

Chromatografické štúdium antibiotických látok u kmeňov druhu *Aspergillus fumigatus* FRESENIUS

M. KUTKOVÁ, V. BETINA

*Oddelenie mikrobiológie Biologického ústavu Slovenskej akadémie vied,
Bratislava*

*Katedra mikrobiológie a biochémie Slovenskej vysokej školy technickej,
Bratislava*

U 21 kmeňov druhu *Aspergillus fumigatus* FRESENIUS sme chromatograficky študovali produkované antibiotiká, ktoré sme zaradili do tried a podtried metódou používanou na systematickú analýzu antibiotík [1]. Kmene sa vyznačovali veľkou heterogenitou v produkcii antibiotických látok. Veľku sme zistili 72 antibiotík zväčša s antibakteriálnym spektrom účinnosti, pričom mnohé z nich môžeme podľa chromatografického chovania považovať za identické. Pri niektorých kmeňoch sme antibiotiká zistili iba v kultivačnom médiu. U viacerých kmeňov sa antibiotiká nachádzali v mycéliu aj v médiu. Väčšina kmeňov však produkovala antibiotiká, ktoré zostávali v mycéliu a neuvolňovali sa do kultivačného média. Zistili sme produkciu antibiotík chromatograficky podobných spinulozínu (*Va.* podtrieda), gliotoxínu (*Vb.* podtrieda) a kyseliny helvolovej (*Vc.* podtrieda), ktoré sú známe ako metabolity *Aspergillus fumigatus* FRES. Ostatné antibiotiká odlišného zatriedenia sme zatiaľ bližšie neskúmali.

Chromatografia na papieri je jedna zo základných klasifikačných a identifikačných metód pri vyhľadávaní antibiotík [2].

V rámci štúdia variability druhu *Aspergillus fumigatus* FRES. sme sledovali v našej práci produkciu antibiotických látok. Dovedna sme preskúmali 21 kmeňov izolovaných z rozličných zdrojov a lokalít. Na chromatografickú klasifikáciu antibiotík sme použili postup vypracovaný v našom laboratóriu pre systematickú analýzu antibiotík pomocou chromatografie na papieri, podľa ktorého sa antibiotiká zaraďujú do piatich tried [1]. Výsledky sledovania variability morfológických znakov sú publikované súčasne [3].

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Označenie a pôvod kmeňov

Pracovali sme s 21 kmeňmi *Aspergillus fumigatus* FRES., ktoré boli označené takto: 9-83 (Peking, Čína 1956, z drôtu elektrického vedenia), 9-88 (Šanghaj, Čína 1956, zo vzduchu), 11-14 (Praha 1960, zbierkový kmeň), A-64 (Praha 1962, zbierkový kmeň), B-1 (Nanking, Čína 1959, z pôdy miešaného lesa), B-2 a B-3 (Sučou, Čína 1959, z pôdy parku), B-4 (Changdžou, Čína 1959, z pôdy čajových plantáží), E-87 (Bydgoszcz, Poľsko 1962, zbierkový kmeň), Gr-2 (Greifswald, NDR 1962, zbierkový kmeň), 9-109 (Rio de Janeiro, Brazília 1962, zbierkový kmeň), 9-122 (Baarn, Holandsko 1962, zbierkový kmeň),

PF-I, PF-II, PF-III a PF-IV (Praha 1962, z infikovaných liekov), K.Kl. (Praha 1962, z kožnej kliniky), 9-125 (Paríž, Francúzsko 1962, zbierkový kmeň), M-154 (Budapešť, Maďarsko 1963, z pôdy zemiakových polí), M-167 (Budapešť, Maďarsko 1963, z kompostu) a M-194 (Budapešť, Maďarsko 1963, zo záhradnej pôdy).

Charakteristika kmeňov

Všetky kmene zodpovedajú svojim makroskopickým a mikroskopickým vzhľadom Raperovmu—Thomovmu opisu pre druh *Aspergillus fumigatus* FRES. [4], ktorý patrí do skupiny *Aspergillus fumigatus* čelade *Aspergillaceae* s touto charakteristikou:

Kolónie na Czapkovom agare majú spočiatku biele sfarbenie. S vývojom kondionosičov postupne nadobúdajú zelené až tmavozelené sfarbenie, zriedkavejšie sa vo forme škvŕn alebo zón objavuje pieskové až škoricové sfarbenie. Takéto kolónie sú väčšinou zamatové, ploché, veľmi silne sporujúce. Niektoré kmene sú viac-menej vložkovité s meniacim sa množstvom vzdušného mycélia so spomalenou tvorbou kondionosičov a konídií. Opačná strana a substrát sú bezfarebné, ale často sa objavuje žlté sfarbenie, ktoré starnutím kultúry prechádza až do tmavočervených alebo hnedých odtieňov. Niekedy sa tvoria transpiračné kvapky jasnožltého až oranžového sfarbenia.

Konidionosiče sú obyčajne husto nazhromaždené, vyrastajú priamo z hýfy, postupne sa rozširujú do vezikula, najčastejšie flaškovitého tvaru. Vezikulus má v priemere 20,0 až 30,0 μm s typicky plodnou hornou polovicou. Sterigmy sú usporiadané v jednom rade, s osami zhruba paralelnými s osami kondionosičov o rozmeroch 4,0 až 13,0 μm \times 2,0 až 3,0 μm . Konídie sú v mase tmavozelené, jemne ostnaté, guľovité, v priemere 2,5 až 3,0 μm , extrémne 2,0 až 5,0 μm . Skleróciá alebo peritéciá sa nevyskytujú.

Chromatografické štúdium antibiotík

Kultúrou *Aspergillus fumigatus* FRES. sme naočkovali 130 ml tekutého modifikovaného Czapkovho média [10] v 500 ml Rouxových fľašiach a inkubovali sme pri 25 °C. Po 10 dňoch sme z filtrátu kultivačného média a z mycélia pripravili koncentráty metabolitov podľa postupu používaného v našom laboratóriu [11]. Tieto koncentráty sme použili na chromatografické štúdium antibiotík. Po predbežnom preskúšaní vhodných nanášok koncentrátu sme pristúpili k vlastnej chromatografii. „Sumárny chromatogram“ sme pripravili v základných štyroch sústavách: 1. voda, 2. *n*-butanol nasýtený vodou, 3. etylacetát nasýtený vodou, 4. benzén nasýtený vodou. Detegovali sme bioautograficky pomocou *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus pyogenes aureus*, *Candida albicans* a *Candida pseudotropicalis*. Všetky testovacie kmene (okrem *Staphylococcus pyogenes aureus*, ktorý sme získali z Ústavu epidemiológie a mikrobiológie v Bratislave) pochádzajú zo Zbierky mikroorganizmov Katedry mikrobiológie a biochémie SVŠT v Bratislave. Podľa zistených hodnôt R_F v základných sústavách sme zadelili antibiotiká podľa vypracovanej schémy [1] do tried a podtried.

Výsledky a diskusia

Výskyt antibakteriálnych a antifungálnych antibiotík v koncentrátoch z kultivačného média a z mycélia študovaných 21 kmeňov *Aspergillus fumigatus* FRES., ich chromatografickú klasifikáciu a antimikrobiálnu aktivitu uvádza v tab. 1.

Tabuľka 1

Antimikrobiálna aktivita a chromatografická klasifikácia antibiotík u 21 kmeňov
Aspergillus fumigatus FRES.

Chromatografické podtriedy a aktivita*

Kmeň	Výskyt**	Ia	Ic	IIc	IIIa	IIIb	IVa	IVb	IVc	Va	Vb	Vc
9-83	F M						2 2	2		2		1
9-88	F M			2				2 1			1 12	1
11-14	F M						2 1 3					1234
A-64	M						12					2
B-1	M						12 4					12345
B-2	F M				2	234	12 1234	1 12 4			2 5 234	2 5 12
B-3	F M							2				123
B-4	F M								12			1 123
E-87	F M				12		12				1	12 4
Gr-2	F M				12		12	1			2	12
9-109	F M	4	1		2 1		2				1	
9-122	F M				1		2 12					123
PF-1	F M				2		12					12
PF-II	F M						12				1 12	12
PF-III	F M				12345 123		12 45 123	12 4 12			1234 123	12 4 1234
PF-IV	M						123					123
K.Kl.	M						12					12
9-125	F M				2		2 12	2				2
M-154	F M			1	234 123		12	12	1			
M-167	M						2			2		12
M-194	F M				1234 12		12	12			2 4 12	

* Aktivita:

1. *Bacillus subtilis*,
2. *Staphylococcus pyogenes aureus*,
3. *Candida albicans*,
4. *Candida pseudotropicalis*,
5. *Escherichia coli*.

** Výskyt:

- F — koncentrát z kultivačného média,
M — koncentrát z mycélia.

V tab. 2 je uvedený celkový výskyt antibiotík z jednotlivých tried a podtried použitej chromatografickej klasifikácie [1].

V tab. 3 je rozdelenie antibiotík podľa chromatografickej klasifikácie a podľa zisteného antimikrobiálneho spektra.

U druhu *Aspergillus fumigatus* FRES. sa doteraz opísali tieto antibiotické

Tabuľka 2

Chromatografická klasifikácia antibiotík v koncentrátoch z kultivačného média a z mycélia 21 kmeňov *Aspergillus fumigatus* FRES.

Podtriedy	Antibiotiká prítomné		
	v médiu	v mycéliu	v médiu a v mycéliu súčasne
<i>Ia</i>	1	—	—
<i>Ib</i>	—	—	—
<i>Ic</i>	1	—	—
<i>IIa</i>	—	—	—
<i>IIb</i>	—	—	—
<i>IIc</i>	1	1	—
<i>IIIa</i>	5	1	4
<i>IIIb</i>	1	—	—
<i>IVa</i>	—	12	6
<i>IVb</i>	3	3	3
<i>IVc</i>	1	1	—
<i>Va</i>	—	2	—
<i>Vb</i>	—	3	5
<i>Vc</i>	—	15	3
Spolu	13	38	21

Tabuľka 3

Rozdelenie antibiotík na základe aktivity a systematickej chromatografickej analýzy

Účinnosť na	Spolu	Antibiotiká patriace do tried													
		I			II			III		IV			V		
		<i>Ia</i>	<i>Ib</i>	<i>Ic</i>	<i>IIa</i>	<i>IIb</i>	<i>IIc</i>	<i>IIIa</i>	<i>IIIb</i>	<i>IVa</i>	<i>IVb</i>	<i>IVc</i>	<i>Va</i>	<i>Vb</i>	<i>Vc</i>
huby	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
baktérie	48	—	—	1	—	—	2	7	—	13	7	2	2	5	9
huby a baktérie	23	—	—	—	—	—	3	1	5	2	—	—	3	9	—
Spolu	72	1	—	1	—	—	2	10	1	18	9	2	2	8	18

látky [5, 6]: fumigatín $C_8H_8O_4$, spinulozín $C_8H_8O_5$, kyselina helvolová $C_{32}H_{42}O_8$, gliotoxín $C_{13}H_{14}N_2O_4S_2$, kyselina kójová $C_6H_6O_4$ prevažne s antibakteriálnym účinkom a fumagilín $C_{30}H_{40}O_7$, aktívny na fágy a améby. Nedávno bol objavený trypacidín $C_{18}H_{16}O_7$ [7], antibiotikum so špecifickým antiprotozoálnym účinkom. Ako ďalšie metabolity sa v literatúre uvádzajú kyselina fumarová [8], etylénoxid, ergosterol, dehydroergosterol, ergosterolperoxid, L-propyl-L-leucínanhydrid [9].

Z uvedených antibiotík sa chromatografickou metódou [1] študovali a hodnotili kyselina kójová, ktorá patrí do *Ia*. podtriedy, spinulozín, patriaci do *Va*. podtriedy, gliotoxín, patriaci do *Vb*. podtriedy, a kyselina helvolová, patriaca do *Vc*. podtriedy. Antibiotiká fumagilín a trypacidín bez antibakteriálnej a antifungálnej aktivity, ako aj fumigatín, ktorý bol nedostupný pre našu prácu, bližšie sa neskúmali, ani neboli zatriedené.

Na základe výsledkov chromatografického štúdia sme nezistili antibiotikum z *Ia*. podtriedy, podobné kyseline kójovej, avšak zistili sme antibiotikum z *Va*. podtriedy, podobné spinulozínu (u kmeňov 9-83 a M-167), antibiotikum z *Vb*. podtriedy, podobné gliotoxínu (u kmeňov 9-88, B-2, E-87, Gr-2, 9-109, PF-II, PF-III a M-194), a antibiotikum z *Vc*. podtriedy, podobné kyseline helvolovej (u kmeňov 9-83, 9-88, A-64, B-2, B-4, Gr-2, PF-I, PF-II, K.Kl., 9-125 a M-167). Okrem toho sme zistili výskyt látok odlišného zatriedenia týchto podtried: *Ia*, *Ic*, *Iic*, *IIIa*, *IIIb*, *IVa*, *IVb*, *IVc* a *Vc*. Väčšina antibiotík patrila do *IVa*., *Va*. a *IIIa*. podtriedy.

Prevažná časť kmeňov sa vyznačovala antibakteriálnou aktivitou a iba menšia časť antibakteriálnou a antifungálnou aktivitou súčasne.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ ИЗ ШТАММОВ ВИДА *ASPERGILLUS FUMIGATUS* FRESENIUS

М. Куткова, В. Бетина

Отдел микробиологии Биологического института Словацкой академии наук,
Братислава

Кафедра микробиологии и биохимии Словацкого политехнического института,
Братислава

Для 21 штамма вида *Aspergillus fumigatus* FRES. хроматографически изучались образовавшиеся антибиотики, которые были распределены нами на группы и подгруппы методом, использующимся для систематического анализа антибиотиков. Штаммы были различного происхождения и проявляли большую неоднородность в отношении образования антибиотиков. В общем нашли 72 антибиотика, в большинстве случаев обладающих антибактериальным эффектом, причем многие из них можно на основе хроматографического поведения считать тождественными. Для некоторых штаммов мы нашли антибиотики только в культивационной среде. Другие штаммы продуцировали антибиотики, которые были найдены в мицелиях и в культивационной среде.

Для большинства штаммов мы нашли антибиотики только в мицелиях. Нашли мы образование антибиотиков, хроматографически подобных спинулозину (*Va* подгруппа), глитоксину (*Vb* подгруппа) и гелволовой кислоте (*Vc* подгруппа), которые известны как метаболиты *Aspergillus fumigatus* FRES. Остальные антибиотики, относящиеся к другим группам, мы пока ближе не изучали.

Preložila T. Dillingerová

CHROMATOGRAPHIC STUDY OF ANTIBIOTICS PRODUCED BY STRAINS OF THE SPECIES *ASPERGILLUS FUMIGATUS* FRESENIUS

M. Kutková, V. Betina

Department of Microbiology, Biological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Department of Microbiology and Biochemistry, Slovak Polytechnical University, Bratislava

21 strains of *Aspergillus fumigatus* FRES. were studied for their ability to produce antibiotics. Antibiotics were classified into the classes and subclasses by means of the paper chromatographic method used for a systematic analysis of antibiotics. The strains were of different origin and their abilities to produce antibiotics were very heterogenous. 72 substances possessing mainly antibacterial activity were found. Many of them were chromatographically identical. Some strains produced antibiotics which were found only in the cultivation media. Other strains produced antibiotics which were found both in their mycelia and cultivation media. However, the majority of strains produced antibiotics which remained in their mycelia and were not excreted into the cultivation media. The production of antibiotics chromatographically related to spinulosin (*Va* subclass according to the Ref. 1), gliotoxin (*Vb* subclass) and helvolic acid (*Vc* subclass) was established. The mentioned antibiotics are known to be metabolites of *Aspergillus fumigatus* FRES. Other antibiotics with a different chromatographic classification were also found, but they were not studied in more detail.

Preložil V. Betina

LITERATÚRA

1. Betina V., *J. Chromatography* **15**, 379 (1964).
2. Betina V., v sborníku *Chromatographic Reviews*, Vol. 7, 121 (Editor M. Lederer), Elsevier, Amsterdam 1965.
3. Kutková M., *Kandidátska dizertačná práca*. Biologický ústav SAV, Bratislava 1965.
4. Thom C., Raper K. B., *A Manual of the Aspergilli*, 148. Williams-Wilkins Co., Baltimore 1945.
5. Šemjakin M. M., Chochlov A. S., Kolosov M. N., Bergelson L. D., Antonov V. K., *Chimija antibiotikov I, II*, 95, 166, 433, 513, 881. Izdatelstvo Akademii nauk SSSR, Moskva 1961.
6. Korzybski T., Kuryłowicz W. *Antybiotiki — pochodzenie, rodzaje i właściwości*, 801, 808, 854, 868, 871. Państwowe wydawnictwo naukowe, Warszawa 1959.

7. Balan J., Ebringer L., Nemeč P., Kováč Š., Dobias J., *J. Antibiotics A16* (4), 157 (1963).
8. Vörös J., Ubrizsy G., *A penészgombák — Mucorales, Hyphomycetes*, 31. Akadémiai kiadó, Budapest 1960.
9. Miller M. W., *The Pfizer Handbook of Microbial Metabolites*, 59, 166. McGraw-Hill, New York—London 1961.
10. Betina V., Nemeč P., Dobias J., Baráth Z., *Folia microbiol.* 7, 353 (1962).
11. Baráth Z., Betina V., Nemeč P., *J. Antibiotics A17*, 144 (1964).

Do redakcie došlo 24. 1. 1966

V revidovanej podobe 4. 3. 1966

Adresa autorov:

PhMr., prom. biol. Marta Kutková, CSc., Oddelenie mikrobiológie Biologického ústavu SAV, Bratislava, Jánska 1.

Doc. inž., prom. biol. Vladimír Betina, CSc., Katedra mikrobiológie a biochémie SVŠT, Bratislava, Jánska 1.