

Э. К. АФРИҚЯН

НОВЫЙ ПРОДУЦЕНТ АНТИБИОТИКА КОЛИСТИН

Среди антибиотиков, выделенных из различных видов спорообразующих бактерий, особое место занимают полимиксины. Все они получены из культур бактерий, объединяемых в группу *Vac. polymyxa-circulans*, и являются близко родственными веществами полипептидной природы. Изучению и применению антибиотиков группы полимиксинов посвящена обширная литература, а сведения о них обобщены в отдельных изданиях [1, 3, 18, 22].

Большой интерес к антибиотикам группы полимиксинов вызван исключительно ценным избирательным спектром действия на грамотрицательные бактерии. Единственным в своем роде является выраженное антибиотическое действие полимиксинов на бактерии группы синегнойной палочки. Они угнетают также и рост некоторых видов грибов [9, 19].

Различные препараты полимиксинов были всесторонне изучены, после установления их терапевтической активности некоторые из этих антибиотиков выпускаются промышленностью. Широкое внедрение полимиксинов в клиническую практику ограничивается их нефротоксичностью. В этой связи большой интерес вызвало открытие японскими авторами нового антибиотика из группы полимиксинов—колистина, обладающего слабой токсичностью по сравнению со всеми известными полимиксинами. Этот антибиотик находит сейчас самое широкое применение в ряде стран.

Дифференциация описанных продуцентов полимиксина и образуемых ими антибиотиков в течение долгого времени была весьма запутана и лишь в последнее время, благодаря успехам в области установления их химической природы, в этот вопрос была внесена определенная ясность. Описания культур — продуцентов полимиксинов являются неполными, а в ряде случаев крайне поверхностными. Один и тот же штамм продуцирует несколько полимиксинов. Полученные и изученные в течение ряда лет препараты полимиксинов оказались неоднородными, и в их составе было установлено наличие нескольких индивидуальных фракций, трактуемых сейчас как отдельные антибиотики. Наиболее полное изучение состава и структуры антибиотиков группы полимиксина выполнено японскими учеными Института белка в г. Осака [11].

В известной мере источником разногласий является слабая разработка систематики бактерий *Vac. circulans*—*polymyxa* и родственных видов, а также отсутствие общепринятых признаков дифференциации видов этой группы бактерий. В этой связи считаем необходимым дать имеющуюся характеристику культур продуцентов антибиотиков полимиксинов, учитывая, что этот вопрос не освещен в нашей литературе.

Почти одновременно в 1947 г. было сообщено об открытии двух новых антибиотиков. Один из них, названный аэроспорином, был выделен из культуры *Vac. aërosporus* [5, 6], другой—из *Vac. polymyxa* и назван полимиксином [7, 8]. Впоследствии было обнаружено, что *Vac. aërosporus* образует и два других антибиотика, родственных аэроспорину. Все они были близки с полимиксином. Родственными оказались и культуры продуцентов антибиотиков. Поэтому было предложено назвать аэроспорин полимиксином А, два других антибиотика из *Vac. aërosporus*—полимиксинами В и С, а оригинальный полимиксин из культуры *Vac. polymyxa*—полимиксином Д.

Культура продуцента полимиксина Д описана в литературе [20]. Вегетативные клетки 18-часовой бульонной культуры представлены, в основном, граммотрицательными организмами. Споры овальные, без строгой локализации, раздувают клетку. Культура на бульоне образует муть и клейкий осадок. Индол и сероводород не образует. Нитраты восстанавливает. Образует кислоту и газ на средах с глюкозой, лактозой и сахарозой. С использованием рамнозы образует кислоту без газа. Реакция на образование ацетилметилкарбинола положительна. Молоко коагулирует с образованием кислоты и газа. Крахмал гидролизует, кристаллические декстрины не образует.

О получении антибиотика циркулина из культуры, идентифицированной как *Vac. circulans*, было сообщено в 1948 г. [12, 15, 16]. По описанию авторов, культура продуцента образует кислоту без газа на средах с арабинозой, декстрином, галактозой, глюкозой, глицерином, инсулином, лактозой, фруктозой, мальтозой, маннитом, сахарозой, маннозой, раффинозой, рамнозой, салицином и ксилозой. Нитраты не восстанавливает. По другим свойствам культура приближается к группе *Vac. circulans-polymyxa*. Вскоре было установлено, что бактерии этой группы являются продуцентами ряда других антибиотических веществ типа полимиксинов [17, 22]. Название полимиксин было использовано для терминологии антибиотиков из группы бактерий *Vac. circulans-polymyxa* с обозначением их заглавными буквами латинского алфавита А, В, С, Д, Е и т. д. [21].

Хохлов и Силаев с сотрудниками [3, 4] из штамма *Vac. polymyxa* выделили новый антибиотик полимиксин. М. Кояма и др. [14] в 1950 г. выделили культуру, названную ими *Aerobacillus colistinus*, а впоследствии как *Vac. polymyxa* var. *colistinus*, которая продуцировала антибиотик колистин, именуемый также как колимицин (США, Франция) или коломицин (Англия). Этот антибиотик получил признание как наиболее перспективный для терапевтического использования, а его промышленное производство освоено в Японии, Европе и Америке.

С помощью современных методов препаративной химии в ранее описанных полимиксинах было установлено содержание смеси антибиотиков. Они были идентифицированы и выделены в индивидуально чистом виде. Сводные результаты работ [11] по изучению состава различных антибиотиков группы полимиксинов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Состав различных антибиотиков группы полимиксина

Антибиотики	ДАМК	Лейцин (Leu) Изолейцин (Ileu)	Треонин	Фенил- аланин	Серин	Жирная к-та
Полимиксин А	L D	D Leu	L	—	—	+
Полимиксин В ₁	6L	IL Leu	2L	ID	—	I МОК
Полимиксин В ₂	6L	IL Leu	2L	ID	—	I ИОК
Полимиксин С	+	—	+	+	—	+
Полимиксин Д	5L	IL Leu	3L	—	ID	I МОК
Полимиксин Е ₁ или колистин А .	6	IL, ID Leu	2L	—	—	I МОК
Полимиксин Е ₂ или колистин В	6L	IL, ID Leu	2L	—	—	I ИОК
Полимиксин М	6	I	3	—	—	МОК
Циркулин	6L	IL Ileu, ID Leu	2L	—	—	I МОК

Условные обозначения: ДАМК — α , γ -диаминоасляная кислота; МОК — (+) — 6 — метилоктановая кислота; ИОК — изооктановая кислота. В таблице указано количество остатков аминокислоты — числа в молекулярных соотношениях.

Ряд авторов считал родственным полимиксинам антибиотик полипептин, выделенный из штамма *Bac. krzeminiewsky*, признаваемого как разновидность *Bac. circulans* [10, 13]. Мы считаем, что имеющийся материал по этому вопросу не может служить основанием для подобного заключения.

Условия биосинтеза и выделения полимиксинов изучены во многих работах [3, 18, 22]. Однако сведения о высоких выходах антибиотиков, наиболее оптимальных условиях выращивания высокопродуктивных штаммов, а также эффективных методах выделения и очистки активного начала в них отсутствуют.

В настоящей работе изложены результаты работ по изучению выделенного нами нового продуцента колистина, а также условиям выделения и получения препаратов антибиотика, выполненных в лаборатории проф. Т. Судзуки в Институте белка в Японии и в Институте микробиологии АН Армянской ССР.

В период пребывания в Японии в 1965 г. в процессе изучения микрофлоры почв нами был выделен ряд культур группы *Bac. circulans-polymyxa*. Некоторые штаммы характеризовались выраженной антибиотической активностью, родственной полимиксинам. Особый интерес вызвал штамм, выделенный нами из бурых почв г. Икеда (пригород г. Осака). В результате дальнейшей селекции были получены активные продуценты и изучены условия образования и получения антибиотиков.

Этот штамм имеет ряд отличительных особенностей от описанных в литературе культур *Bac. polymyxa* и трактуется нами как разновидность — *Bac. polymyxa* var. *colistinus*.

Ниже излагаются морфо-физиологические особенности данной культуры.

Вегетативные формы—палочковидные клетки, одиночные, редко короткими цепочками. Подвижные перитрихи. Содержимое клеток—слабозернистое. Размеры $0,6-0,8 \times 4-7$ м. Споры продолговатые, эллипсоидные, $1,1-1,2 \times 1,6-2,0$ м. Располагаются в центре клетки, раздувая ее.

На твердых питательных средах образует колонии двух типов: прозрачные (S) и беловатые (R). Колонии гладкие, слизеобразующие, в среде не врастают, края ровные, у R-форм волнистые. Слабый рост на МПА и других средах со сложными белками. Обильный рост на средах с добавлением усвояемых углеводов и растительных субстратов (декстрин, кукурузная, соевая мука, сусло-агар).

На жидких средах—хороший рост без образования пленки. На ломтике картофеля—обильный гладкий беловато-кремовый рост со слабой мацерацией ломтика.

Усваиваются с образованием кислоты и обычно газа: глюкоза, арабиноза, рамноза, ксилоза, лактоза, раффиноза, сахароза, мальтоза, трегалоза, маннит, салицин; слабо—фруктоза, рибоза, манноза, целлобиоза, мелибиоза, инулин. Не усваивает галактозу, сорбозу, мелезитозу, глицерин, дульцит, сорбит, талозу, инозит. Желатин разжижает. Молоко слабо коагулирует и пептонизирует. Нитраты восстанавливает, крахмал гидролизует. Ацетилметилкарбинол образует. Реакции на выделение индола и сероводорода отрицательны. Каталазу и инвертазу образует, уреазу и редуктазу нет.

Аэроб, факультативный анаэроб.

Условия образования антибиотика были изучены на различных синтетических и других средах с добавлением естественных субстратов. Наибольший выход активного начала был отмечен на средах, содержащих кукурузную, соевую и овсяную муку в количестве 3—5%. Культура продуцента поддерживалась на двух агаризованных средах следующего состава (в % %):

Среда I	Среда II
Глюкоза — 0,8	Высушенный соевый бульон с триптофаном—1,0
Мясной экстракт — 1	Глюкоза — 2,0
NH_4Cl — 0,2	KH_2PO_4 — 0,05
	FeSO_4 — 0,001
	MnSO_4 — 0,001
	MgSO_4 — 0,05
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5
	CaCO_3 — 1,0

К указанным средам добавлялся агар в количестве 2%, исходный pH 7,0—7,2. Для получения антибиотика культура выращивалась на среде, содержащей (в % %) кукурузную муку—5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —2, CaCO_3 —1. Исходная реакция среды доводилась раствором едкого натрия до pH 7,0. При изготовлении вначале стерилизовалась кукурузная мука с водой, затем вместе с аммоний сульфатом и мелом—дважды при 1 атм.

30 мин. Среда разливалась по 1 л в 5-литровые колбы Эрленмейера, засеивалась по 50 мл односуточной культуры бактерий и инкубировалась при 28° на качалке с перемешиванием 150 об./мин. В этих условиях биосинтез антибиотика отмечался на третьи сутки и достигал максимума спустя 80—88 час. Выход антибиотика к этому времени достигал около 5000 ед./мл.

Титр антибиотика в культуральной жидкости определялся по отношению к стандартному штамму *V. coli* В, используемому в Японии для стандартизации препаратов колистина. Антибиотическая активность устанавливалась методом разведений на агаризованной среде в пробирках. Для этого в пробирки разливался МПА по 1 мл, который растапливался, и в нем производилась титрация 1 мл культуральной жидкости в серии пробирок. Агар скашивался и засеивался суспензией тест-организма. Параллельно титровался раствор колистина известной концентрации и сравнением определялась активность испытуемого образца.

В лабораторных условиях получение очищенных препаратов антибиотика осуществлялось следующим образом. Культуральная жидкость подкислялась до pH 2—2,5 добавлением концентрированной соляной кислоты и подвергалась центрифугированию для отделения биомассы.

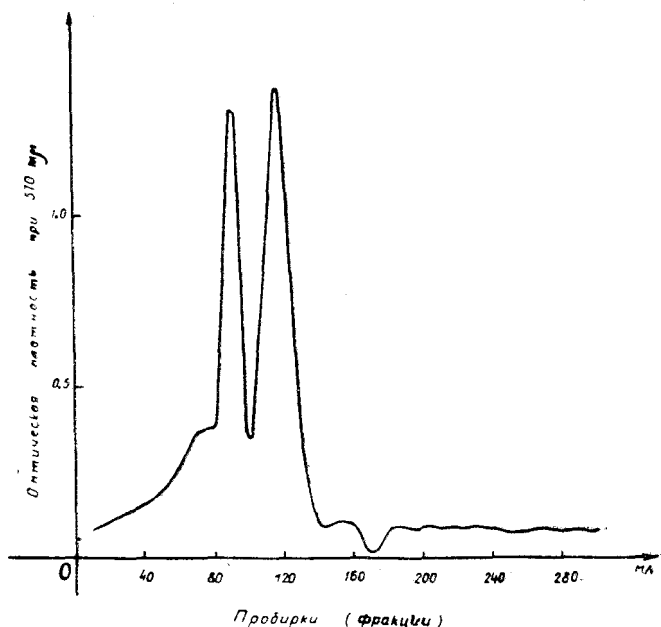


Рис. 1. Кривая распределения препарата антибиотика на противоточном аппарате Крейга. Объяснения в тексте.

Прибавлением к жидкости 2N NaOH антибиотик осаждался при pH 7—8 и адсорбировался на нейтральном угле, который вносился с расчета 10 г/л. Через стеклянный фильтр под умеренным вакуумом активированный уголь отделялся от жидкости, с прибавлением соляной кислоты производилась элюция антибиотика и перевод его натриевой соли в хлоргидрат. Применялся раствор 0,5 N HCl в 60° этаноле. Элюат концентри-

ровался в ротационном испарителе до порошковидного состояния и полученный препарат антибиотика подвергался дальнейшей очистке на автоматическом аппарате противоточного распределения из 300 сосудов. Фракционирование производилось в системе растворителей п-бутанол: сес-бутанол : 0,1 N HCl = 6 : 30 : 40, верхние и нижние фазы—по 10 мл. Образец вносился в 6—12 пробирки и производилось перемешивание в аппарате в количестве 1600—2000 циклов. Распространение белковой

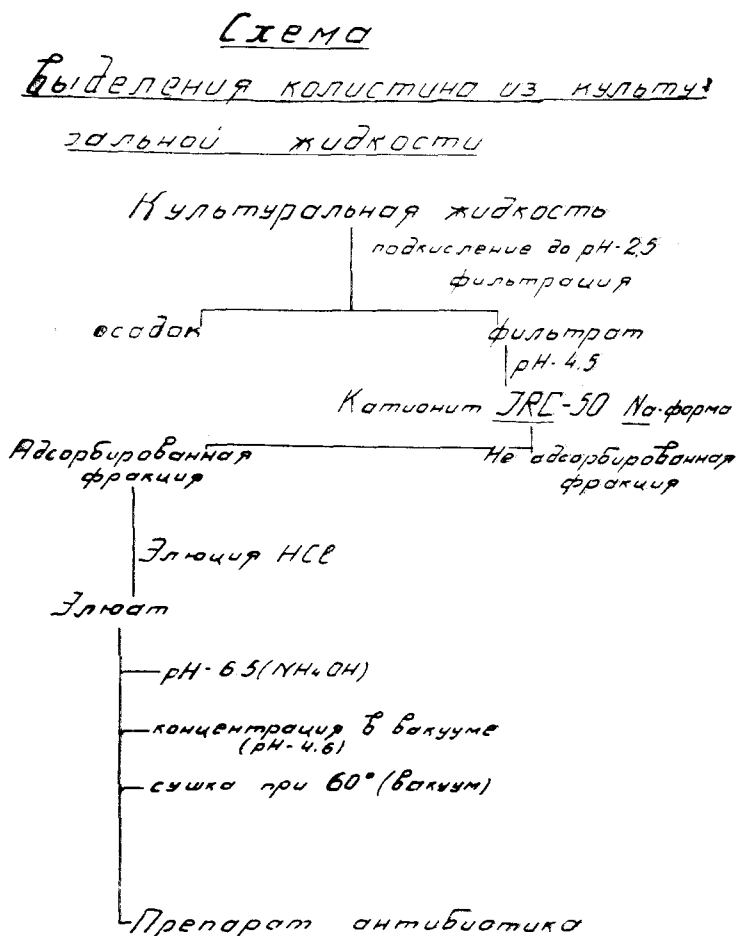


Рис. 2. Выделение неочищенного препарата колистина на ионообменных смолах.

фракции при 1683 циклах противоточного распределения показано на рис. 1. Наличие белка и его концентрация определялись нингидриновым методом на спектрофотометре при длине волны 570 мμ [23]. Содержимое пробирок в двух пиках белковых фракций было смешано в две партии и проверено на чистоту. Это производилось методом нисходящей бумажной хроматографии в течение 15 час. в системах п-бутанол: уксусная кислота : вода = 4 : 1 : 1 и п-бутанол : уксусная кислота : пиридин : вода = 30 : 6 : 20 : 24. Была использована хроматография на силикагеле в той же системе растворителей, а также электрофорез на бумаге в системе Биологический журнал Армении, XXI, № 4—2

муравьиная кислота : уксусная кислота : вода = 5 : 15 : 80 (рН 1,6) при 900 в. в течение 15—20 мин. Анализы обнаружили наличие в выделенных фракциях двух нингидринположительных пятен. Поэтому была проведена дальнейшая очистка на колонках (2×90 см) со смесью кремневой кислоты с целитом 2 : 1. Хроматография производилась в смеси п-бутанол : уксусная кислота : вода = 4 : 1 : 5 (вышележащий слой), к 100 мл которой добавлялось 5 мл пиридина. Скорость прохождения раствора—3 мл в течение 30 мин. Для дальнейшего изучения отбирались нингидринположительные фракции.

Получение антибиотика, названного нами условно препаратом № 39, из больших количеств культуральной жидкости осуществляется с помощью катионита по способу, показанному на рис. 2. Для повышения адсорбционной способности смолы и получения более очищенных препаратов при доведении рН фильтрата до 4,5 может быть использован анионит Dowex 2 в ОН—форме.

Таблица 2

Спектр антибиотического действия препарата № 39 и других полимиксиновых антибиотиков (размеры зон угнетения в мм от края наложенных кружочков*)

Культура тест-организмов	Полимиксин В	Полимиксин М	Колистин	Препарат № 39
<i>B. coli</i>	+	+	+	+
<i>B. thymifaciens</i> NCIB—8150	++	++	++	++
<i>Ps. aeruginosa</i> Bu—181	++	++	++	++
<i>Ps. fluorescens</i> Bu—295	++	++	++	++
<i>Flavobact. suavis</i> ATCC—858	+	—	+	±
<i>Brevibact. imperiale</i> Bu—397	+	±	+	±
<i>Klebsiella pneumoniae</i> Bu—084	+	++	+	+
<i>Aeromonas liquifaciens</i> Bu—521	+	+	+	+
<i>Chromobact. prodigiosum</i> ATCC—9986	++	++	++	+
<i>Bac. cereus</i> , штамм 617	+	—	+	±
<i>Bac. cereus</i> , шт. 815	—	—	—	—
<i>Bac. megaterium</i> , шт. 10	+++	++	+++	++
<i>Bac. coagulans</i> NCIB—8041	+	+	+	±
<i>Mycobact. sp.</i> , шт. В ₅	+	—	+	+
<i>Mycobact. sp.</i> , шт. НВ (Япония)	+	—	+	+
<i>Proactin. albus</i>	+	—	+	±
<i>Sacch. ellipsoideus</i>	+	—	—	—
<i>Willia sp.</i> , шт. 2	—	—	—	—
<i>Monilia sp.</i> , шт. 2	+	+	+	+
<i>Candida pseudotropicalis</i> ATCC—2512	++	++	—	—
<i>Asp. niger</i>	+	+	—	—
<i>Asp. terreus</i>	+	+	+	+

* Данные наложения фильтровальных кружочков, пропитанных в растворах антибиотиков—полимиксина В (США) — 7000 ед./мг, полимиксина М (ВНИИА, СССР), колистина (Япония) и препарата № 39—4000 ед./мг.

Размеры зон угнетения тест-объектов от края наложенных кружочков в мм: (+) — 1—3 мм, (++) — 4—6 мм, (+++) — более 6 мм, (—) — отсутствие зоны угнетения.

Нами было изучено действие полученных препаратов антибиотика на многие культуры разных видов микроорганизмов. В опытах использовались и препараты других полимиксиновых антибиотиков. Как по-

казывают данные табл. 2, спектр антибиотической активности препарата сходен с таковым у колистина; некоторые количественные различия следует отнести на счет использования препаратов различной активности. Препарат № 39 активно угнетает культуры бактерий группы кишечной палочки, некоторые виды спорообразующих бактерий, микобактерий, дрожжевых и грибных организмов. Отмечается характерная активность по отношению к неспороносным бактериям рода *Pseudomonas*. Кроме того, обнаруживаются качественные различия в спектре антибиотического действия препарата № 39 от полимиксина В и полимиксина М.

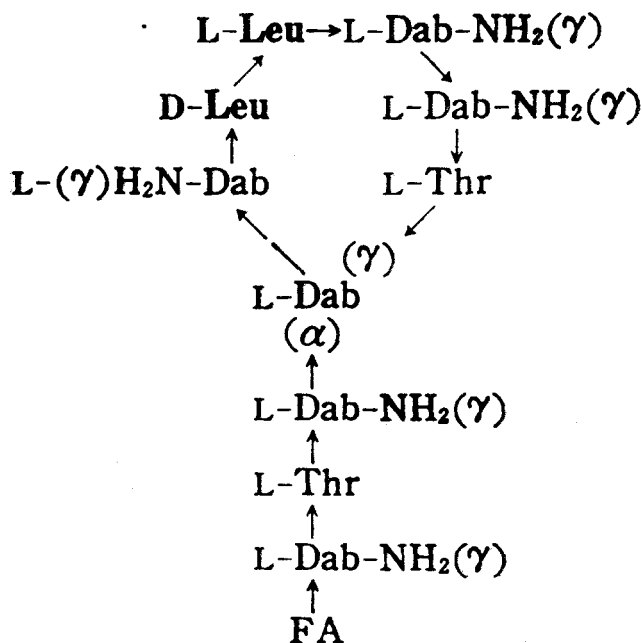


Рис. 3. Структура колистиновых антибиотиков. Колистин А — FA = остаток (+) 6 метилоктановой кислоты, колистин В — FA = остаток изооктановой кислоты, DAB = остаток α , γ -диаминомасляной кислоты.

В лаборатории проф. Т. Судзуки Института белка г. Осака группой сотрудников под руководством проф. К. Хаяши препарат № 39 был очищен до индивидуально чистой фракции, изучен его состав и строение. В результате проведенных исследований этот антибиотик был идентифицирован как колистин А, или полимиксин Е₁, содержащий в своем составе лейцин, треонин, аминокислотную и метилоктановую кислоты (рис. 3).

Է. Գ. ԱՅՐԻԿՅԱՆ

ԿՈԼԻՍՏԻՆ ԱՆՏԻԲԻՈՏԻԿԻ ՆՈՐ ԱՐՏԱԴՐԻԶ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ներկա աշխատության մեջ զետեղված են կոլիստին անտիբիոտիկի արտադրող նոր կոպտուրայի մորֆո-ֆիզիոլոգիական և բիոբիմիական հատկությունների ուսումնասիրության արդյունքները:

Մեկուսացված կոպտուրան դասվում է *Bac. polymyxa* տեսակին: Աշխատության մեջ բերված են տվյալներ, որոնք վերաբերում են կոլիստին անտիբիոտիկի ստացման և մաքրման մեթոդներին, ինչպես նաև այդ անտիբիոտիկի հակաբախտերիալ սպեկտրին:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. К. Бактерии-антагонисты и их применение. Ереван, 1959.
2. Ильинская С. А., Россовская В. С. Антибиотики, 3, 4, 10—13, 1958.
3. Хохлов А. С., Силаев А. Б. и др. Антибиотики, 5, 3, 1960.
4. Шемякин М. М., Хохлов А. С., Колосов М. Н., Бергельсон Л. Д., Антонов В. К. Химия антибиотиков. М., 1961.
5. Ainsworth G. C., Brown A. M., Brownlee G. Nature, 160, 263, 1947.
6. Ainsworth G. C., Pope C. G. Patent USA, № 2, 565057, 1951.
7. Benedict R. G., Langlykke A. F. J. Bact., 54, 24, 1947.
8. Benedict R. G. Patent USA, № 2571104, Chem. Ztbl., 124, 14, 2166, 1953.
9. Florestano H. J., Bahler M. E. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med., 79, 1, 141, 1952.
10. Garson W. et al. J. Bact., 58, 115, 1949.
11. Hayashi K., Suzuki T. Bull. Inst. Chem. Res. (Kyoto), 43, 3, 259, 1965.
12. Howell S. F. Fed. Proc., 48, 208, 1949.
13. Howell S. F. J. Biol. Chem., 186, 2, 863—877, 1950.
14. Koyama Y. et al. J. Antib. (Japan), 3, 457, 1950.
15. McLeod C. J. Bact., 56, 749, 1948.
16. Murray F. J. et al. J. Bact., 57, 305, 1949.
17. Nash H. A., Reynolds D. C. J. Bact., 61, 98, 1951.
18. Reunion d'un groupe d'étude sur les antibiotiques du groupe colistine-polymyxine. Ann. Institut Pasteur, № 4, Suppl., 1961.
19. Serri F. Comp. rend. Soc. de Biol., 143, 5—6, 362, 1949.
20. Stansly P. G., Schlosser M. E. J. Bact., 54, 549, 1947.
21. Stansly P. G., Brownlee G. Nature, 163, № 4146, 611, 1949.
22. Symposium on antibiotics derived from *Bac. polymyxa*. Ann. N. Y. Acad. Sci., 51, 853, 1949.
23. Yemm E. W., Cocking E. C. Analyst, 80, 209, 1955.