

# Влияние индуцирующих и селективных агентов на биосинтез нового антистафилококкового антибиотика батумина

Л. Н. Чуркина, А. Н. Кравец, В. В. Клочко

Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины  
Ул. Академика Заболотного, 154, Киев, Д 03680, Украина

churkina@imv.kiev.ua

---

*Использование высоких концентраций антистафилококкового антибиотика батумина для повышения биосинтетической активности собственного штамма-продуцента позволило отобрать варианты с повышенной продуктивностью. Максимально активный клон «Pseudomonas batumici» № 9 синтезировал 60–70 мг/л батумина, что в 2 раза превышало активность наиболее продуктивного природного штамма. Однако при хранении этой культуры в неселективных условиях наблюдалась постепенная потеря активности. Хлортетрациклин, использованный для увеличения выхода батумина, обладал селективным действием, в результате чего возрастало содержание клонов с повышенной активностью.*

---

*Ключевые слова: батумин, хлортетрациклин, штамм-продуцент, Staphylococcus aureus.*

---

**Введение.** Антибиотик батумин выделен из штамма почвенных бактерий «*Pseudomonas batumici*» в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины. Показано, что по своей химической структуре батумин представляет собой (2E,10Z,12E)-20-(3-аминокарбокسي-2-метил-1-оксипутил)-амино-7-метил-17-оксо-19-окси-3,5,15-триметил-эйкоза-2, 10, 12-триеновую кислоту [1]. Благодаря своей уникальной химической структуре батумин можно рассматривать как новое антимикробное вещество, не имеющее аналогов среди антибиотиков, широко используемых в клиниках. Батумин обладает исключительной избирательной активностью в отношении всех исследуемых видов стафилококков [2, 3] и является высокоэффективным средством борьбы с назальным носительством стафилококка [4, 5].

Диски с батумином «Диастаф» обеспечивают быструю идентификацию микроорганизмов рода

*Staphylococcus* [6], их можно с успехом использовать при массовых обследованиях на носительство стафилококка. Таким образом, батумин является перспективным средством в борьбе с госпитальной стафилококковой инфекцией — одной из острых и пока не решенных проблем современной медицины.

Недостаток природного штамма-продуцента, являющийся препятствием для промышленного производства, — это низкий уровень биосинтеза антибиотика (20–25 мг/л).

Использование антибиотиков как селективных и индуцирующих агентов позволило получить практические важные результаты. Так, под влиянием антибиотиков на продуцирующие их культуры актиномицетов отобраны высокоактивные мутанты продуцентов ристомидина, хлортетрациклина, имбрицина [9–12].

Цель настоящей работы состояла в исследовании особенностей действия батумина и хлортетрациклина на биосинтетическую активность штамма-продуцента для повышения его продуктивности.

Материалы и методы. В работе использовали штамм «*P. batumici*» 109 с повышенной биосинтетической активностью [7], полученный при расщеплении дикого штамма «*P. batumici*» В-303.

Резистентные к батумину и хлортетрациклину варианты «*P. batumici*» 109 получены методом ступенчатой селекции с возрастающими концентрациями антибиотиков. Батумин и хлортетрациклин вносили в агаризованную среду в виде водного раствора. Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) батумина для «*P. batumici*» 109 составляла 200 мкг/мл, хлортетрациклина — 0,2 мкг/мл.

Штамм «*P. batumici*» 109, а также батуминрезистентные варианты № 4, № 9 и резистентные к хлортетрациклину варианты № 28, 53, 80 хранили в неселективных условиях под слоем вазелинового масла на 0,5 %-м мясопептонном агаре (МПА). Для изучения изменчивости по антибиотикообразованию все варианты «*P. batumici*» инокулировали в синтетическую ростовую среду. Культивирование проводили на качалке (220 об/мин) в колбах Эрленмейера объемом 750 мл при следующих условиях: 150 мл питательной среды, начальная концентрация клеток составляла  $1 \cdot 10^7$  кл/мл, температура — 25 °С, время культивирования — 72 ч.

Биосинтетическую активность клонов «*P. batumici*» проверяли с применением отработанной нами методики посева на МПА с помощью репликатора из расчета 5 клонов на чашку, используя высокочувствительную к батумину тест-культуру *Staphylococcus aureus* 209P (УКМ В-918, АТСС 6538P), то есть методом диффузии батумина в агар.

В соответствии с диаметром зон задержки роста стафилококков клоны условно разделяли на малоактивные — зона 5—20 мм, активные — 20—30 мм, с повышенной активностью — 30—40 мм и высокоактивные — 40—60 мм.

Количественно концентрацию антибиотика в культуральной среде определяли спектрофотометрическим методом. Культуральную среду экстрагировали хлороформом. Полученный экстракт упаривали в вакуум-испарителе при температуре 40—45 °С и далее его очищали методом тонкослойной хроматографии. Сорбент, содержащий батумин, снимали с хроматографической пластины и элюировали спиртом. Содержание батумина в полученном растворе определяли спектрофотометрически и рассчитывали по формуле [8]:

$$C = \frac{D \cdot P \cdot 10^4}{E^{1\%}}$$

где  $C$  — концентрация батумина, мг/л;  $D$  — оптическая плотность измеряемого раствора батумина при  $\lambda = 225$  нм;  $P$  — общее разведение пробы;  $E^{1\%}$  — коэффициент экстинкции 1%-го раствора батумина (равен 584);  $10^4$  — коэффициент пересчета концентрации на 1 л культуральной среды.

Результаты и обсуждение. На первом этапе нами исследована возможность увеличения синтеза батумина, используя в селекции сам целевой продукт. Методом ступенчатой селекции получены резистентные к разным концентрациям батумина (400, 800, 1200 и 2000 мкг/мл) варианты «*P. batumici*» 109, что было необходимо для проведения анализа зависимости их продуктивности от уровня резистентности к собственному антибиотику. Предполагалось, что в каждом случае вырастают только колонии, устойчивые к данной концентрации батумина и выше.

По мере повышения концентрации с 200 до 2000 мкг/мл выживаемость клеток падала. При концентрации 2000 мкг/мл формировались отдельные клоны с уровнем выживания 0,05 %. Резистентные к батумину формы отличались от чувствительных по морфологическим признакам: колонии меньших размеров, шероховатые, встречались также слизистые варианты. Для исследований отобрано 1359 клонов.

Проверка клонов «*P. batumici*» 109 на синтез антибиотика свидетельствовала о неодинаковом уровне биосинтеза антибиотика отдельными клетками. В популяции доминировали активные клоны (46,7 ± 3,1 %) и клоны с повышенной активностью (52,1 ± 3,4 %). У батуминрезистентных вариантов изменчивость степени активности клеток штамма-продуцента зависела от уровня резистентности к собственному антибиотику. С возрастанием уровня устойчивости к батумину увеличивалось количество клонов с повышенной активностью и высокоактивных клонов (рис. 1). Обращает на себя внимание факт полного исчезновения среди резистентных к 1200 и 2000 мкг/мл батумина форм активных вариантов и большой процент высокоактивных клонов.

В дальнейшей работе мы учитывали, что наиболее резистентные к батумину варианты должны иметь повышенную биосинтетическую активность. Поиск максимально активных вариантов проводили

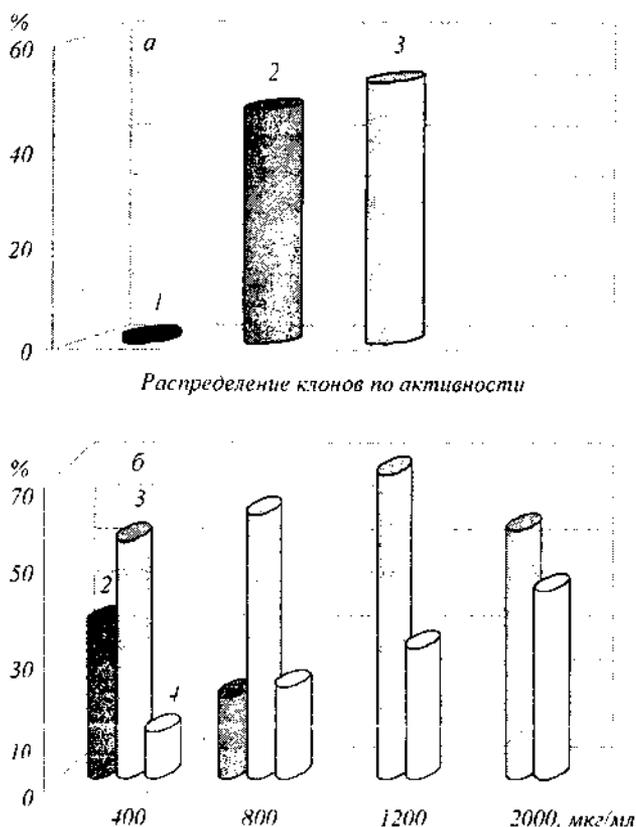


Рис. 1. Изменчивость степени активности клонов «*P. batumici*» 109, индуцированная батумином: 1 — малоактивные; 2 — активные; 3 — с повышенной активностью; 4 — высокоактивные (а — до селекции; б — после селекции)

среди 453 высокоактивных клонов, полученных в пяти независимых экспериментах и различающихся по уровню резистентности к антибиотику. Наибольшие зоны задержки роста *S. aureus* 209P (47 и 58 мм) обнаружены только у двух клонов — № 4 и № 9 с уровнем устойчивости 2000 мкг/мл (рис. 2). Эти клоны обеспечивали синтез на уровне 52—58 и 65—70 мг/л антибиотика соответственно. То есть по сравнению с природным штаммом «*P. batumici*» (выход батумина  $31,4 \pm 1,9$  мг/л) у полученных в опытах клонов «*P. batumici*» № 4 и № 9 достигнуто увеличение антибиотикообразования в среднем в 2—2,5 раза.

Поскольку стабильность уровня синтеза антибиотиков имеет важное практическое значение, мы исследовали стабильность варианта № 9 после селекции батумином через 20 и 60 дней хранения. При расसेве батуминрезистентного высокоактивного клона № 9 до моноклонов происходило существ-

венное перераспределение их по активности. Так, через 20 дней доминировали клоны с повышенной активностью ( $71 \pm 2,5$  %) и высокоактивные ( $29 \pm 1,4$  %), через 60 дней хранения эти соотношения изменялись, доминировали клоны с повышенной активностью и активные ( $53,7 \pm 2,1$  и  $43,5 \pm 1,9$  %), высокоактивные составляли всего  $2,8 \pm 0,004$  % (рис. 3). Эти соотношения имели место при хранении клона на среде без батумина, то есть в процессе хранения наблюдалась постепенная потеря активности. Культура по этому признаку возвращалась к исходному состоянию и синтезировала от 35 до 40 мг/л батумина. Аналогичная картина наблюдалась при изучении стабильности варианта № 4.

Проведенные эксперименты свидетельствуют о том, что батумин можно использовать для повышения биосинтетической активности собственного штамма-продуцента. Однако следует отметить, что полученные высокоактивные клоны характеризуются относительной стабильностью и поэтому могут быть использованы для наработки антибиотика только в лабораторных условиях.

Учитывая сообщения в литературе об успешном использовании для увеличения уровня выхода целевого продукта других антибиотиков, мы изучили влияние хлортетрациклина на синтез батумина. Тетрациклины принадлежат к классу антибиотиков, ингибирующих синтез белка за счет модификации белков трансляционного аппарата клетки-мишени [13, 14], а батумин относится к мембранотропным антибиотикам. [15, 16], из-за чего характер действия этих антибиотиков на клетки продуцента будет различным.

Методом ступенчатой селекции были получены резистентные к разным концентрациям хлортетрациклина (2, 20, 40 мкг/мл) варианты «*P. batumici*» 109. В предварительных экспериментах изучали выживаемость клеток «*P. batumici*» 109 в зависимости от уровня устойчивости. Как и предполагалось, с возрастанием уровня устойчивости к хлортетрациклину значительно снижалась выживаемость клеток продуцента. При концентрации антибиотика 2 мкг/мл количество выживших бактерий составило 8 %, при концентрации 20 и 40 мкг/мл — 0,8 и 0,05 % соответственно.

Результаты, полученные при исследовании соотношения клонов штамма-продуцента по степени их активности при воздействии хлортетрациклина, свидетельствуют о существенном росте в популя-

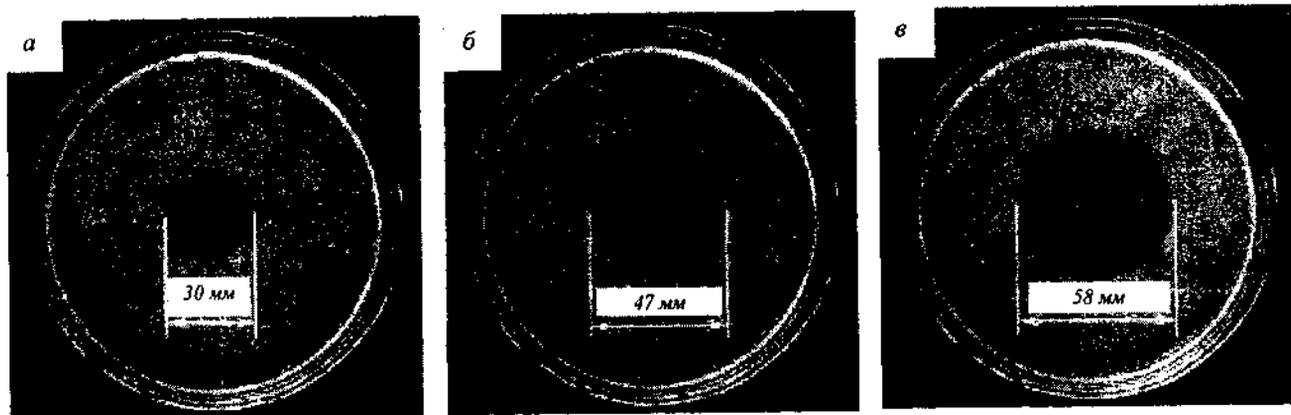


Рис. 2. Зоны подавления роста тест-культуры *S. aureus* 209P: а — штаммом «*P. batumici*» 109; б, в — устойчивыми к батумину вариантами клонов № 4 и № 9 с увеличенным уровнем биосинтеза антибиотика

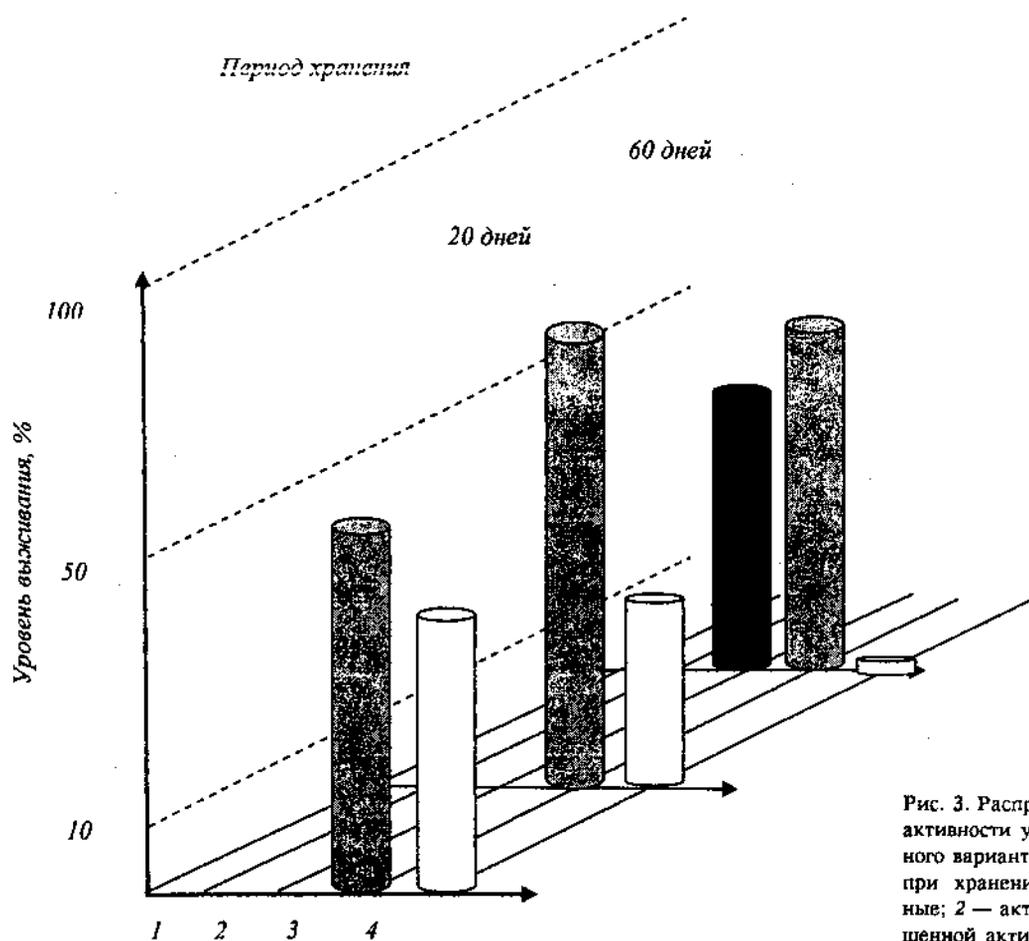


Рис. 3. Распределение клонов по активности у батуминрезистентного варианта «*P. batumici*» № 9 при хранении: 1 — малоактивные; 2 — активные; 3 — с повышенной активностью; 4 — высокоактивные

Распределение клонов штамма «*P. batumici*» 109 по степени активности под влиянием хлортетрациклина

Концентрация хлортетрациклина, мкг/мл	Количество просмотренных клонов	Содержание клонов в популяции, %		
		Малоактивные	Активные	С повышенной активностью
Контроль	105	1,2±0,06	46,7±2,8	52,1±3,1
2	122	0	47,5±2,9	52,5±3,0
20	125	0	24,7±1,5	75,3±4,1
40	118	0	10,8±0,9	89,2±5,0

ции клонов с повышенной активностью и снижении количества активных клонов. При этом высокоактивных клонов в популяции «*P. batumici*» не обнаружено (таблица).

Дальнейшая работа была посвящена выявлению максимально активных клонов по синтезу батумина среди клонов с повышенной активностью и уровнем выживания 0,8 и 0,05 %. Среди резистентных к хлортетрациклину вариантов (20 и 40 мкг/мл) для исследований было отобрано 760 клонов. Дифференциальный анализ клонов по синтезу батумина позволил обнаружить три клона — № 28, 53, 80 с диаметрами задержки роста *S. aureus* 209P 39, 35 и 37 мм соответственно в сравнении с 30 мм у «*P. batumici*» 109. Продуктивность этих клонов составляла 35—40 мг/л батумина, что несущественно превышало биосинтетическую активность «*P. batumici*» 109.

Хотя среди устойчивых к хлортетрациклину вариантов «*P. batumici*» 109 не обнаружены клоны с увеличенной биосинтетической активностью, антибиотик обладал некоторым селективным действием, очищая естественную популяцию от малоактивных и активных клонов.

Антибиотики часто являются цитотоксическими метаболитами для продуцирующих их бактерий. Устойчивость к ним многих штаммов-продуцентов определяется энергозависимыми эффлюксными системами, которые и выводят токсичные продукты из клетки [17—20]. Следует отметить, что повышение активности таких систем может вызывать увеличение выхода антибиотика. В частности, это продемонстрировано для 6-диметилхлортетрациклина [21], сурфактина и плипластина [22], фенаримол и пенициллина [23], цефалоспорины С [24].

На наш взгляд, повышение выхода антибиотика при селективных пассажах культуры на среде с

возрастающими концентрациями батумина обусловлено более активным выведением его из клеток — это основной механизм дезинтоксикации продуцента от собственного токсического продукта. Не исключено, что при этом увеличивается синтез антибиотика по механизму обратной связи, но решение этой крайне сложной проблемы выходит за рамки настоящей работы.

Положительный эффект хлортетрациклина, скорее всего, связан с отбором клеток с высокоактивными эффлюксными насосами. Возможно также, что «*P. batumici*» использует специализированный насос для выведения батумина, что хорошо согласуется с несколько различными эффектами присутствия в ростовой среде батумина и хлортетрациклина.

Таким образом, при исследовании особенностей действия батумина и хлортетрациклина на биосинтетическую активность штамма — продуцента антибиотика было показано, что батумин индуцирует появление высокоактивных клонов с повышенной продуктивностью в популяции «*P. batumici*» 109, в то время как хлортетрациклину свойственно всего лишь селективное действие, в результате которого увеличивается содержание клонов в популяции с повышенной активностью.

**Выводы.** Впервые для продуцента антистафилококкового антибиотика батумина показана возможность увеличения его синтеза при использовании в селекции самого целевого продукта.

Использование батумина в селекции штамма-продуцента позволило получить относительно стабильный продуцент с выходом батумина, увеличенным более чем в 2 раза.

При селекции штамма-продуцента хлортетрациклином высокоактивных клонов не обнаружено, хотя под действием этого антибиотика в популяции продуцента наблюдалось уменьшение количества

малоактивных и активных клонов и увеличение клонов с повышенной активностью. Хлортетрациклин обладал селективным действием, очищая естественную популяцию от малоактивных и активных клонов.

L. N. Churkina, A. N. Kravets, V. V. Klochko

Impact of inductive and selective agents on biosynthesis of new antistaphylococcal antibiotic batumin

#### Summary

Application of high concentrations of antistaphylococcal antibiotic batumin in order to increase biosynthetic activity of the own strain-producer allowed selecting variants with increased productivity. Clone *Pseudomonas batumici* No. 9 with maximum activity synthesized from 60 to 70 mg of batumin per l of culture medium, which was 2 times higher than the activity of the most productive natural strain-producer. However, after storage of this culture in non-selective conditions we noticed gradual decrease in the activity. Chlortetracycline possesses only selective influence, the result of which was raise in the content of clones with the increased activity in producer's population.

Keywords: batumin, chlortetracycline, strain-producer, *S. aureus*.

Л. Н. Чуркина, А. Н. Кравец, В. В. Ключко

Вплив індукуючих і селективних агентів на біосинтез нового антистафілококового антибіотика батуміну

#### Резюме

Використання високих концентрацій антистафілококового антибіотика батуміну для підвищення біосинтетичної активності власного штаму-продуцента дозволило відібрати варіанти з підвищеною продуктивністю. Максимально активний клон *Pseudomonas batumici* № 9 синтезував 60–70 мг/л батуміну, що в 2 рази перевищувало активність найпродуктивнішого природного штаму. Однак при зберіганні цієї культури в неселективних умовах спостерігалася поступова втрата активності. Хлортетрациклін, який використовували для збільшення виходу батуміну, притаманна селективна дія, в результаті чого зростає вміст клонів з підвищеною активністю.

Ключові слова: батумін, хлортетрациклін, штам-продуцент, *S. aureus*.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Esipov S. E., Kiprianova E. A. Batumin, a novel antibiotic produced by *Pseudomonas batumici* nov. sp. 3187 // 5th Int. Conf. on Chemical Synthesis of Antibiotics and Related Microbial Products: Abstr.—Budapest: Hung. Acad. Sci. publ., 1996.—P. 14.
2. Смирнов В. В., Чуркина Л. М., Носенко Г. А., Бідненко С. І., Артисюк О. І., Пустовалова Л. І., Кіпріанова О. А., Гарагуля О. Д. Эффективность диагностических дисков с батумином при идентификации та индикации стафилококков // Лекарська справа.—2002.—№ 5—6.—С. 27—31.

3. Witte W., Cuny C., Mollmann W. U. In vitro — Wirksamkeit von Batumin auf *Staphylococcus aureus* // Chemother. J.—1997.—6.—P. 48—50.
4. Smirnov V. V., Churkina L. N., Kiprianova E. A. Antibiotic batumin for diagnostics of staphylococci and treatment of *Staphylococcus aureus* nasal carriage Poster presentation // 10th Int. Symp. on Staphylococci and Staphylococcal infections: Abstr.—Tsukuba, 2002.—P. 130.
5. Смирнов В. В., Киприанова Е. А., Чуркина Л. Н. Антибиотик батумин в борьбе с госпитальной стафилококковой инфекцией // Междунар. науч. конф. «Актуальные вопросы борьбы с инфекционными болезнями».—Харьков, 2003.—С. 152.
6. Смирнов В. В., Киприанова Е. А., Гвоздяк О. Р., Гарагуля А. Д., Чуркина Л. Н., Проскуракова Н. Б., Харченко Л. А. Использование дисков с батумином для экспресс-идентификации стафилококков // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.—1999.—№ 5.—С. 77—80.
7. Смирнов В. В., Чуркина Л. Н., Кравец А. Н., Гарагуля А. Д. Некоторые особенности биосинтеза нового антистафилококкового антибиотика батумина // Антибиотики и химиотерапия.—1993.—38, № 4—5.—С. 3—5.
8. Смирнов В. В., Чуркина Л. Н., Перепныхатка В. И., Муквич Н. С., Гарагуля А. Д., Киприанова Е. А., Кравец А. Н., Довженко С. А. Получение высокоактивного штамма — продуцента антистафилококкового антибиотика батумина // Прикл. биохимия и микробиология.—2000.—36, № 1.—С. 55—58.
9. Тренина Г. А., Трутнева Е. М. Использование ристомицина при селекции активных вариантов *Proactinomyces Fructiferi* var. *Ristomycini* // Антибиотики.—1966.—№ 9.—С. 770—774.
10. Веселова С. И. Сравнительное изучение летального, селективного и мутагенного действия хлортетрациклина, окситетрациклина и стрептомицина на *Actinomyces aureofaciens* и *Actinomyces rimosus*. 1. Летальное и селективное действие хлортетрациклина, окситетрациклина на *Actinomyces aureofaciens* и *Actinomyces rimosus* // Генетика.—1967.—№ 12.—С. 73—79.
11. Hotta K., Takamura S. Visualization of potential antibiotic productivity of actinomycetes: Effect of antibiotics, amino acid analogues and shifp-down // ISBA'94: Int. Symp. Biol. Actinomycet.—Moscow, 1994.—P. 168.
12. Горбунова Н. А., Яковлева Е. П. Действие собственного антибиотика на продуцент имбрицина при выращивании на агаризованной среде // Антибиотики и химиотерапия.—2000.—45, № 5.—С. 6—8.
13. Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms // Arch. Microbiol.—1996.—165.—P. 359—369.
14. Brodersen D. E., Clemons W. M. Jr., Carter A. P., Warren R. J., Wimberly B. T., Ramakrishnan V. The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit // Cell.—2000.—103.—P. 1143—1154.
15. Смирнов В. В., Васюренко З. П., Чуркина Л. Н. Липиды // Стафилококки.—Киев: Наук. думка, 1988.—С. 34—65.
16. Смирнов В. В., Чуркина Л. Н., Васюренко З. П. Индукция антибиотиком АЛ-87 изменений в жирно-кислотном составе фосфолипидов и нейтральных липидов чувствительного к нему штамма *Staphylococcus aureus* 209P // Антибиотики и химиотерапия.—1988.—33, № 6.—С. 440—443.
17. Sundliffe E. How antibiotic-producing organisms avoid suicide // Annu. Rev. Microbiol.—1989.—43.—P. 207—233.

18. Ma Y., Patel J., Parry R. J. A novel valanimycin-resistance determinant (vlmF) from *Sreptomycetes viridifaciens* MG456-hF10 // *Microbiology*.—2000.—146.—P. 345—352.
19. Ryan B. M., Dougherty T. J., Beaulieu D., Chuang J., Dougherty B. A., Barrett J. F. Efflux in bacteria: what do we really know about it? // *Expert Opin. Invest. Drugs*.—2001.—10.—P. 1409—1422.
20. Skatrud P. L. The impact of multiple drug resistance (MDR) proteins on chemotherapy and drug discovery // *Prog. Drug. Res.*—2002.—58.—P. 99—131.
21. Dairi T., Aisaka K., Katsumata R., Hasegawa M. A self-defence gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in *Sreptomycetes aureofaciens* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.*—1995.—59.—P. 1835—1841.
22. Turner M. S., Helmann J. D. Mutations in multidrug efflux homologs, sugar isomerases, and antimicrobial biosynthesis genes differentially elevate activity of the sigmaX and sigmaW factors in *Bacillus subtilis* // *J. Bacteriol.*—2000.—182.—P. 5202—5210.
23. Andrade A. C., Van Nistelrooy J. G., Peery R. B., Skatrud P. L., De Waard M. A. The role of ABC transporters from *Aspergillus nidulans* in protection against cytotoxic agents and in antibiotic production // *Mol. and Gen. Genet.*—2000.—263.—P. 966—977.
24. Ullan R. V., Liu G., Casqueiro J., Gutierrez S., Banuelos O., Martin J. F. The ceft gene of *Acremonium chrysogenum* C10 encodes a putative multidrug efflux pump protein that significantly increases cephalosporin C production // *Mol. Genet. Genom.*—2002.—267.—P. 673—683.

УДК 615.33.015.4:579.861.2.07  
Надійшла до редакції 02.11.06