* співавторами даної роботи було селекціоновано ряд штамів, що відрізнялися за рівнем біосинтезу продукту та його бактеріолітичною специфічністю та розроблено промислову технологію отримання антимікробного ферментного препарату Циторецифен [15, 16].

Однак, використання будь-якого продуцента передбачає постійну селекційну роботу з підтримки та підвищення його біосинтетичної здатності, яка має загальну тенденцію до зниження внаслідок природної гетерогенності мікробних популяцій. Зважаючи на практичну цінність вказаної культури та зниження біосинтетичної активності використовуваного штаму, актуальною є робота з отримання нового штаму-продуцента на основі *S. albus*.

## 3. Об'єкт, мета та задачі дослідження

Об'єктом дослідження у роботі був продуцент бактеріолітичного ферментного комплексу *S. albus* 2435, а метою — отримання високоактивного штаму з застосування мутагенів та комбінацій селективних факторів, що раніше не використовували його в селекції — нітрозогуанідину та мутацій стійкості до стрептоміцину.

Для досягнення поставленої мети вирішувалися наступні задачі:

- вивчити вплив N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину на мінливість культури *S. albus* 2435 та її біосинтетичну здатність, визначити дозу мутагену, що призводить до появи мутантів з підвищеною здатністю до синтезу цільового продукту;
- дослідити антибіотикорезистентність культури *S. albus* 2435 та визначити можливість використання мутацій стійкості до стрептоміцину в селекції надпродуцентів.

## 4. Матеріали та методи досліджень впливу нітрозогуанідину та мутацій стійкості до стрептоміцину на мінливість та біосинтетичну активність *S. albus* 2435

4.1. Досліджувані матеріали та обладнання, що використовувалися в експерименті. У роботі як вихідну

культура для селекції використано штам *S. Albus* 2435 — продуцент бактеріолітичного ферментного комплексу з музею кафедри промислової біотехнології Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут».

Як тест-культуру для визначення індексу літичної активності використовували *Sarcina lutea* ATCC 4698, яку вирощували на триптозному агарі. Для визначення літичної активності ферментного комплексу та його готових форм як тест-культуру використовували *Bacillus cereus* ATCC 14579 (добові культури, вирощені на м'ясопептонному агарі (МПА)) із згаданого вище музею. Літичну активність визначали з застосування спектрофотометра КФК-3.

Поживні середовища:

Вівсяне середовище, (г/л): вівсяна крупа — 40,0; агар — 18,0; рН 7,2.

Триптозний агар, (г/л): агар — 10,0; триптон — 5,0; дріжджовий екстракт — 5,0; NaCl — 5,0; глюкоза — 1,0; рН 7,8.

Модифіковане середовище Чапека, (г/л): NaNO<sub>3</sub> — 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 1,0; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 0,5; NaCl — 0,5; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 0,1; CaCO<sub>3</sub> — 3,0; агар — 20; рН 7,8.

Середовище Чапека, агаризоване, (г/л): глюкоза 20,0; NaCl — 0,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 1,0; FeSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 0,1; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 0,5; NaNO<sub>3</sub> — 2,0; CaCO<sub>3</sub> — 3,0; агар — 20,0; рН 7,0.

Середовище для глибинного біосинтезу, (г/л): глюкоза — 6,0; соєве борошно дезодороване — 8,0; NaCl — 14,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×3H<sub>2</sub>O — 2,0; CaCl<sub>2</sub> — 4,5; MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O — 5,8; MnCl<sub>2</sub>×4 H<sub>2</sub>O — 0,04; пропінол Б-400 — 0,014 л; рН 7,8–8,2.

**4.2. Методики отримання мутантів та визначення біосинтетичної активності культури.**

**4.2.1. Метод отримання мутантів з використанням N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ).** Наважку мутагену розчиняли у Три-малеїновому буфері (ТМ-буфер) до концентрації 0,1%. Спорів суспензію *S. albus* 2435 сконцентрували до 1×10<sup>9</sup> клітин/мл в об'ємі 400 мкл. Суспензію розділяли на 4 порції по 100 мкл. В кожну пробірку вносили Три-малеїновий буфер та розчин мутагену так, щоб кінцева концентрація НГ в кожній з трьох пробірок становила 1, 2 та 3 мг/мл. Остання пробірка містила тільки розчин спор в буфері. Суспензію спор струшували протягом 20 хв для кращого проникнення мутагену в клітини. Відмивали дистильованою водою два рази, здійснювали десятикратні розведення і висівали на чашки з вівсяним середовищем. Культивували протягом 4 діб в термостаті при температурі 28 ± 1 °С. Порівнювали кількості колоній, утворених спорами, які вижили після обробки мутагеном, з числом колоній, що виникли із необроблених спор, і визначали відсоток виживання.

**4.2.2. Визначення індексу літичної активності (ІЛА) клонів штаму *S. Albus* 2435.** Мінливість культури вивчали за ознакою бактеріолітичної активності окремих клонів штаму *S. Albus* 2435, що характеризували індексом літичної активності (ІЛА) і визначали як відношення діаметру зони лізису тест — культури в середовищі до діаметру самої колонії. Як джерело органічного живлення в середовище вносили суспензію тест-культури 9×10<sup>9</sup> клітин /мл.

Літичну активність кожного клону оцінювали за здатністю лізувати тест-культуру і характеризували індексом літичної активності (ІЛА), що розраховува-

ли поділом діаметра зони лізису навколо колонії на значення діаметра самої колонії.

Мінливість культури за ознакою ІЛА виражали коефіцієнтом варіації ІЛА:

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 \%,$$

де  $\sigma$  — середнє квадратичне відхилення у виборці;  $\bar{X}$  — середнє арифметичне величини.

Біосинтетичну здатність штамів характеризували також відсотком виникнення при розсіві «плюс»- та «мінус»-варіантів, тобто клонів, величина ІЛА яких відрізняється від середнього значення на дві величини стандартного відхилення:  $|\bar{X} + 2\sigma|$  та  $|\bar{X} - 2\sigma|$ , відповідно.

**4.2.3. Виділення мутантів культури зі зміненою стійкістю до стрептоміцину.** Мутанти, стійкі до стрептоміцину, отримували шляхом висіву суспензії спор *S. Albus* 2435 на середовище Беннета з різними концентраціями антибіотика. Колонії, що виростили на середовищі з антибіотиком, уколком пересівали на матричні чашки і робили повторну перевірку їх резистентності.

Визначення стабільності ознак резистентності виділених варіантів до антибіотика проводили шляхом висіву спор після їхнього зберігання на косяках з антибіотиками та без них, та наступним пересівом репліками на середовища з відповідною концентрацією антибіотика. Штами, які виростили на середовищі з стрептоміцином після трьох пасажів через неселективні умови вважали стрептоміцин — резистентними мутантами.

**4.2.4. Методи вирощування та культивування мікробних культур.** Культуру *S. albus* вирощували на агаризованому середовищі Чапека при температурі 28 ± 1 °С впродовж 7 діб.

Посівний матеріал вирощували на качалках при частоті обертання 200–250 хв<sup>-1</sup>, протягом 2 діб (48 годин) при температурі 28 ± 10 °С у колбах на 250 мл з 50 мл ферментаційного середовища або із рідким середовищем Чапека. Біосинтез проводили у колбах на 750 мл з 150 мл ферментаційного середовища в тих же умовах протягом 3–4 доби (72–96 годин).

Тест-культури *Bacillus cereus*, *Sarcina lutea* вирощували на чашках Петрі на м'ясо-пептонному агарі (МПА) при температурі 37 °С впродовж 1 доби і використовували для приготування клітинних суспензій для визначення літичної активності або для внесення в середовище для визначення індексу літичної активності.

**4.2.5. Культивування продуценту.** Біосинтез продукту проводили у колбах на 750 мл з 150 мл ферментаційного середовища на качалках при частоті обертання 200–250 хв<sup>-1</sup> при температурі 28 ± 1 °С протягом 3–4 доби (72–96 годин). Після завершення біосинтезу культуральну рідину розділяли центрифугуванням (6 тис. хв<sup>-1</sup>, 15 хв), відділяючи біомасу продуценту. Фугат, що містив ферментний комплекс, використовували для аналізу. Літичну активність визначали турбідиметричним методом [16].

## 5. Результати впливу нітрозогоуанідину та мутацій стійкості до стрептоміцину на мінливість та біосинтетичну активність *S. albus* 2435

На першому етапі роботи досліджували вплив НГ на виживання та мінливість бактеріолітичної здатності

*Str. albus* 2435. Бактеріолітичну активність визначали по відношенню до тест-культури *Sarcina lutea*, яка часто використовується в селекції стрептоміцетів та представляє грам-позитивні бактерії, щодо яких виявляється максимальна активність продуцента.

Суспензію спор штаму *S. albus* 2435 обробляли НГ в концентрації 1, 2 та 3 мг/мл протягом 20 хв. Після 20 хв обробки 1 мг/мл НГ виживання знижувалося до 44,3 %. Підвищення концентрації до 2 та 3 мг/мл знижувало відсоток виживання до 31,5 та 22,3 %, відповідно.

З літератури відомо, що НГ індукує високу частоту мутацій у дозах, які знижують виживання до 10–50 % [2, 17, 18]. Тому для отримання мутантів НГ застосовували у всіх досліджених концентраціях, оскільки вони знижують виживання спор *S. albus* 2435 більш, ніж на 50 %. Зміни індексу літичної активності (ІЛА) досліджуваного штаму після обробки НГ в концентрації 1, 2 і 3 мг/мл визначали по відношенню до контролю: за 100 % брали середнє значення (3,5) індексу літичної активності спонтанних (необроблених мутагеном) клонів вихідного штаму (табл. 1).

Серед 228 клонів штаму, отриманих після спонтанного розсіву культури, виявили 4,8 % «плюс»-варіантів (клонів зі значенням ІЛА вищим, ніж середнє, на 2 величини стандартного відхилення) і відсутність «мінус»-варіантів. Середнє значення ІЛА клонів штаму після обробки НГ в концентрації 1 мг/мл підвищувалося на 2 %, а частка «плюс»-варіантів становила 6,9 %.

Використання вищих концентрацій НГ (2,0 і 3,0 мг/мл) суттєво знижувало середнє значення ІЛА.

Таблиця 1

Вплив НГ на характеристики клонів штаму *S. albus* 2435

Показники	Контр-роль	Концентрація НГ, мг/мл		
		1	2	3
Кількість досліджених клонів, <i>N</i>	228	462	171	159
Середнє значення ІЛА, $M \pm m$ , %	100*	102 ± 0,3	60,7 ± 0,2	46,9 ± 0,2
Частка «плюс»-варіантів, %	4,8	6,9	2,3	1,5
Частка «мінус»-варіантів, %	0	2,8	95,7	92,2
Коефіцієнт варіації, <i>CV</i> , %	17,2	24,1	14,5	13,7

**Примітка:**\* — за 100 % брали середнє значення ІЛА спонтанних клонів штаму *S. albus* 2435

Отже, використання НГ в концентрації 1 мг/мл дозволяє підвищити частоту виникнення «плюс»-варіантів та середнє значення ІЛА на 2 %. Цю дозу НГ ми використовували в наступних експериментах для виділення індукованих мутантів *Str. albus* 2435, стійких до стрептоміцину.

На наступному етапі роботи досліджували можливість використання мутацій стійкості *S. albus* 2435 до стрептоміцину як фактору відбору надпродуцентів. Для цього визначали частоту виникнення спонтанних та НГ-індукованих стрептоміцинрезистентних мутантів ( $Str^r$ -мутантів).

У присутності 0,1 мг/мл стрептоміцину в середовищі виживання вихідної культури, а отже виникнення  $Str^r$ -мутантів, становило  $1,6 \times 10^{-4}$  % (табл. 2). Підвищення концентрації антибіотика в середовищі до 0,5 та 1,0 мг/мл знизило виживання на 2 та 3 порядки, а в присутності 2,0 мг/мл стрептоміцину життєздатними були лише  $3,7 \times 10^{-8}$  % спор. Вищі концентрації стрептоміцину виявилися летальними для цього штаму.

Частота виникнення  $Str^r$ -мутантів, індукованих НГ, зростала на два порядки і становила  $6 \times 10^{-4}$  %.

Таблиця 2

Частота виникнення  $Str^r$ -мутантів *S. albus* 2435

Концентрація стрептоміцину, мг/мл	Частота виникнення $Str^r$ -мутантів, %	
	Спонтанні	НГ-індуковані
0,1	$1,6 \times 10^{-4}$	—*
0,5	$2,8 \times 10^{-6}$	$6,0 \times 10^{-4}$
1	$3,0 \times 10^{-7}$	—
2	$3,7 \times 10^{-8}$	—

**Примітка:** \* — не визначали

Аналіз ІЛА 151 клонів розсіву вихідної культури вияв 4,0 % «плюс»-варіантів і відсутність «мінус»-варіантів (табл. 3). Середнє значення індексу літичної активності  $Str^r$ -варіантів зріс у порівнянні з вихідною культурою на 14 %, а частка «плюс»-варіантів збільшилася більш, ніж у два рази.

Середнє значення індексу літичної активності НГ-індукованих  $Str^r$ -варіантів виявилася майже на 30 % вищою, ніж у контролі, та на 14 % порівняно зі спонтанними  $Str^r$ -варіантами. Більше чверті цих мутантів були «плюс»-варіантами. Суттєве зростання частки «плюс»-варіантів та підвищення варіабельності активності вказує на ефективність пошуку високоактивних продуцентів серед стрептоміцин-резистентних клонів.

Таблиця 3

Мінливість  $Str^r$ -мутантів *S. albus* 2435 за ознакою літичної активності

Показники	Контр-роль	$Str^r$ -варіанти	$Str^r$ -НГ-мутанти
Кількість досліджених клонів, <i>N</i>	151	247	243
Середнє значення ІЛА, $M \pm m$ , %	100*	114,4 ± 0,6	128,3 ± 0,9
Частка «плюс»-варіантів, %	4,0	8,5	25,9
Частка «мінус»-варіантів, %	0	0,4	0
Коефіцієнт варіації, <i>CV</i> , %	25,9	25,6	35,5

**Примітка:**\* — за 100 % брали середнє значення ІЛА спонтанних клонів штаму *S. albus* 2435

Аналіз ІЛА «плюс»-варіантів виявив, що клони з найвищою активністю виникали саме серед НГ-індукованих  $Str^r$ -мутантів (табл. 4). Обробка НГ індукувала виникнення значної частини «плюс»-варіантів з ІЛА 4,1–6,0 (29 %). Водночас серед цієї групи  $Str^r$ -мутантів також виникали штами з ІЛА 6,1–8,0 (4 %). Отримані дані доводять ефективність обробки спор *S. Albus* 2435 НГ в концентрації 1 мг/мл перед висівом на середовище з стрептоміцином для наступного відбору надпродуцента бактеріолітичного ферменту.

Виділені НГ-індуковані  $Str^r$ -мутанти розділили за рівнем стійкості до стрептоміцину на три групи (табл. 5): низькорезистентні, які ростуть на середовищі з 5–10 мкг/мл антибіотика (I група); із середнім рівнем резистентності (50–100 мкг/мл — II група) та високорезистентні штами (100–250 мкг/мл — III група).

Більше 78 % НГ-індукованих  $Str^r$ -мутантів штаму *S. Albus* 2435 віднесено до I групи. До II групи увійшло 13,1 % мутантів стійких до концентрації 50–100 мкг/мл

стрептоміцину. Серед досліджуваних мутантів були штами стійкі до 100–250 мкг/мл (8,1 %). У І групі стійкості до стрептоміцину середнє значення індексу літичної активності «плюс»-варіантів було найнижчим (ІЛА 3,4), у порівнянні із мутантами ІІ і ІІІ групи, середнє значення ІЛА яких, становило 4,2 та 5,4 відповідно.

Таблиця 4

Розподіл варіантів штаму *S. albus* 2435 за індексами літичної активності

Варіанти	Кількість «плюс»-варіантів, абсолютні одиниці / %		
	ІЛА 2,1–4,0	ІЛА 4,1–6,0	ІЛА 6,1–8,0
Контроль (вихідна культура)	3/50	3/50	—
Str <sup>r</sup> -мутанти	20/95	1/5	—
НГ-індуковані Strg-мутанти	42/67	18/29	3/4

Таблиця 5

Розподіл НГ-індукованих Str<sup>r</sup>-мутантів *S. albus* 2435 за рівнем стійкості до стрептоміцину

Групи мутантів	Концентрація стрептоміцину, мкг/мл	НГ-індуковані Str <sup>r</sup> -мутанти		
		Кількість	%	Середнє значення ІЛА «плюс»-варіантів
I	5–10	194	78,8	3,4±0,2
II	50–100	32	13,1	4,2±0,2
III	100–250	20	8,1	5,4±0,1
Всього		246	100	4,2±0,2

У групах, які характеризувалися зростанням стійкості до стрептоміцину, спостерігали зростання середнього значення ІЛА. Отже, можна сказати, що між ознакою синтезу бактеріолітичних ферментів і рівнем стійкості до стрептоміцину спостерігається позитивна кореляція. Таким чином, для відбору високоактивних варіантів *S. Albus* 2435 ефективним є використання НГ в концентрації 1 мг/мл з подальшим висівом на середовище з 0,5 мг/мл стрептоміцину та відбір Strg-мутантів, стійких до 100–250 мкг/мл стрептоміцину.

Серед ІІІ групи вказаних мутантів було відібрано два штами-мутанти — *Str. albus* 105 і 107, що були стійкі до 100 мкг/мл стрептоміцину та мали ІЛА 7,1.

Для перевірки рівня біосинтезу бактеріолітичного ферменту відібраними мутантами проводили культивування на рідкому середовищі та порівнювали його з активністю вихідної культури. Штами вирощували у колбах на 750 мл з 150 мл ферментаційного середовища на качалках при частоті обертання 200–250 хв<sup>-1</sup> впродовж 96 годин при температурі 28 ± 1 °С. Потім відділяли біомасу центрифугуванням та використовували фугат для визначення літичної активності. Встановлено, що літична активність отриманих мутантів перевищує таку ж вихідного штаму у 1,6 разів та склала 4,5 тис. од/мл (щодо *Bacillus cereus*).

## 6. Обговорення результатів дослідження впливу нітрозогуанідину та мутацій стійкості до стрептоміцину на мінливість та біосинтетичну активність *S. albus* 2435

Використовуваний у роботі продуцент *S. Albus* 2435 (первісно ідентифікований як *Str. recifensis var. lyticus*)

є виділеним з ґрунту природним штамом актиноміцету, що тривалий час є об'єктом дослідження ряду наукових колективів [11–16]. Практична цінність культури полягає у здатності до синтезу бактеріолітичного ферментного комплексу широкого спектру антимікробної дії, а отже можливості використання у біотехнологічній промисловості для отримання даного продукту. Специфічність ферментного комплексу дає можливість використовувати його у складі антисептичних препаратів для різних галузей — від синтетичних миючих засобів з антисептичною дією до лікарських форм. Саме тому штам став об'єктом селекції та основою для отримання чисельних мутантних штамів з підвищеною біосинтетичною здатністю або зміненою спрямованістю дії цільового продукту [11, 12, 15].

Останнє є можливим завдяки наявності у ферментного комплексу ряду індивідуальних ферментів, сумісна дія яких призводить до руйнування мікробних клітин. Вплив того чи іншого мутагенного фактору в процесі селекції може призводити не лише до підвищення рівня активності культури, а й синтезу окремих ферментів комплексу у інших співвідношеннях. Наслідком такої зміни є може бути як розширення спектру мікробних культур, що здатен руйнувати ферментний препарат, так і часткова втрата таких властивостей [11, 12, 14].

Застосований в даній роботі хімічний мутаген (N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідин) раніше не використовувався в селекції культури, тому важливим було не лише отримати штами з підвищеним синтезом продукту, а й надалі дослідити антимікробний спектр синтезованих відібраними штамми продуктів.

Представлені результати (табл. 1) щодо впливу НГ на біосинтетичну здатність *S. Albus* 2435 свідчать про чітку дозозалежність ефекту підвищення середнього ІЛА, збільшення відсотку плюс-варіантів та коефіцієнта варіації. Так, значне підвищення варіабельності культури (до 24,1 порівняно з 17,2 у контролі) призводить до появи як частки мінус-варіантів, так і варіантів-надсинтетиків.

Досліджені концентрації мутагену чітко визначають концентрацію (1 мг/мл), перевищення якої має негативний ефект та має наслідком зниження всіх цільових характеристик — середнього ІЛА (до 46,9–60,7) та частки плюс-варіантів (до 1,5). Разом з тим практично всі клони культури при обробці її мутагеном у концентраціях (2 та 3 мг/мл) віднесені до мінус-варіантів (92–95 %). Зважаючи на встановлену дозозалежність ефекту, у подальших дослідженнях впливу НГ доцільно буде проаналізувати ефект його мінімальних концентрацій (менше 1 мг/мл) при обробці культури продуцента.

Вивчення антибіотикорезистентності культури *S. Albus* 2435 (табл. 2) дозволило встановити межу концентрації стрептоміцину (> 2 мг/мл), що є летальною для культури. Порівняння антибіотикорезистентності вихідної культури та попередньо обробленої НГ показало значний вплив мутагену на її стійкість. Так, виживання НГ-індукованих мутантів у присутності 0,5 мг/мл стрептоміцину підвищується на 2 порядки порівняно з вихідною культурою.

Відомо, що позитивний ефект на біосинтез вторинних метаболітів мають мутації стійкості до аміноглікозидних антибіотиків, в тому числі до стрептоміцину. Такі мутації мають плейотропний ефект на актиноміцети і їх отримання можна використати як один з етапів селекції промислових продуцентів. Стрептоміцин-стійкі (Str<sup>r</sup>)

мутанти є гетерогенними за морфологічними ознаками і синтезом вторинних метаболітів. Вивчення властивостей різних штамів виявило, що більшість мутацій, що приводили до Str<sup>r</sup>-фенотипу спричинювали підвищення рівня синтезу вторинних метаболітів [19, 20].

У спонтанних та НГ-індукованих стрептомицин-резистентних мутантів *S. albus* 2435 значною мірою підвищується середнє значення ІЛА (табл. 3), а отже і рівень синтезу комплексу бактеріолітичних ферментів. Також серед Str<sup>r</sup>-мутантів зростає коефіцієнт варіації та виникають значно вища частка «плюс»-варіантів, порівняно з клонами вихідної культури.

Отримані дані свідчать про доцільність використання мутацій стійкості до стрептомицину в селекції даної культури для відбору надпродуцентів не тільки бактеріолітинів, але і інших вторинних метаболітів таких, як антибіотики. Здатність до синтезу останніх культурою *S. Albus* 2435 була встановлена авторами нещодавно та відкрила нову сторінку вивчення культури, що дасть змогу запропонувати промисловості біотехнологію комплексного антимікробного препарату – ферменту та антибіотику з різними (доповнюючими один одного) антимікробними спектрами активності [13].

## 7. Висновки

Показана ефективність застосування мутагену N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину та мутацій стійкості до стрептомицину, як комбінації селективних факторів для отримання продуцентів бактеріолітинів *Streptomyces albus* 2435 з підвищеною біосинтетичною здатністю. Встановлено дози мутагену (1 мг/мл, 20 хв. інкубації), що дозволяють відбирати штами-надсинтетики як для практичного застосування, так і в селекції з використанням комбінацій факторів.

В результаті проведеного хімічного мутагенезу та подальшого відбору стрептомицин-резистентних мутантів отримано два штами *S. Albus* 105 і 107, що характеризуються підвищенням у 1,6 рази рівнем синтезу цільового продукту. Отримані штами можуть бути використані при розробці промислової біотехнології бактеріолітичного (антимікробного) ферментного препарату для різних сфер застосування.

## Література

1. Дебатов, В. Г. Селекція мікроорганізмів на заре ХХІ века [Текст] / В. Г. Дебатов // Біотехнологія. – 2005. – № 4. – С. 3–19.
2. Громико, О. М. Вплив мутагенів на антибіотичну активність *Streptomyces nogalater* IMET 43360 – продуцента протипухлинного антибіотика ноґаламіцину [Текст] / О. М. Громико, В. О. Федоренко // Вісник Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2005. – Вип. 40. – С. 16–22.
3. Wang, X.-J. Improvement of milbemycin-producing *Streptomyces bingchenggensis* by rational screening of ultraviolet- and chemically induced mutants [Text] / X.-J. Wang, X.-C. Wang, W.-S. Xiang // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 25, № 6. – P. 1051–1056. doi:10.1007/s11274-009-9986-5
4. Gaoa, X.-G. Production, properties and application to non-aqueous enzymatic catalysis of lipase from a newly isolated *Pseudomonas* strain [Text] / X.-G. Gaoa, S.-G. Cao, K.-C. Zhang // Enzyme and Microbial Technology. – 2000. – Vol. 27, № 1–2. – P. 74–82. doi:10.1016/s0141-0229(00)00191-5
5. Solaiman, E. A. M. Induction of overproducing alkaline protease *Bacillus* mutants through UV irradiation [Text] / E. A. M. Solaiman, W. K. Hegazy, M. E. Moharam // Arab. J. Biotech. – 2005. – Vol. 8, № 1. – P. 49–60.

6. Zantinge, J. Induction, screening and identification of *Coniothyrium minitans* mutants with enhanced  $\beta$ -glucanase activity [Text] / J. Zantinge, H. Huang, K.-J. Cheng // Enzyme and Microbial Technology. – 2003. – Vol. 32, № 2. – P. 224–230. doi:10.1016/s0141-0229(02)00249-1
7. Петрук, Т. В. Спонтанна та індуктивна мінливість *Streptomyces avermitilis* – продуценту авермектинів [Текст] / Т. В. Петрук, В. Є. Козирька, О. В. Балагурова, М. С. Мукевич // Наукові записки. – Тернопіль, 2003. – № 1(20). – С. 46–50.
8. Karanam, S. K. Enhanced lipase production by mutation induced *Aspergillus japonicus* [Text] / S. K. Karanam, N. R. Medicherla // African Journal of Biotechnology. – 2008. – Vol. 7, № 12. – P. 2064–2067. doi:10.5897/AJB2008.000-5054
9. Ikram-ul-Haq, Ali S. Mutagenesis of *Bacillus licheniformis* through ethyl methanesulfonate for alpha amylase production [Text] / Ali S. Ikram-ul-Haq, A. Saleem, M. M. Javed // Pak. J. Bot. – 2009. – Vol. 41, № 3. – P. 1489–1498.
10. Shafique, S. Mutation of *Alternaria tenuissima* FCBP-252 for hyper-active alpha-amylase [Text] / S. Shafique, R. Bajwa // Indian J. Exp. Biol. – 2009. – Vol. 47, № 7. – P. 591–596.
11. Куликова, Т. Я. Селекция продуцента литических ферментов с использованием методов протопластирования и отбора рифамициноустойчивых мутантов [Текст] / Т. Я. Куликова, И. В. Жерносекова // Микробиологический журнал. – 1994. – Т. 56, № 2. – С. 76.
12. Бабенко, Л. П. Біосинтетична активність трансформанта *Streptomyces recifensis* [Текст] / Л. П. Бабенко, І. Є. Соколова // Вісник Дніпропетровського університету. Біологія. Екологія. – 2009. – Вип. 17, Т. 1. – С. 10–15. doi:10.15421/010902
13. Todosiichuk, T. S. Taxonomic analysis *Streptomyces* sp. 2435 strain, a producer of antimicrobial substances [Text] / T. S. Todosiichuk, V. V. Klochko, L. B. Zelena // Микробиологический журнал. – 2014. – Т. 76, № 1. – С. 3–8.
14. Шинкаренко, Л. М. Визначення спектра дії ферментного препарату з *Str. recifensis* var. *lyticus* 2435/М [Текст] / Л. М. Шинкаренко, Л. Г. Жолнер, Т. С. Тодосійчук // Експрес-новини: наука, техніка, виробництво. – 1998. – № 4. – С. 49.
15. Тодосійчук, Т. С. Отримання мутантів *Str. recifensis* var. *lyticus* зі зміненою бактеріолітичною активністю [Текст] / Т. С. Тодосійчук, Л. М. Шинкаренко, В. О. Федоренко, Л. І. Басілія // Микробиологический журнал. – 1998. – № 4. – С. 49–60.
16. Тодосійчук, Т. С. Розробка технології гідролітичного ферментного препарату Циторецифен [Текст]: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.20 / Т. С. Тодосійчук; НУХТ. – К., 2000. – 25 с.
17. Ellaiah, P. Strain improvement of *Aspergillus niger* for the production of lipase [Text] / P. Ellaiah, T. Prabhakar, B. Ramakrishna, A. T. Taleb, K. Adinarayana // Indian J. Microbiol. – 2002. – № 42. – P. 151–153.
18. Bhattarai, K. Enhanced Antibacterial Activity of Sodium Azide Treated Mutant *Streptomyces* Strain [Text] / K. Bhattarai, K. B. Tiwari // Journal of Nepal Association for Medical Laboratory Sciences. – 2007. – Vol. 67, № 8(1). – P. 8.
19. Gromyko, O. Generation of *Streptomyces globisporus* SMY622 Strain with Increased Landomycin E Production and It's Initial Characterization [Text] / O. Gromyko, Yu. Rebets, B. Ostash, A. Luzhetskyy, M. Fukuhara, A. Bechthold, T. Nakamura, V. Fedorenko // The Journal of Antibiotics. – 2004. – Vol. 57, № 6. – P. 383–389. doi:10.7164/antibiotics.57.383
20. Hu, H. Novel Approach for Improving the Productivity of Antibiotic-Producing Strains by Inducing Combined Resistant Mutations [Text] / H. Hu, K. Ochi // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, № 4. – P. 1885–1892. doi:10.1128/aem.67.4.1885-1892.2001

## ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНЫХ СТРЕПТОМИЦИН-РЕЗИСТЕНТНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ БАКТЕРИОЛИЗИНОВ *STREPTOMYCES ALBUS*

Исследована и показана целесообразность применения N-метил-N'-нітро-N-нітрозогуанідину (НГ), а также использование мутацій устойчивости к стрептомицину в селекції продуцента бактеріолітического ферментного комплексу *Streptomyces albus* 2435. Установлены условия мутагенной обработки НГ и концентрации стрептомицина, которые дали возможность получить

мутанты *S. albus* 105 і 107 с підвищеною в 1,6 раз здатністю к синтезу бактериолизинів.

**Ключевые слова:** *Streptomyces albus* 2435, сверхпродуцент, бактериолизини, селекція, нитрозогуанидин, стрептомицин.

**Громико Олександр Миколайович**, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, кафедра генетики і біотехнології, Львівський національний університет ім. Івана Франка, Україна, e-mail: o\_gromyko@franko.lviv.ua.

**Буцяк Андрій Васильович**, аспірант, кафедра генетики і біотехнології, Львівський національний університет ім. Івана Франка, Україна, e-mail: a.v.butziak@ukr.net.

**Федоренко Віктор Олександрович**, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри генетики і біотехнології, Львівський національний університет ім. Івана Франка, Україна, e-mail: v\_fedorenko@lnu.edu.ua.

**Тодосійчук Тетяна Сергіївна**, кандидат технічних наук, доцент, в. о. завідувача кафедри промислової біотехнології, Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут», Україна, e-mail: todosiychuk@bigmir.net.

**Громько Александр Николаевич**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, кафедра генетики и биотехнологии, Львовский национальный университет им. Ивана Франка, Украина.

**Буцьяк Андрей Васильевич**, аспирант, кафедра генетики и биотехнологии, Львовский национальный университет им. Ивана Франка, Украина.

**Федоренко Виктор Александрович**, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой генетики и биотехнологии, Львовский национальный университет им. Ивана Франка.

**Тодосийчук Татьяна Сергеевна**, кандидат технических наук, доцент, в. о. заведующего кафедрой промышленной биотехнологии, Национальный технический университет Украины «Киевский политехнический институт», Украина.

**Gromyko Oleksandr**, Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine, e-mail: o\_gromyko@franko.lviv.ua.

**Butziak Andriy**, Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine, e-mail: a.v.butziak@ukr.net.

**Fedorenko Victor**, Ivan Franko National University of Lviv, Ukraine, e-mail: v\_fedorenko@lnu.edu.ua.

**Todosiychuk Tetiana**, National Technical University of Ukraine «Kyiv Polytechnic Institute», Ukraine, e-mail: todosiychuk@bigmir.net

УДК 005.334 : 502.174

DOI: 10.15587/2312-8372.2015.40582

**Маркіна Л. М.,  
Тимченко І. В.**

## РОЗРОБКА АВТОМАТИЗОВАНОЇ СИСТЕМИ УПРАВЛІННЯ ЕКОЛОГІЧНИМИ РИЗИКАМИ ПРИ УТИЛІЗАЦІЇ ВІДХОДІВ ЗА ТЕХНОЛОГІЄЮ «ЕКОПІРОГЕНЕЗІС»

В статті представлено структуру автоматизованої системи управління екологічними ризиками при утилізації відходів за технологією «Екопірогенезіс». Запропоновано алгоритм функціонування системи управління екологічними ризиками та методичку багатокритеріальної оцінки факторів екологічної небезпеки при експлуатації обладнання технології термічної утилізації органічних відходів. Представлено результати оцінки факторів за рівнем небезпеки на основі методу аналізу ієрархій згідно сформованих критеріїв.

**Ключові слова:** екологічні ризики, фактори екологічної небезпеки, піроліз, аварії, аналіз ієрархій.

### 1. Вступ

На сьогоднішній день до одного із ефективних, з точки зору екологічної безпеки та економічної ефективності, способів переробки твердих побутових відходів можна віднести процес багатоконтурного циркуляційного піролізу (БЦП) — високотемпературної глибокої деструкції органічних відходів без доступу кисню при 600–800 °С, в результаті якого можна отримати нетрадиційні енергоносії (рідке, тверде та газоподібне паливо).

Підвищення еколого-економічної ефективності процесу БЦП досягається шляхом його поєднання з іншими технологічними процесами в загальній технології «Екопірогенезіс», яка включає технологічні лінії БЦП полімерних відходів і зношених автомобільних шин, та технологічні лінії багатоконтурної двозонної циркуляційної газифікації (БЦДГ) різних видів вологих органічних відходів.

Експлуатація комплексу, який працює за технологією «Екопірогенезіс» пов'язана з ймовірністю виникнення

небезпечних ситуацій різного характеру тому актуальною задачею є прогнозна оцінка рівнів промислової, пожежної та екологічної небезпеки на всіх етапах технологічного процесу з метою забезпечення надійної та безпечної роботи обладнання. Це може бути досягнуто створенням автоматизованої системи управління екологічними ризиками, яку планується впровадити на модульних установках, якими комплектуються заводи по термічній утилізації твердих побутових відходів (ТПВ) за технологією «Екопірогенезіс» з отриманням альтернативних видів палива.

### 2. Аналіз літературних даних та постановка проблеми

Проведено аналіз сучасних підходів до оцінки ризиків функціонування небезпечних промислових об'єктів, які дозволяють сформулювати ефективну систему управління ризиками, в тому числі екологічними [1, 2], визначити