

УДК 615.33(076.5) (075.8)

А.Х. Хасенова, Г.М. Пичхадзе, Г.Д. Ултанбекова, С.Ш. Шакиев,
М.А. Акылова, Л.П. Треножникова

¹Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Казахстан, г. Алматы

²Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы

*E-mail: k.anara@mail.ru

Подбор оптимальных условий биосинтеза антибиотиков широкого спектра действия, активных против мультирезистентных тест-моделей

Подобраны оптимальные условия биосинтеза для 26 природных антибиотиков, активных против грамположительных и грамотрицательных возбудителей инфекций с множественной лекарственной устойчивостью. Активность культуральной жидкости штаммов актиномицетов на жидких средах достигает до 10000 ед.разведения/мл (тест-микроорганизмы *S. aureus* №3316 и *E.coli* J53 pMG223).

Ключевые слова: актиномицеты, антибиотики, культуральная жидкость, мультирезистентные тест-микроорганизмы, биомасса, мицелий, антимикробная активность.

A.Kh. Khassenova, G.M. Pichkhadze, G.D. Ultanbekova, S.Sh. Shakiev,
M.A. Akilova, L.P. Trenochnikova

Selection of optimum conditions of biosynthesis of antibiotics of the wide range of action, active against multiresistant conditionally pathogenic infectious agent

Volumes of annually carried out chemical measures against locusts in the southeast of republic of Kazakhstan reach 120 000 hectares, at biological efficiency of insecticides from various groups of chemical compounds of 95,6-98,9 %. At the same time the death of useful entomofauna is observed. Application of a preparation form of an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals)Vuill. in the form of oil suspension caused death of 71,0-97,5 % of the pest that is rather effective for control of locust number.

Keywords: actinomycetes, antibiotics, cultural liquid, multiresistant test microorganisms, biomass, mycelium, antimicrobial activity.

А.Х. Хасенова, Г.М. Пичхадзе, Г.Д. Ултанбекова, С.Ш. Шакиев,
М.А. Акылова, Л.П. Треножникова

Мультирезистентті шартты-патогенді қоздырғыш инфекциясына қарсы белсенді әсері кең спектр антибиотиктердің биосинтездік жағдайын тандап алуы

Көптеген дәрілерге төзімді грамоң және грамтеріс инфекциялар қоздырғыштарына қарсы белсенді 26 табиғи антибиотик биосинтезі үшін үйлесімді орта теріп алынды. Актиномицеттер штаммдарының культуралдық сұйықтығының белсенділігі сұйық ортада 10000 бірл.сұйылт/мл-ға дейін жетеді (мультирезистентті тест-моделдер *E.coli* мен *S.aureus*).

Түйін сөздер: актиномицеттер, антибиотиктер, культуралдық сұйықты, мультирезистентті тест-микроорганизмдер, биомасса, мицелий, микробтарға қарсы белсенділік.

Развитие резистентности к антимикробным препаратам у многих бактериальных патогенов делает традиционную терапию неэффективной, а поэтому лечение инфекций становится более сложным, с высоким уровнем летальности и зачастую более дорогим [1]. Установлено, что летальность при различных нозологических формах внутрибольничных инфекций колеблется

от 3,5 до 60%, а при генерализованных формах достигает такого же уровня, как и в доантибиотическую эру. Быстрый рост и распространение резистентности к антибиотикам госпитальной флоры наблюдается во всем мире, но этот процесс происходит неравномерно. Грамотрицательные и грамположительные микроорганизмы являются основными возбудителями нозокоми-

альных инфекций и поочередно занимают лидирующее положение в этиологии инфекционных заболеваний [2–5]. Наиболее проблемными микроорганизмами в настоящее время являются резистентные к метициллину *S.aureus* (MRSA) и грамотрицательные бактерии — продуценты β-лактамаз расширенного спектра (ESBLs), так как именно они обладают резистентностью ко многим антибиотическим веществам [6–8].

Установлено, что инфекции, вызванные MRSA, по сравнению с инфекциями, вызванными чувствительными к метициллину/оксациллину *S.aureus* (MSSA), являются причиной более высокой летальности. При оценке атрибутивной летальности MRSA и MSSA разница составила около 25 % [9]. MRSA обладают резистентностью ко всем b-лактамам антибиотикам, а также частой устойчивостью и к другим классам антимикробных препаратов (аминогликозидам, линкозамидам, макролидам, тетрациклинам, фторхинолонам). Для штаммов MRSA частота ассоциированной резистентности к указанным антибиотикам может составлять до 82,7% [10]. Независимые переменные, определяющие продолжительность лечения в ОПИТ (тяжесть инфекции, продолжительность лечения, назначение адекватной антибиотикотерапии), у пациентов с инфекцией MRSA выше примерно на 50 %, что приводит к высоким дополнительным затратам [11]. Поэтому, кроме клинической важности, имеется существенная экономическая мотивация снижения резистентности нозокомиальной флоры.

Если ранее основным этиологическим фактором внутрибольничных инфекций считали *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, то сейчас наблюдается явное преобладание факультативно-анаэробных грамотрицательных бактерий. Помимо «традиционных» нозокомиальных патогенов, как клебсиелла (*K.pneumoniae*) и кишечная палочка (*E.coli*), отмечена возрастающая роль синегнойной палочки (*P.aeruginosa*) и ацинетобактера (*Acinetobacter spp.*) среди грамотрицательных возбудителей [12–14]. Именно при этих инфекциях наблюдаются наибольшие сложности в выборе адекватного режима антибиотикотерапии, так как для этих возбудителей характерны как множественные и сложные механизмы резистентности, так и формирование полирезистентности в процессе проведения антибиотикотерапии. Смертность при пневмониях, вызванных грамотрицательными бактериями, обычно составляет около

50% [15]. Если в отношении актуальных грамположительных возбудителей в настоящее время имеются препараты, способные отчасти решать проблемы резистентности, в отношении актуальных грамотрицательных бактерий таких препаратов пока нет. В результате лечение инфекций, вызванных грамотрицательной флорой, станет серьезной проблемой в будущем.

В настоящее время труднее, чем когда-либо раньше, элиминировать инфекцию, вызванную «супермикроорганизмами», резистентными к антибиотикам. Эта проблема усугубляется скудными разработками новых антимикробных препаратов с антибактериальной активностью против MRSA, грамотрицательных микроорганизмов и энтерококков. В условиях растущей актуальности множественной резистентности к лекарствам и отсутствия антибиотиков с новыми механизмами действия необходима разработка новых лекарственных средств [16,17]. По сравнению с разработкой новых аналогов лекарственных соединений, уже применяемых в медицинской практике, скрининг новых природных соединений без предшествующей перекрестной резистентности является более предпочтительным.

В Институте микробиологии и вирусологии КН МОН РК проводится скрининг новых природных лекарственных соединений, активных против мультирезистентных грамположительных и грамотрицательных возбудителей инфекций с множественной ассоциированной лекарственной устойчивостью.

Целью данного исследования был подбор оптимальных условий биосинтеза антибиотиков широкого спектра действия, активных против мультирезистентных тест-моделей.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись 26 штаммов актиномицетов, полученных из почв Южного Казахстана (г. Алматы, Алматинской и Жамбылской областей) и обладающих высоким уровнем антагонизма против мультирезистентных тест-моделей: *S.aureus* № 3316 (клинический метициллинрезистентный штамм, устойчивый к гентамицину, эритромицину, ципрофлоксацину) и *E.coli* J53 pMG223 (лабораторный штамм, устойчивый к амикацину, канамицину, неомицину, тетрациклину, тобрамицину, триметоприму, хлорамфениколу, гентамицину, стрептомицину, спектиномицину, сульфониламидам).

Для получения спорового материала штаммы актиномицетов выращивали в течение 10 дней при температуре 28°C на агаре № 1 Гаузе и овсяном агаре. 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.

При изучении биосинтеза антибиотиков использовали известные питательные среды и их модификации следующего состава (%):

Среда А₄: глюкоза-1,5; соевая мука-1,5; NaCl-0,5; CaCO₃- 0,2; pH 7,2-7,4. Среда гороховая: гороховая мука-1,5; сахароза-2,1; крахмал-0,85; NaNO₃ -0,5; CaCO₃-0,5; NaCl-0,5; pH 7,5-7,7. Среда с дрожжевым экстрактом: дрожжевой экстракт-0,5; пептон-1,0; глюкоза-2,0; CaCO₃ - 0,2; pH 7,3.

Для оценки эффективности используемых сред учитывали величину биомассы (г/л), антибиотическую активность культуральной жидкости и ацетоновых экстрактов из мицелия в отношении тест-микроорганизмов: *MRSA* № 3316 и *Escherichia coli J53* (pMG223). Культуральную жидкость отделяли от биомассы центрифугированием при 2000 оборотов в течение 20 минут или фильтрованием. Биомассу отжимали от остатков влаги под прессом, взвешивали, экстрагировали ацетоном в соотношении 1:3 и ацетоновые экстракты отделяли фильтрованием.

Антимикробную активность культуральной жидкости и экстрактов из биомассы изучали методом двукратных серийных разведений на питательном бульоне. Состав питательного бульона (%): мясной экстракт - 0,15; дрожжевой экстракт - 0,15; пептон - 0,5; NaCl- 0,5; pH 7,4-7,6. Антибиотическую активность выражали в условных единицах: 1 условная единица была равна минимальному количеству антибиотических веществ, препятствующих росту тест-организмов при засеивании из расчета 10⁵ спор на 1 мл среды. Микроорганизмы инкубировали при температуре 37° С в течение 24 часов. Все исследования выполнены в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

Поскольку штаммы актиномицетов образуют антибиотики при культивировании на жидких средах как в культуральной жидкости, так и в биомассе, была изучена антимикробная активность культуральной жидкости и экс-

трактов из биомассы в отношении мультирезистентных тест-моделей *S. aureus* № 3316 и *E. coli J53* pMG223 при ферментации антибиотиков на трех органических средах. Полученные данные приведены в таблице.

Из таблицы видно, что наиболее оптимальной для биосинтеза антибиотиков КА003А, КА004/6, КА008А, КА010F, КА010L, КА027Е, КА030С, КА031А, КА031В, КА031С, КА038В, КА049А, КА068В, КА075С, КА094Е в культуральной жидкости является среда с гороховой мукой; для биосинтеза антибиотиков КА005А, КА015А, КА015F, КА022D, КА024А, КА035Е, КА087В, КА094А, КА094В – среда с соевой мукой, для биосинтеза антибиотика КА015В – среда с дрожжевым экстрактом. Для биосинтеза антибиотика КА030А в культуральной жидкости в равной степени оптимальны среды с соевой и гороховой мукой.

Активность культуральной жидкости изученных штаммов актиномицетов изменялась на жидких средах в пределах от 0 до 10000 ед.разведения/мл (тест-микроорганизмы *S. aureus* №3316 и *E.coli J53* pMG223). Наиболее высокая активность культуральной жидкости (8000-10000 ед.разведения/мл) в отношении *S. aureus* № 3316 наблюдалась при ферментации антибиотиков: КА003А, КА010L, КА027Е, КА031А, КА031С, КА075С (гороховая среда), КА008А, КА015А (гороховая и соевая среды), КА015В (дрожжевая среда). В отношении *E. coli J53* pMG223 наиболее высокую активность культуральной жидкости (8000-10000 ед.разведения/мл) наблюдали при биосинтезе антибиотиков: КА003А, КА031А, КА031С (гороховая среда), КА010L, КА015А (гороховая и соевая среды).

При ферментации на жидких средах наблюдали образование активного вещества в биомассе для большинства антибиотиков, за исключением КА003А, КА005А, КА010F, КА010L, КА015В, для которых характерно накопление активного вещества только в культуральной жидкости. Наиболее высокий уровень накопления в биомассе (2000 ед.разведения/мл экстракта, тест-микроорганизм *S. aureus* № 3316) установлен для антибиотиков: КА008А, КА027Е (гороховая среда), КА015F (дрожжевая среда), КА024А (соевая и гороховые среды). Активность экстрактов из биомассы в отношении *E.coli J53* pMG223 была невысокой и установлена для следующих антибиотиков: КА008А (400-800 ед.разведения/

мл), KA022D (400 ед.разведения/мл), KA024A (20-40 ед.разведения/мл), KA035E (80-100 ед.разведения/мл), KA094B (800 ед.разведения/мл). Уровень накопления активного вещества в культуральной жидкости соответствует таковому

в биомассе для антибиотиков KA008A, KA027E, KA024A. Антибиотик KA015F на дрожжевой среде накапливается только в биомассе, тогда как активность культуральной жидкости максимальна на соевой среде.

Таблица 1 – Антимикробная активность культуральной жидкости и экстрактов из биомассы против мультирезистентных тест-моделей - *S. aureus №3316* и *E.coli J53 pMG223*

Номер штамма	Среды для ферментации антибиотиков	Вес мицелия, г/л	Антимикробная активность культуральной жидкости, ед.разведения/мл		Антимикробная активность экстрактов из биомассы, ед.разведения/мл	
			<i>S. aureus №3316</i>	<i>E.coli J53 pMG223</i>	<i>S. aureus №3316</i>	<i>E.coli J53 pMG223</i>
KA003A	1	23,95	20	40	0	0
	2	18,85	10000	10000	0	0
	3	3,55	0	0	0	0
KA004/6	1	6,25	0	0	1000	0
	2	6,25	1000	400	800	0
	3	15,60	4000	0	800	0
KA005A	1	3,15	800	900	0	0
	2	12,60	200	200	0	0
	3	1,15	0	10	0	0
KA008A	1	6,75	8000	400	1200	800
	2	26,74	8000	600	2000	800
	3	16,74	2000	100	1000	400
KA010F	1	6,25	800	400	0	0
	2	23,15	1000	900	10	0
	3	9,31	200	40	0	0
KA010L	1	13,93	2000	8000	0	0
	2	21,60	10000	10000	0	0
	3	7,20	800	900	0	0
KA015A	1	10,50	10000	10000	0	0
	2	6,80	8000	8000	0	0
	3	9,10	20	20	1200	0
KA015B	1	8,40	1000	1000	0	0
	2	6,40	2000	1200	0	0
	3	15,70	8000	900	0	0
KA015F	1	3,15	400	800	0	0
	2	2,60	200	400	0	0
	3	12,4	0	0	2000	0
KA022D	1	8,35	400	1000	1200	400
	2	10,90	200	800	400	400
	3	15,1	400	20	80	0
KA024A	1	11,6	4000	4000	2000	40
	2	20,2	2000	2000	2000	20
	3	18,9	400	800	0	0
KA027E	1	5,41	4000	1200	0	0
	2	17,4	8000	1400	2000	0
	3	22,15	1000	400	0	0

Продолжение таблицы

KA030A	1	16,2	1000	1000	1000	0
	2	27,8	1000	1000	400	0
	3	21,9	400	400	0	0
KA030C	1	28,0	1000	1000	1000	0
	2	43,9	4000	4000	1000	0
	3	23,7	800	800	0	0
KA031A	1	20,9	2000	4000	0	0
	2	40,7	8000	8000	1000	0
	3	26,8	2000	2000	0	0
KA031B	1	12,5	800	800	800	0
	2	21,5	2000	2000	1000	0
	3	15,2	200	400	0	0
KA031C	1	27,4	4000	2000	1200	0
	2	33,4	10000	10000	800	0
	3	28,4	2000	2000	0	0
KA035E	1	4,26	1200	1000	400	100
	2	11,8	1000	800	20	80
	3	2,80	1200	20	100	100
KA038B	1	21,7	200	200	1200	0
	2	39,0	1000	800	800	0
	3	20,6	20	10	0	0
KA049A	1	19,6	800	800	1000	0
	2	33,2	2000	2000	400	0
	3	20,9	400	400	0	0
KA068B	1	11,2	10	10	0	0
	2	24,3	400	200	0	0
	3	10,1	0	0	0	0
KA075C	1	7,7	1200	1000	0	0
	2	14,4	8000	1200	0	0
	3	21,2	2000	200	0	0
KA087B	1	16,7	10000	4000	0	0
	2	7,9	2000	2000	0	0
	3	4,7	0	20	800	0
KA094A	1	5,0	1200	1200	800	0
	2	12,1	1200	0	800	0
	3	2,7	100	0	0	0
KA094B	1	5,5	20	2000	20	800
	2	10,0	10	0	10	0
	3	1,53	10	0	0	0
KA094E	1	Нет роста	-	-	-	-
	2	7,9	2000	400	10	0
	3	1,5	1200	0	0	0

Примечание: 1- среда с соевой мукой, 2- среда с гороховой мукой, 3 – среда с дрожжевым экстрактом

Для штаммов: KZ004/6, KZ010L, KZ010F, KZ015B, KZ030C, KZ031A, KZ031B, KZ031C, KZ038B, KZ049A, KZ068B, KZ075C, KZ087, KZ094E – установлено, что максималь-

ный уровень накопления биомассы в среде соответствует также самому высокому уровню антимикробной активности культуральной жидкости. При биосинтезе антибиотиков – KA015F,

KA024A, KA035E – максимум антимикробной активности культуральной жидкости наблюдался при низком уровне накопления биомассы.

На основании полученных данных подобраны оптимальные среды для биосинтеза антибиотиков, обеспечивающие их максимальное накопление в культуральной жидкости и биомассе. Среда с гороховой мукой является оптимальной для

ферментации антибиотиков: KA003A, KA004/6, KA008A, KA010F, KA010L, KA027E, KA030C, KA031A, KA031B, KA031C, KA038B, KA049A, KA068B, KA075C, KA094E; среда с соевой мукой - KA005A, KA015A, KA015F, KA022D, KA024A, KA030A, KA035E, KA087B, KA094A, KA094B; среда с дрожжевым экстрактом оптимальна для биосинтеза антибиотика KA015B.

Литература

- 1 Vincent J.L., Bihari D.J., Suter P.M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. JAMA 1995; 274:639-44.
- 2 Weber D.J., Raasch R., Rutala W.A. Nosocomial infections in the ICU: the growing importance of antibiotic-resistant pathogens // Chest. – 1999. - V.115. – P.34-41.
- 3 Alberti C., Brun-Buisson C., Burchardi H. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study // Intensive Care Med. – 2002. – V. 28. – P.108-121.
- 4 Roder B.L., Nielson S.L., Mangussen P. Antibiotic usage in an intensive care unit in a Danish university hospital // J Antimicrob Chemother. – 1993. – V. 32. – P.633-642.
- 5 Peralta G., Sanchez M.B., Garrido J.C. Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with Escherichia coli bacteraemia // J Antimicrob Chemother. – 2007. – V. – 60. – P.855-63.
- 6 Dekhnich A., Ryabkova E., Kretchikova O. Antimicrobial resistance of nosocomial strains of Staphylococcus aureus in Russian ICUs: Results of multicenter study // Presented at 46th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC 2006), September 27-30, 2006, San Francisco, CA, USA.
- 7 Neuhauser M.M., Weinstein R.A., Rydman R. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use // JAMA. – 2003. – V. 289. – № 7. – P. 885-888.
- 8 Страчунский Л.С., Дехнич А.В., Эдельштейн И.А. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов Staphylococcus aureus в России: результаты многоцентрового исследования // Клин. Микробиология. Антимикроб. Химиотерапия. - 2002. – Т. 4. – № 4. – С. 325-336.
- 9 Bou G., Oliver A., Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D B-lactamase with carbap-enemase activity in an Acinetobacter baumannii clinical strain // Antimicrob. Agents Chemother. – 2000. – V.44. – P. 1556-1561.
- 10 Сидоренко С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. – V. 4. – № 2. – С.38-41. 11. Bradford P.A. Extended-Spectrum B-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat // Clinical microbiology reviews. – 2001. – V. 14. – №. 4. – P. 933-951.
- 12 Peralta G., Sanchez M.B., Garrido J.C. Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with Escherichia coli bacteraemia // J. Antimicrob Chemother. – 2007. – V. 60. – P. 855-863.
- 13 Lodise T.P. Jr., Patel N., Kwa A. Predictors of 30-day mortality among patients with Pseudomonas aeruginosa bloodstream infections: impact of delayed appropriate antibiotic selection // Antimicrob Agents Chemother. – 2007. – V. 51. – P. 3510-3515.
- 14 Schwaber M.J., Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis // J Antimicrob Chemother. – 2007. – V. 60. – P. 913-920.
- 15 Brisse S., Milatovic D., Fluit A.C., Verhoef J., Schmitz F.J. Epidemiology of Quinolone resistance of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxitoca in Europe // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2000. – V. 19. – P. 64-68.
- 16 Яковлев С.В. Клиническое значение резистентности микроорганизмов для выбора режима антибактериальной терапии в хирургии // Consilium-medicum. 2001. Экстра-выпуск. – С. 11-14.
- 17 Ромашов О.М. Клиническое значение и антибиотикотерапия госпитальных инфекций, вызванных резистентными грамотрицательными микроорганизмами: автореферат дис. ... канд. мед. наук: – М., 2004. – 24 с.