

УДК: 579.83

ПОИСК НОВЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ СРЕДИ БАКТЕРИЙ–СИМБИОНТОВ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

Житникова Агата Михайловна, Сергеев Дмитрий Александрович, Кейних Андрей Евгеньевич, Никулина Нелли Васильевна

Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет Минздрава России»
Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Широкое использование антибиотиков для лечения инфекционных заболеваний человека и животных привело к появлению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, что, в свою очередь, обусловило необходимость поиска продуцентов новых антибиотиков, эффективных в отношении резистентных штаммов. Результат анализа литературы показал, что в качестве источника продуцентов новых антибиотиков большинство ученых отдают предпочтение представителям нормальной микрофлоры беспозвоночных животных, главным образом, насекомых. **Цель исследования** – поиск продуцентов антибиотиков среди бактерий– симбионтов мокрицы обыкновенной (*Oniscus asellus*). **Материал и методы.** Наличие веществ, подавляющих рост бактерий определяли с помощью диско– диффузионного метода. Водным экстрактом из гомогената тела мокрицы пропитывали стерильные диски из фильтровальной бумаги, высушивали их в термостате при 37 градусах и помещали в центр чашек Петри с мясопептонным агаром, засеянных чистыми культурами кишечной палочки и стафилококка. О наличии противомикробной активности судили по образованию зоны задержки роста бактериальной культуры вокруг диска, пропитанного экстрактом гомогената *O. asellus*. **Результаты.** После инкубации посевов стафилококка и кишечной палочки при 37°C в течение 24 часов наблюдалась задержка роста бактерий вокруг дисков, пропитанных экстрактом *O. asellus*. **Выводы.** Полученные результаты указывают на присутствии в составе представителей нормальной микрофлоры мокрицы штаммов бактерий, являющихся продуцентами антибиотиков, активных в отношении стафилококка и кишечной палочки. В дальнейших исследованиях целесообразным является выделение чистых культур представителей нормальной микрофлоры *Oniscus asellus* и проведение аналогичных исследований по поиску продуцентов антибиотиков с каждым из выделенных штаммов для индикации и идентификации штаммов– продуцентов антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотики, резистентность, продуценты.

SEARCH FOR NEW ANTIBIOTIC PRODUCERS AMONG BACTERIA– SYMBIONTS OF INVERTEBRATES

Zhitnikova Agatha Mikhailovna, Sergeev Dmitry Alexandrovich, Keinikh Andrei Evgenievich, Nikulina Nelli Vasilevna

Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics
Ural State Medical University
Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. The widespread use of antibiotics for the treatment of human and animal infectious diseases has led to the emergence of antibiotic– resistant strains of microorganisms, which, in turn, has necessitated the search for producers of new antibiotics effective against resistant strains. The result of the literature analysis showed that most scientists prefer representatives of the normal microflora of invertebrates, mainly insects, as a source of producers of new antibiotics. **The aim of the study** is to search for antibiotic producers among the symbiont bacteria of the common woodlouse (*Oniscus asellus*). **Material and methods.** The presence of substances that inhibit bacterial growth was determined using the disco diffusion method. An aqueous extract from the body homogenate of woodlice was soaked in sterile filter paper discs, dried in a thermostat at 37 degrees and placed in the center of Petri dishes with meat– peptone agar seeded with pure cultures of *E. coli* and *Staphylococcus*. The presence of antimicrobial activity was judged by the formation of a growth retardation zone of the bacterial culture around a disk soaked in *O. asellus* homogenate extract. **Results.** After incubation of *Staphylococcus* and *E. coli* cultures at 37 °C for 24 hours, bacterial growth was delayed around discs soaked in *O. asellus* extract. **Conclusions.** The results obtained indicate the presence of bacterial strains in the composition of representatives of the normal microflora of woodlice, which are producers of antibiotics active against *Staphylococcus* and *E. coli*. In further studies, it is advisable to isolate pure cultures of representatives of the normal microflora of *Oniscus asellus* and conduct similar studies to find antibiotic producers with each of the isolated strains for indication and identification of antibiotic producing strains.

Keywords: antibiotics, resistance, producers.

ВВЕДЕНИЕ

Антибиотики – это вещества природного, полусинтетического или синтетического происхождения, подавляющие рост микроорганизмов или вызывающие их гибель [1].

Инфекционные болезни сопровождали человечество на протяжении всей его истории. Появление антибиотиков кардинально изменило жизнь людей. Способность одного вида микроорганизмов подавлять другие стали изучать с точки зрения возможного получения веществ, обладающих антимикробным действием для лечения инфекционной патологии у человека.

Ученые начали прицельный поиск микроорганизмов (грибов и бактерий), которые могут стать продуцентами антибиотиков. Эти поиски увенчались успехом, в период с начала 40–х до конца 80–х 20–го века были открыты все группы антибактериальных препаратов. Таким образом, середина 20–го века стала «золотой эрой» антибиотикотерапии. Антибиотики позволили эффективно лечить различные инфекционные болезни и осложнения. Наряду с вакцинопрофилактикой, именно антибиотикотерапия позволила существенно удлинить продолжительность жизни человека. Результатом стало изменение структуры заболеваемости и летальности у людей. Если 100 лет назад более 70% людей погибали от инфекций, то сегодня основными причинами смерти стали неинфекционные заболевания, такие как рак и патология сердечно–сосудистой системы.

Появление резистентных к антибиотикам штаммов бактерий начали фиксировать уже через 1–2 года после появления каждого нового препарата. Причиной развития резистентности является множество факторов, из которых к наиболее значимым относятся следующие:

- нерациональное использование антибактериальных препаратов, в том числе необоснованное назначение для лечения вирусных и легких бактериальных инфекций;
- применение антибиотиков широкого спектра в ситуациях, когда могут эффективно использоваться препараты с узким спектром действия;
- назначение антибактериальных препаратов без учета спектра возбудителей и их чувствительности;
- нарушение правил приема антибиотиков;
- свободная безрецептурная продажа антибактериальных препаратов в аптечной сети;
- широкое использование антибактериальных препаратов в пищевой и парфюмерной промышленности, в сельском хозяйстве и ветеринарии.

В 2014 году в Женеве Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сделала доклад, содержащий полную картину влияния традиционных антимикробных препаратов на бактерии с учетом данных, полученных из 114 стран. Картина получилась неутешительная: традиционные лекарственные препараты, включая антибиотики, оказались бесполезны либо слабы в отношении различных возбудителей инфекции.

В 2017 году ВОЗ опубликовала список критической группы бактерий, представляющих собой повышенную опасность. К ним относятся:

- Ацинетобактер (*Acinetobacter baumannii*),
- Синегнойная палочка (*Pseudomonas aeruginosa*),
- Энтерококки (*Enterococcus faecium*),
- Золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*),
- Хеликобактер пилори (*Helicobacter pylori*),
- Кампилобактеры (*Campylobacter*),
- Сальмонелла (*Salmonella*),
- Гонококк (*Neisseria gonorrhoeae*),
- Пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*),
- Гемофильная палочка (*Haemophilus influenzae*)
- Шигелла (*Shigella*).[2]

В настоящее время выделяют несколько типов резистентности, к особо опасным вариантам относят:

Мультирезистентность или полирезистентность – устойчивость некоторых штаммов бактерий больше, чем к трем классам антибактериальных препаратов.

Экстремальную резистентность – устойчивость ко всем антимикробным препаратам, кроме одного– двух классов.

Пан– резистентность – устойчивость ко всем антимикробным препаратам.

В результате по всему миру начали фиксировать появление супербактерий – микроорганизмов с множественной резистентностью. По оценкам экспертов, супербактерии к 2050 году унесут жизни 360 млн человек, если в мире не будут приняты меры для предотвращения их распространения [3].

Наряду с ограничением использования антибиотиков во всех сферах жизни человека, актуальным остается поиск новых продуцентов антимикробных препаратов.

Родона начальниками новых групп антибиотиков всегда являются вещества природного происхождения (природные антибиотики). Наиболее часто используемые продуценты природных антибиотиков представлены в таблице (Таблица 1).

Таблица 1.

Наиболее часто используемые продуценты антибиотиков

№ пп	Продуцент	Продуцируемый антибиотик
Бактерии		
1	Актиномицеты	стрептомицин, неомицин, канамицин, гентамицин, тетрациклин, эритромицин, олеандомицин, леворин, нистатин, новобиоцин, рифампицин.
2	<i>Bacillus brevis</i>	грамицидин С
3	<i>Bacillus polymyxa</i>	полимиксин В
4	<i>Serratia marcescens</i>	продигиозан
5	<i>Bacillus licheniformis</i>	бацитрацин
Грибы		
6	<i>Penicillium spp.</i>	пенициллин, Микроцид
7	<i>Cephalosporium spp.</i>	цефалоспорин
8	<i>Fusidium spp.</i>	фузидин
9	Растения	Хлореллин, новоиманин, Иманин,
10	Животные	Лизоцим

На протяжении десятилетий основным объектом поиска продуцентов новых антибиотиков была почва, представляющая сложное сообщество организмов разных систематических групп, из которых самыми перспективными и хорошо изученными продуцентами были актиномицеты [4]. В настоящее время поиск расширяется, и исследуются самые разнообразные биоценозы, например, донные отложения, микробиота кишечника

беспозвоночных, симбионты морских организмов, эндобионты растений, экскременты летучих мышей и другие объекты [5,8].

Одним из потенциальных источников новых противомикробных препаратов являются беспозвоночные животные, главным образом, насекомые. Интерес у исследователей вызывают как антимикробные пептиды, вырабатываемые самими насекомыми, так и вещества, которые продуцируются их симбиотическими микроорганизмами.

Симбионты насекомых — это микробы, которые живут в тесных, длительных отношениях со своим насекомым– хозяином. Симбионты могут быть обнаружены как в кишечнике, так и в специализированных клетках насекомого, называемых бактериоцитами. Некоторые симбионты размножаются на внешней поверхности насекомого или в среде его обитания, например, в его гнездах или пищевых продуктах. В настоящее время изучена антимикробная активность бактерий– симбионтов у 41 рода насекомых, в основном, перепончатокрылых (пчелы, осы, муравьи).

В то же время, остается широкое поле для дальнейших исследований других, менее изученных представителей беспозвоночных животных. Одним из мало изученных видов является мокрица обыкновенная *Oniscus asellus* – широко распространенный представитель членистоногих. Ранее мокрицу никто не рассматривал как источник бактерий– продуцентов антимикробных веществ. Эти животные неприхотливы, живут в самых разных регионах, мало подвержены заболеваниям. Найти мокрицу можно и зимой – во влажном помещении.

Вопреки бытующим представлениям, *O. asellus* не является насекомым. Ниже представлено таксономическое положение этого самого маленького и сухопутного ракообразного [3,4]:

Надцарство: *Eukaryota* = Эукариоты

Царство: *Animalia* = Животные

Подцарство: *Eumetazoa Butschli*, Настоящие многоклеточные животные

Раздел: *Bilateria Hatschek*, Двусторонне– симметричные

Подраздел: *Protostomia*, Первичноротые

Надтип: *Polymera*, Многосегментные, полимерные

Тип: *Arthropoda von Siebold et Stannius*, Членистоногие

Подтип: *Mandibulata Snodgrass*

Надкласс: *Crustacea Brünnich*, Ракообразные, раки

Класс: *Malacostraca Latreille*, Высшие раки

Подкласс: *Eumalacostraca Grobben*

Надотряд: *Peracarida Calman*

Отряд: *Isopoda Latreille*, Равноногие

Подотряд: *Oniscoidea Latreille*

Инфраотряд: *Ligiamorpha Vandel*

Надсемейство: *Oniscoidea Latreille*

Семейство: *Oniscoidea Latreille*

Мокрицы имеют продолговатое тело, 9– 13 миллиметров, с разделением на сегменты, цвет серый, коричневый, в некоторых местах желтоватый. Любят темные влажные места, в домах обитают в помещениях с повышенной влажностью (ванная комната, погреб, в щелях стен и шкафов). Питаются мокрицы слизью, налетом, плесенью, грязью, остатками пищевых продуктов. Размножаются они с весны до осени и могут давать по 5– 6 пометов в год. Самка вынашивает до 90 яиц. Живут они 9– 12 месяцев. На сегодняшний день насчитывается около 4500 видов мокриц.[4]

Цель исследования – поиск продуцентов антибиотиков среди бактерий– симбионтов мокрицы обыкновенной (*Oniscus asellus*)

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Требуемые материалы и оснащение:

Мокрицы замороженные (2 особи).

Физиологический раствор стерильный.

Пробирки.
Пипетки стеклянные градуированные стерильные.
Чашки Петри с мясо– пептонным агаром.
Бактериологические петли.
Горелки спиртовые.
Шпатели лабораторные стерильные.
Дозатор лабораторный.
Стерильные диски из фильтровальной бумаги.
Диски с антибиотиками стандартные.
Культура *Escherichia coli* (*E.coli*).
Культура *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*).
Вортекс.
Центрифуга.
Термостат.

Реактивы для окраски бактерий по Граму:

– генциановый фиолетовый, раствор Люголя, фуксин основной карболовый.

Наличие веществ, подавляющих рост бактерий определяли с помощью диско– диффузионного метода. Водным экстрактом из гомогената тела мокрицы пропитывали стерильные диски из фильтровальной бумаги, высушивали их и помещали в центр чашек Петри с мясопептонным агаром, засеянных чистыми культурами кишечной палочки и стафилококка. Для контроля наличия антибиотикорезистентности бактериальных культур на поверхность агара помещали стандартные диски с антибиотиками. Посевы выдерживали в термостате в течение 24 часов, после чего учитывали результаты. О наличии активности антибиотиков в отношении бактерий судили по образованию зоны задержки роста бактерий вокруг диска.

Ход определения

Замороженные мокрицы измельчали, суспендировали в 0,2 мл физраствора, интенсивно перемешивали суспензию на вортексе и осаждали нерастворимую фракцию центрифугированием. Надосадочной жидкостью гомогената пропитывали стерильные диски из фильтровальной бумаги диаметром 10 мм.

Делали посевы чистых культур *E.coli* и *S. epidermidis* на чашки Петри с мясопептонным агаром.

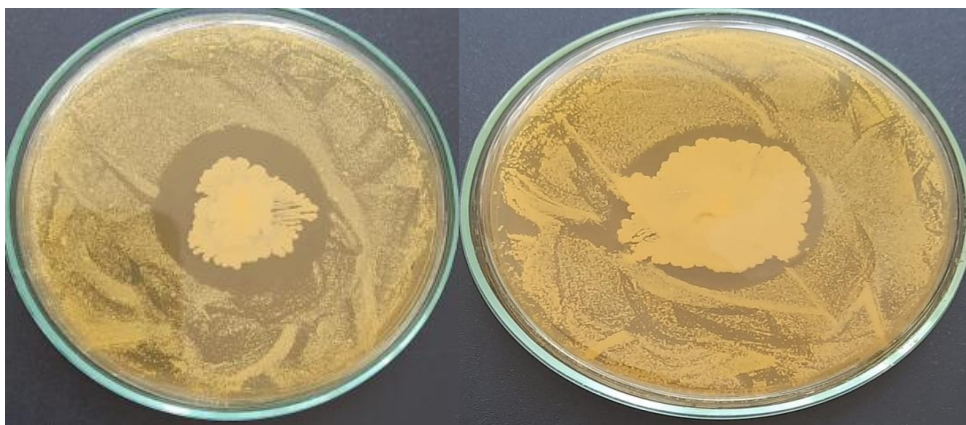
На поверхность агара в центр чашек Петри с посевами помещали диски, пропитанные экстрактом гомогената мокрицы.

Помещали на поверхность агара ближе к краю четыре стандартных диска с антибиотиками для контроля антибиотикочувствительности штаммов стафилококка и кишечной палочки.

Чашки Петри помещали в термостат при температуре 37° С на 24 часа. Через 24 часа учитывали результат – измеряли наличие и размеры зоны подавления роста вокруг дисков, пропитанных экстрактом гомогената мокрицы и стандартных дисков с антибиотиками.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Диско– диффузионный метод определения чувствительности бактерий к антибиотикам основан на регистрации зоны подавления роста бактериальной культуры вокруг бумажного диска, пропитанного антибиотиком. В наших исследованиях мы наблюдали отчетливые зоны подавления роста кишечной палочки и стафилококка вокруг стандартных дисков, пропитанных гентамицином, ампициллином, олеандомицином и линкомицином. Вокруг посевов экстракта гомогената *Oniscus asellus* также наблюдались зоны задержки роста бактериальных культур стафилококка и кишечной палочки (Рис. 1).



А

Б

Рис. 1. Зона задержки роста бактериальных культур кишечной палочки (А) и стафилококка (Б) вокруг посевов экстракта гомогената *Oniscus asellus*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Учитывая тот факт, что процесс приготовления экстракта гомогената мокрицы сопровождался многократным разбавлением продуктов жизнедеятельности представителей ее нормальной микрофлоры, полученные результаты могут свидетельствовать о наличии в экстракте веществ, обладающих антибактериальной активностью как в отношении стафилококка, так и в отношении кишечной палочки, присутствующих в низкой концентрации.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты указывают на присутствии в составе представителей нормальной микрофлоры мокрицы штаммов бактерий, являющихся продуцентами антибиотиков.

В дальнейших исследованиях целесообразным является выделение чистых культур представителей нормальной микрофлоры *Oniscus asellus* и проведение аналогичных исследований по поиску продуцентов антибиотиков с каждым из выделенных штаммов для индикации и идентификации штаммов– продуцентов антибиотиков.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Антимикробные химиотерапевтические препараты. Материалы для студентов по общей микробиологии. Пермский государственный медицинский университет им. Ак. Е.А.Вагнера [Электронный ресурс]. URL:<https://studfile.net/preview/16457118/page:2/> (дата обращения 12.02.2023)
2. Райков А. Глобальная проблема XXI века: «супербактерии» против человечества. – 2019.– [Электронный ресурс]. <https://naked-science.ru/article/sci/globalnaya-problema-xxi-veka?ysclid=le2z46r05w28089973> (дата обращения 13.02.2023)
3. Архив БВИ.– 2010. – [Электронный ресурс]. <http://bvi.rusf.ru/taksa/s0027/s0027238.htm> (дата обращения 14.02.2023.)
4. O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Rev Antimicrob Resist. 2014. <http://amr-review.org/Publications>.
5. Animal zoom. Обыкновенная мокрица. <https://animalzoom.ru/obyknovennaya-mokrica> (дата обращения 14.02.2023).
6. Berdy J. Bioactive microbial metabolites // J. Antibiot. – 2005. – V. 58, № 1. – P. 1– 26.
7. Laurence Van Moll. Microbial symbionts of insects as a source of new antimicrobials: a review// Critical Reviews in Microbiology.– 2021.– 47:5. P. 562– 79. DOI: 10.1080/1040841X.2021.1907302
8. Nordenfjall E. Isolation of antibiotic producing microorganisms by screening for antibiotic resistance // Nordenfjall Emma; Swedish University of Agricultural Sciences. – Uppsala, 2014. – P. 40

Сведения об авторах

А.М.Житникова – студент

Д.А.Сергеев – студент

А.Е.Кейних – студент

Н.В.Никулина – кандидат биологических наук, ассистент кафедры

Information about the authors

A.M. Zitnikjva– Student

D.A. Sergeev – Student

A.E. Keinikh – Student

N.V. Nikulina – Candidate of Sciences (Biology), Department Assistant