

УДК 579.261.18

Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ВЫДЕЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ, АКТИВНЫХ ПРОТИВ МЕТИЦИЛЛИНОРЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ, ИЗ АКТИНОМИЦЕТОВ ПОЧВ КАЗАХСТАНА

(Институт микробиологии и вирусологии МОН РК
Центр биологических исследований)

Представлены результаты изучения условий выделения пяти антибиотиков из актиномицетов почв Казахстана с высокими антагонистическими свойствами против клинических MRSA и MRCNS штаммов с множественной ассоциированной устойчивостью.

Одной из основных проблем медицины начала XXI века остаются инфекционные заболевания, занимающие лидирующее место в патологии человека. По данным мировой статистики, за год от инфекций погибает более 22 миллионов больных [1]. Ущерб экономике стран от инфекций огромен, о чем можно судить по данным США и Канады, свидетельствующим о затратах на лечение только внутрибольничных инфекций более 5 млрд. долларов в год [2]. В последнее время в клиниках мира получили широкое распространение формы патогенных микроорганизмов, устойчивые к известным лекарственным препаратам. К ним относятся метициллинрезистентные штаммы *Staphylococcus aureus* (MRSA), ванкомицинрезистентные штаммы *Enterococcus* spp. (VRE), метициллинрезистентные коагулазонегативных штаммы *S. aureus* (MRCNS), лекарственно-резистентные штаммы *Streptococcus pneumoniae* (DRSP), штаммы *S. aureus* с промежуточной чувствительностью к ванкомицину (VISA) и др. Метициллинрезистентные стафилококки (MRS) с множественной лекарственной устойчивостью, обладая высокой вирулентностью, являются частыми возбудителями наиболее тяжелых форм госпитальных инфекций. Особую тревогу вызывает выход устойчивых штаммов, первоначально сформировавшихся в лечебных учреждениях, за пределы стационаров. Проблема распространения лекарственноустойчивых возбудителей осложняется высокой частотой ассоциированной устойчивости к антибактериальным препаратам разных групп.

Такое положение привело к значительным затруднениям в терапии вызываемых ими инфекций, и является серьезной проблемой современной медицины. Поэтому, в настоящее время, поиск новых лекарственных препаратов против MRS является насущной необходимостью.

В Институте микробиологии и вирусологии МОН РК в результате скрининга из почв Казахстана получены штаммы актиномицетов, образующие антибиотики широкого спектра действия, высокоактивные в отношении грамположительных микроорганизмов. Установлена высокая активность новых антибиотиков в отношении клинических MRSA и MRCNS штаммов с множественной ассоциированной устойчивостью к основным группам антибиотиков: беталактамам (оксациллину, ампициллину, карбенициллину, амоксициллину и цефазолину), макролидам (эритромицину и спирамицину), аминогликозидам (канамицину и гентамицину), фторхинолонам (ципрофлоксацину, офлоксацину, норфлоксацину), линкомицину, хлорамфениколу. Антибиотики проявили активность в отношении особо устойчивых MRS-штаммов 3 фенотипа (*S. aureus*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*).

Данная работа посвящена подбору условий выделения перспективных антибиотиков из культуральной жидкости и биомассы продуцентов с целью их дальнейшего изучения и химической идентификации.

Материалы и методы исследований

Для получения спорового материала штаммы актиномицетов выращивали в течение 10 дней

при температуре 28°C на минеральном агаре № 1 (Гаузе и др., 1957) и органическом агаре № 2 (Гаузе и др., 1957).

Состав минерального агара №1 (%): крахмал (растворимый) – 2,0; K_2HPO_4 – 0,05; $MgSO_4$ – 0,05; $NaCl$ – 0,05; KNO_3 – 0,1; $FeSO_4$ – 0,001; агар – 20,0; pH 7,2–7,4.

Состав органического агара №2 (%): бульон Хоттингера – 3 мл; пептон – 0,5; глюкоза – 1,0; $NaCl$ – 0,5; агар – 20,0; pH 7,0–7,2.

Глубинное культивирование штаммов актиномицетов осуществляли в два этапа. Вегетативный посевной материал выращивали в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180–200 об/мин) при температуре 28 °C в течение 48 часов. Количество посевного материала, использованного для инокулирования посевной среды, составляло 1% (суспензия спор 10^9 /мл).

Состав посевной среды (%): кукурузный экстракт (по сухому весу) – 0,5; $(NH_2)SO_4$ – 0,35; $NaCl$ – 0,5; $CaCO_3$ – 0,5; крахмал нерастворимый – 1,5; глюкоза – 1,0. Для приготовления среды использовали водопроводную воду. Значение pH довели до 7,4–7,6 с помощью раствора 0,1 N NaOH перед стерилизацией.

Количество инокулюма для засева ферментационной среды составляло 3% (вегетативный мицелий). Ферментацию антибиотиков проводили на органической среде А4. Состав ферментационной среды А4 (%): глюкоза – 1,0; соевая мука – 1,0; $NaCl$ – 0,5; $CaCO_3$ – 0,25. Для приготовления среды использовали водопроводную воду. Значение pH довели до 7,2–7,4 с помощью раствора 0,1 N NaOH перед стерилизацией.

Биосинтез антибиотиков осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180–200 об/мин) при температуре 28° C в течение 96 часов.

Культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием при 2000 оборотов в течение 20 минут. Мицелий отжимали от остатков влаги под прессом. Антибиотики выделяли отдельно из мицелия и нативного раствора штаммов-продуцентов экстракционным методом при pH 7: из культуральной жидкости – экстракцией н-бутанолом, этилацетатом, хлороформом, бензолом,

петролейным эфиром (3:1), из мицелия – ацетоном (1:3). Экстракты концентрировали в вакууме, водный остаток после удаления ацетона экстрагировали н-бутанолом или этилацетатом. Экстракты вновь упаривали в вакууме до сухого остатка, и антибиотическое вещество растворяли в 80 % этаноле.

Антимикробную активность культуральных жидкостей, ацетоновых экстрактов из мицелия и препаратов-сырцов определяли в отношении клинического штамма *MRSA № 9* и музейного штамма *Klebsiella pneumoniae 444*. Клинический штамм *MRSA № 9* обладает устойчивостью к бета-лактамам, аминокликозидам, эритромицину, тетрациклину.

Антимикробную активность изучали методами двукратных серийных разведений на питательном бульоне и диффузии в агар на питательном агаре. Состав питательного бульона (%): мясной экстракт – 0,15; дрожжевой экстракт – 0,15; пептон – 0,5; $NaCl$ – 0,5; pH 7,4–7,6.

Результаты и обсуждение

В работе исследовали пять штаммов актиномицетов №№ 20, 29, 35, 36, 70, с высокими антагонистическими свойствами против клинических *MRSA* и *MRCNS* штаммов с множественной ассоциированной устойчивостью.

Антибиотик А-29

В условиях глубинной ферментации продуцента антибиотик А-29 накапливается как в культуральной жидкости, так и в мицелии. Активность культуральной жидкости составляла в отношении штамма *MRSA № 9* – 100 ед.разведения/мл, *Klebsiella pneumoniae 444* – 10 ед.разведения/мл. Вес мицелия был равен 36,68 г/л. Активность ацетонового экстракта из мицелия – 400 ед.разведения/мл в отношении штамма *MRSA № 9* и 100 ед.разведения/мл в отношении *Klebsiella pneumoniae 444*.

Антибиотик А-36

В условиях глубинной ферментации продуцента антибиотик А-36 накапливается как в культуральной жидкости, так и в мицелии. Активность культуральной жидкости составляла в отношении штамма *MRSA № 9* – 200 ед.разведения/мл, *Klebsiella pneumoniae 444* – 800 ед.разведения/мл. Вес мицелия был равен 39,08 г/л. Активность ацетонового экстракта из мицелия – 3200 ед.разведения/мл в отношении штамма *MRSA № 9* и 12800 ед.разведения/мл

в отношении штамма *Klebsiella pneumoniae* 444.

Антибиотик А-70

В условиях глубинной ферментации продуцента антибиотик А-70 накапливается преимущественно в культуральной жидкости, в меньшей степени в мицелии. Активность культуральной жидкости составляла в отношении штамма *MRSA* № 9 - 160 ед.разведения\мл и 1000 ед.разведения\мл в отношении штамма *Klebsiella pneumoniae* 444. Вес мицелия был равен 19,56 г\л. Активность ацетонового экстракта - 20 ед.разведения\мл в отношении штамма *MRSA* № 9 и 200 ед.разведения\мл в отношении штамма *Klebsiella pneumoniae* 444.

Антибиотик С-20

В условиях глубинной ферментации продуцента антибиотик С-20 накапливается в мицелии. Активность культуральной жидкости в отношении штамма *MRSA* № 9 и *Klebsiella pneumoniae* 444 методом серийных разведений не установлена. Вес мицелия был равен 20,6 г\л. Активность ацетонового экстракта - 20

ед.разведения\мл в отношении штамма *MRSA* № 9 и 160 ед.разведения\мл в отношении штамма *Klebsiella pneumoniae* 444.

Антибиотик С-35

В условиях глубинной ферментации продуцента антибиотик С-35 накапливается преимущественно в мицелии. Незначительные количества антибиотика содержатся в культуральной жидкости. Активность культуральной жидкости составляла в отношении штамма *MRSA* № 9 - 10 ед.разведения\мл, в отношении *Klebsiella pneumoniae* 444 - 20 ед.разведения\мл. Вес мицелия был равен 38,09 г\л. Активность ацетонового экстракта из мицелия - 10000 ед.разведения\мл в отношении штамма *MRSA* № 9 и 40000 ед.разведения\мл в отношении штамма *Klebsiella pneumoniae* 444.

Для наиболее полного извлечения антибиотиков из культуральной жидкости проведены исследования по подбору условий экстракции. Результаты исследований приведены в таблицах 1-8.

Таблица 1. Экстракция антибиотика А-29 из культуральной жидкости органическими растворителями

Растворители	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> № 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella pneumoniae</i> 444, мм
н-Бутиловый спирт	36	14
Этилацетат	38	15
Петролейный эфир	0	0
Хлороформ	33	12
Бензол	30	10

Таблица 2. Экстракция антибиотика А-36 из культуральной жидкости органическими растворителями

Растворители	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> № 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella pneumoniae</i> 444, мм
н-Бутиловый спирт	45	55
Этилацетат	42	52
Петролейный эфир	0	0
Хлороформ	38	46
Бензол	36	44

Таблица 3. Экстракция антибиотика А-70 из культуральной жидкости органическими растворителями

Растворители	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> № 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella pneumoniae</i> 444, мм
н-Бутиловый спирт	32	39
Этилацетат	34	41
Хлороформ	30	37
Бензол	31	38

Таблица 4. Экстракция антибиотика С-20 из культуральной жидкости органическими растворителями

Растворители	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> № 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella pneumoniae</i> 444, мм
н-Бутиловый спирт	09	12
Этилацетат	08	10
Петролейный эфир	0	0
Хлороформ	0	0
Бензол	09	10

Таблица 5. Экстракция антибиотика С-35 из культуральной жидкости органическими растворителями

Растворители	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> # 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella pneumoniae</i> 444, мм
н-Бутиловый спирт	12	16
Этилацетат	12	16
Петролейный эфир	0	0
Хлороформ	11	13
Бензол	09	11

Таблица 6. Экстракция антибиотика А-70 из культуральной жидкости при разных значениях рН

Растворитель (этилацетат)	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> № 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella pneumoniae</i> 444, мм
рН 2	50	56
рН 3	42	48
рН 4	41	46
рН 5	35	42
рН 6	35	42
рН 7	34	41
рН 8	34	41

Таблица 7. Экстракция антибиотиков С-20-1, А-29-1 и С-35-1 из культуральной жидкости при разных значениях рН

Наименование антибиотиков	рН культуральной жидкости (экстракция бутанолом)	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> № 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> 444, мм
С-20-1	2	13	16
	7	11	12
	8	10	10
А-29-1	2	34	15
	7	34	15
	8	34	15
С-35-1	2	15	17
	7	15	17
	8	12	15

Таблица 8. Экстракция антибиотиков С-20-2, А-29-2 и С-35-2 из биомассы при разных значениях рН

Наименование антибиотиков	рН экстракта (экстракция ацетоном)	Диаметр зоны подавления роста <i>MRSA</i> № 9, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> 444, мм
С-20-2	2	30	28
	7	20	20
А-29-2	2	32	12
	7	32	12
С-35-2	2	27	25
	7	27	25

Из полученных результатов следует, что оптимальными растворителями для экстракции антибиотиков являются этилацетат и бутанол. pH также оказывал большое влияние на выделение антибиотиков (таблицы 6-8). Наилучшие условия для экстракции антибиотика А-70 создавались, когда pH культуральной жидкости находился в пределах 2-4 (таблица 6). Антибиотические вещества из культуральной жидкости и биомассы штаммов № 20, 29, 35 экстрагировали наиболее оптимальным растворителем при разных значениях pH: из культуральной жидкости при pH 2, 7, 8; из мицелия при pH 2 и 7. Согласно полученным данным, pH не оказывает влияния на выделение антибиотиков А-29 и С-35. При выделении антибиотика С-20 из культуральной жидкости и биомассы наилучшие условия создаются при pH 2,0.

Выводы

1. Установлено, что антибиотики А-29 и А-36 образуются как в культуральной жидкости, так и в мицелии; антибиотик А-70 - преимущественно в культуральной жидкости; антибиотики С-20 и С-35 накапливаются в мицелии продуцентов. Оптимальными растворителями для экстракции антибиотиков А-29, А-36 и А-70 из культуральной жидкости являются этилацетат и бутанол.

2. Изучены условия выделения антибиотиков А-70, А-29, С-20 и С-35 из культуральной жидкости и биомассы при разных значениях pH. Установлено, что при экстракции pH не влияет на выделение антибиотиков А-29 и С-35. Наилучшие условия для экстракции антибиотика А-70 создавались, когда pH культуральной жидкости находился в пределах 2-4, при выделении антибиотика С-20 из культуральной жидкости и биомассы при pH 2,0.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев С.В. Максимальная (деэкалационная) эмпирическая терапия жизнеопасных инфекций в стационаре // Антибиотики и химиотерапия. 2002. Т.47. №3. С.37-43.
2. Rubin R.J., Harrington C.A., Poon A. The Economic Impact of *Staphylococcus aureus* Infections in New York City Hospitals. // Emerg. Infect. Dis. 1999. № 5(1). P. 9-17.

Резюме

Қазақстан топырағындағы актиномицеттерден бөлініп алынған антибиотиктердің жағдай көрсеткіштері зерттеуі берілген. Антибиотиктер метициллинорезистенттік стафилококктарға қарсы жоғары белсенділігін көрсетті.

Summary

In article are cited the data on studying conditions of isolation of 5 new antibiotics from actinomycetes of soil of Kazakhstan. Antibiotics have shown high activity against methicillin-resistant Staphylococci with multiple drug-resistance.