

ВПЛИВ *IN VITRO* АДАПТАЦІЇ ДО БЕНЗИЛПЕНІЦИЛІНУ НА БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Перетятко О.Г., Ягнюк Ю.А., Скляр Н.І.,
Крестецька С.Л.,
Большакова Г.М., Холодна Т.В.

ДУ «Інститут мікробіології та імунології
ім. І.І. Мечникова Національної академії медичних
наук України», м. Харків

Вступ. Стійкість до антимікробних препаратів представляє глобальну світову проблему, яка однаковою мірою стосується як розвинених країн, так і тих, що розвиваються. На сьогодні в усьому світі через неефективність лікування інфекцій, викликаних антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів, щороку помирають щонайменше 700 000 людей [1 – 3].

Формування та поширення антибіотикорезистентності мікроорганізмів є неминучим наслідком еволюційного процесу і одним з проявів адаптації бактерій до несприятливих умов існування. Ефективною формою адаптації є біологічна пластичність, що дозволяє однаковим за генотипом бактеріям у відповідь на вплив зовнішнього середовища створювати різні фенотипи. Така мінливість не є спадковою, однак має ключове значення у збереженні популяції бактерій та лежить в основі стратегії розвитку резистентності до антибіотиків [4 – 5]. Для стримування та подолання антибіотикорезистентності необхідно вивчення закономірностей її еволюції, виявлення факторів, що сприяють реалізації даного процесу, встановлення найбільш значимих чинників впливу на підвищення або зниження рівня резистентності.

У зв'язку з вищевказаним, вивчення біологічних властивостей мутантних варіантів бактерій з селекціонованою *in vitro* резистентністю до антибіотиків, є важливим для усвідомлення фундаментальних закономірностей еволюції антибіотикорезистентності мікроорганізмів.

Метою роботи було вивчення біологічних властивостей штамів *Staphylococcus aureus* зі сформованою *in vitro* резистентністю до бензилпеніциліну.

Матеріали та методи. Об'єкти дослідження: 12 чутливих до антибіотиків різних груп музейних штамів *Staphylococcus aureus*, що зберігались у колекції музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» у ліофілізованому стані за помірно низьких температур (4–6 °C). Для відновлення життєздатності ліофілізованих зразків вміст ампули розчиняли 1,0 мл поживного бульйону, мікробну суспензію висівали на кров'яний агар, посіви інкубували при температурі 37 °C протягом 24 годин [6]. Визначення чутливості мікробних культур до антибіотиків проводили диско-дифузійним методом Keurby-Bauer та методом серійних розведень у бульйоні [7]. У досліджах використовували бульйон та агар Мюллера-Хінтона (HiMedia, Індія); стандартні комерційні диски з антибіотиками: ампіциліном,

ампіциліном-сульбактамом, еритроміцином, азитроміцином, тобраміцином («Аспект», Україна), цефазоліном, цефуроксимом, цефтазидимом, цефепімом, цефокситином, тетрацикліном, доксицикліном, ко-тримоксазолом, рифампіцином, кліндаміцином («Фармактив», Україна), ампіциліном-сульбактамом, норфлоксацином, ципрофлоксацином, левофлоксацином, гатіфлоксацином, гентаміцином, амікацином, хлорамфеніколом, ванкомицином, лінезолідом (HiMedia, Індія); антибіотики: бензилпеніцилін, хлорамфенікол («Київмедпрепарат», Україна), ампіцилін, ампіцилін-сульбактам («Фармакс Груп», Україна), цефазолін, цефуроксим, тетрациклін, доксициклін («Борщагівський ХФЗ», Україна), цефепім, гентаміцин, амікацин («Лекхім», Україна), тобраміцин («Юрія-Фарм», Україна), цефтазидим («Сандоз ГмбХ», Австрія), еритроміцин («Amdipharm Limited», Ірландія). Адаптацію стафілококів до бензилпеніциліну проводили шляхом пасажування на агарі Мюллера-Хінтона, зі зростаючими концентраціями бензилпеніциліну, починаючи з суббактерицидної. Для інокуляції використовували мікробну суспензію щільністю 0,5 за стандартом Мак-Фарланда, розведену в 10 разів, посівна доза складала 5×10^7 КУО/мл. Для контролю життєздатності мікроорганізмів використовували агар Мюллера-Хінтона без додавання антибіотика. Для подальших пасажів відбирались культури, які давали ріст в присутності найбільшої концентрації антибіотика. Культури пересівали на поживні середовища із вищою у 2-4 рази концентрацією бензилпеніциліну, в цілому проведено 30 пасажів. Кінетику росту штамів вивчали шляхом вирощування мікробної суспензії щільністю 1,0 за шкалою McFarland у бульйоні Мюллера-Хінтона при температурі 37 °C, з визначенням оптичної щільності досліджуваних зразків через 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 і 48 годин культивування за допомогою приладу Densi-La-Meter (довжина хвилі 540 нм). Біохімічні властивості стафілококів визначали з використанням API системи ID 32 STAPH (Bio-Merieux, Франція). Всі досліди проводили у двох паралелях при однакових умовах культивування. Статистичну обробку отриманих даних проводили з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.1 (StatSoft Inc., США, серійний номер – AGAR909E415822FA).

Результати та обговорення. Всі взяті у дослід штамми стафілококів при культивуванні на середовищі Мюллера-Хінтона без додавання антибіотика утворювали округлі, опуклі або плоскі колонії S – форми кремового або жовтого кольору, розміром 2–4 мм. При культивуванні на середовищі зі зростаючими концентраціями антибіотика спостерігалась зміна характеру росту досліджених штамів, що проявлялось у колоніальному поліморфізмі, обумовленому появою значної кількості колоній D-форми розміром 1–1,5 мм та пригніченням здатності до пігментування (рис. 1).

При концентрації бензилпеніциліну у середовищі 0,0312 мкг/мл штамми *S. aureus* 16559 (№ 3), *S. aureus* 16569 (№ 4), *S. aureus* 16567 (№ 5) майже

втратили здатність до пігментування. Решта штамів, представлених на рисунку, а саме – *S. aureus* 16552 (№1), *S. aureus* 16557 (№2), *S. aureus* 16572 (№6), *S. aureus* 16573 (№7), *S. aureus* 16577 (№8), *S. aureus* 428 (№9) та *S. aureus* 54 (№10) при вказаній

концентрації бензилпеніциліну зберігали здатність утворювати пігмент, а при збільшенні концентрації антибіотика до 0,0625 мкг/мл спостерігалось значне зниження пігментування.



Рисунок 1. Характеристика пігментування штамів *S. aureus* при культивуванні на середовищах з різними концентраціями бензилпеніциліну

Нами визначено також ростові властивості штамів стафілококів до проведення адаптивної селекції, при значеннях мінімальної бактерицидної концентрації (МБцК) бензилпеніциліну 0,250 мкг/мл, що свідчить про формування резистентності, а також після 30-ти кратного пасажування на середовищі з

антибіотиком. При вирощуванні стафілококів на поживних середовищах зі зростаючими концентраціями антибіотика спостерігалось достовірно значиме ($p < 0,05$) зниження кількості колонієутворюючих одиниць, у порівнянні з показниками культур досліджених штамів на середовищах без антибіотика (табл. 1).

Таблиця 1. Показники ростових властивостей штамів стафілококів на різних етапах адаптивної селекції до бензилпеніциліну

Показники росту (КУО/мл, lg)				
до адаптації	при досягненні МБцК 0,250 мкг/мл		після циклу адаптації	
M±m	M±m	p ₁	M±m	p ₂
2,4± 0,05	1,7± 0,04	<0,05	0,6± 0,02	<0,05

Примітка. p₁ – достовірність при порівнянні показників КУО/мл до адаптації та при досягненні МБцК 0,250 мкг/мл; p₂ – достовірність при порівнянні показників КУО/мл до адаптації та після циклу адаптації.

Негативний вплив адаптивної селекції на стафілококи підтверджено також дослідженнями по вивченню кінетики росту культур *S. aureus* (рис. 2).

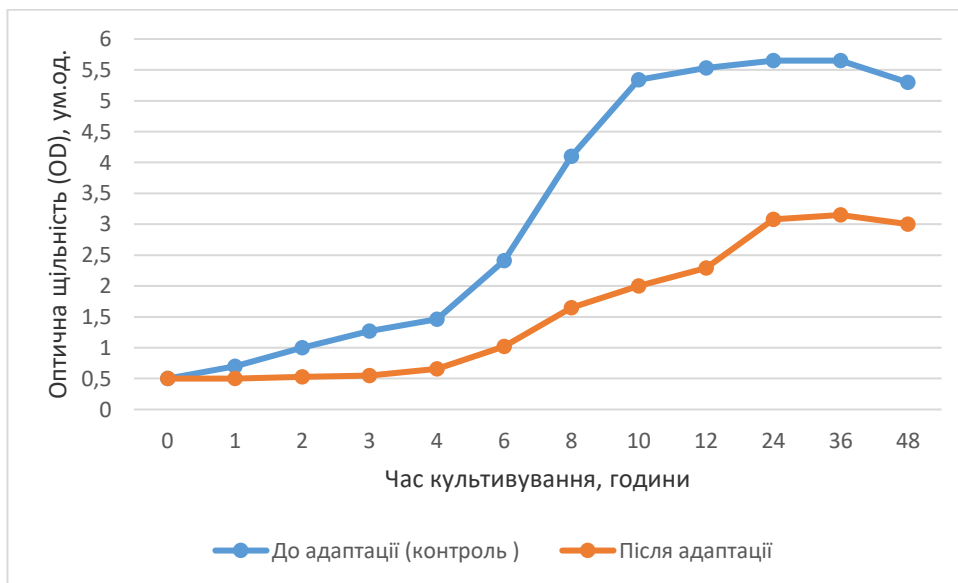


Рисунок 2. Вплив селективної адаптації *S. aureus* до бензилпеніциліну на кінетику росту

Встановлено, що для досліджуваних штамів стафілококів зі сформованою резистентністю до бензилпеніциліну була характерна зміна показників кінетики росту. Так, тривалість лаг-фази у зазначених штамів складала три год, у той час, як до проведення адаптивної селекції резистентності – 0,5 год. Максимальні значення показників росту адаптованих до бензилпеніциліну штамів у експоненціальній фазі досягали 3,15 OD₅₄₀, у той час як контрольні значення дорівнювали 5,65 OD₅₄₀ (p<0,05). Тривалість стаціонарної фази та час появи ознак регресії росту співпадали у обох досліджуваних групах.

Всі штами, взяті у досліді для моделювання набутої *in vitro* резистентності до бензилпеніциліну, були чутливими не тільки до бета-лактамінів, але й до антибіотиків інших груп – до аміноглікозидів, макролідів, тетрациклінів, фторхінолонів, глікопептидів, лінкозамінів, рифампіцину, хлорамфеніколу та ко-тримоксазолу. Після 30-ти пасажів селективної адаптації було вивчено рівень чутливості досліджених штамів до вищезазначених антибіотиків. За результатами досліджень встановлена можливість формування перехресної резистентності у адаптованих до бензилпеніциліну штамів. Так, у штаму *S. aureus* (16567) адаптація до бензилпеніциліну супроводжувалась набуттям резистентності до макролідів (мінімальна інгибуюча концентрація (МІК) еритроміцину – 2 мкг/мл), тетрациклінів (МІК тетрацикліну – 4 мкг/мл, МІК доксицикліну – 4 мкг/мл), та хлорамфеніколу (МІК – 16 мкг/мл). Штам *S. aureus* (16572) після циклу адаптивної селекції до бензилпеніциліну виявився резистентним до макролідів (МІК еритроміцину 4 мкг/мл) та тетрациклінів (МІК тетрацикліну – 4 мкг/мл, МІК доксицикліну – 2 мкг/мл). У штаму *S. aureus* (16577) з'явилась резистентність до аміноглікозидів (МІК гентаміцину – 2 мкг/мл, МІК амікацину – 16 мкг/мл, МІК тобраміцину – 2 мкг/мл) та макролідів (МІК еритроміцину 4 мкг/мл) а у штаму *S. aureus* 428 – до тетрациклінів (МІК тетрацикліну – 8 мкг/мл, МІК доксицикліну – 4 мкг/мл). Всі досліджені штами зберігали чутливість до цефокситину, ванкоміцину,

рифампіцину, ко-тримоксазолу, лінезоліду, кліндаміцину та антибіотиків групи фторхінолонів.

Слід зазначити, що при культивуванні штамів, адаптованих до високих концентрацій бензилпеніциліну, на середовищі без антибіотика відбувалось поступове (від 8 до 14 пасажів) відновлення втрачених біологічних властивостей. Тому, на наш погляд, у аберантних форм стафілококів стійкість до антибіотиків пов'язана з формуванням тимчасового фенотипу, який при відсутності селективного тиску ревертується у чутливий. Але для більш детального вивчення механізмів набуття антибіотикорезистентності *in vitro* та її втрати потрібно проведення досліджень на молекулярно-генетичному рівні.

Виявлені нами фенотипові відмінності адаптованих до високих концентрацій бензилпеніциліну субпопуляцій *S. aureus*, на наш погляд, слід розглядати як морфо-функціональну перебудову бактеріальних клітин під впливом антибактеріальних сполук. Отримані нами дані узгоджуються з позиціями інших дослідників, які розглядають бактеріальну популяцію як динамічну саморегулюючу гетероморфну й поліфункціональну систему з високим адаптаційним потенціалом, спрямованим на збереження виду [9 – 12].

Висновки. За результатами проведених досліджень встановлено, що формування у стафілококів набутої *in vitro* резистентності до бензилпеніциліну супроводжувалось зниженням ростових властивостей, втратою здатності до пігментоутворення, а також зміною чутливості до інших груп антибіотиків.

Influence of *in vitro* adaptation to benzylpenicillin on biological properties of *Staphylococcus aureus*
Peretyatko O.G., Yagnyuk Yu.A., Sklyar N.I., Krestetska S.L., Bolshakova G.M., Kholodna T.V.

Introduction. Antimicrobial resistance is a global problem that equally affects both highly developed countries and those that are developing. The formation

and spread of antibiotic resistance to microorganisms are the unavoidable consequence of the evolutionary process and one of the manifestations of the bacteria adaptation to unfavorable conditions to exist. To contain and overcome antibiotic resistance is necessary to study the process of its evolution, identify factors that contribute the implementation of this process and establish the most significant factors of influence to increasing or decreasing the level of resistance. **The aim** of the work was to study the biological properties of *Staphylococcus aureus* with resistance to benzylpenicillin, formed *in vitro*. **Materials and methods.** Research objects: 12 different groups of museum strains of *Staphylococcus aureus* that were sensitive to antibiotics from the museum collection of the microorganisms in NU "IMI NAMN". The sensitivity of microbial cultures to antibiotics was determined by the disk-diffusion method of Keurby-Bauer and by the method of serial dilutions in broth. Staphylococci's adaptation to benzylpenicillin was carried out by passage on Mueller-Hinton agar with increasing of the antibiotic concentrations, starting with subbactericidal. The kinetics of strain growth was studied by growing a microbial suspension with a density of 1.0 according to the McFarland scale in Muller-Hinton broth at a temperature of 37 °C, with the determination of the optical density of the studied samples after 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36 and 48 hours of cultivation using a Densi-La-Meter device (wavelength 540 nm). Biochemical properties of staphylococci were determined using the API system ID 32 STAPH. Statistical processing of the obtained data was carried out using Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.1 computer programs (StatSoft Inc., USA, serial number - AGAR909E415822FA). **Research and discussion.** During cultivation on the environment with increasing concentrations of the antibiotic, there was observed a change in the nature of the growth of the studied strains – the prevalence of D-form colonies with a size of 1-1.5 mm, the suppression of the ability to form pigments and the decrease of number of colony-forming units (in comparison with the growth indicators of the strains on the environment without the antibiotic). The negative impact of the adaptive selection of resistance to benzylpenicillin on staphylococci was also confirmed by studies of the growth kinetics of the studied strains of *S. aureus*: lengthening of the lag-phase to 3 hours against 0.5 hours in the control. And a decrease in the maximum values of growth indicators in the exponential phase to 3.15 OD₅₄₀, versus 5.65 OD₅₄₀ in the control (p<0.05). According to the results of studying the antibiotic sensitivity of the adapted to benzylpenicillin *S. aureus* in four strains was found cross-resistance in various combinations to other groups of antibiotics – to macrolides (MIC of erythromycin - from 2 µg/ml to 4 µg/ml), to tetracyclines (MIC of tetracycline - from 4 µg/ml to 8 µg/ml; MIC of doxycycline – from 2 µg/ml to 4 µg/ml), to aminoglycosides (MIC of gentamicin – 2 µg/ml, MIC of amikacin – 16 µg/ml, MIC of tobramycin – 2 µg/ml) and to chloramphenicol (MIC – 16 µg/ml). When the strains that were adapted to high concentrations of benzylpenicillin were cultivated in an environment without the antibiotic, there was a gradual (from 8 to 14 passages) restoration of the lost biological properties.

DOI: 10.5281/zenodo.8324731

Therefore, in our opinion, resistance to antibiotics in aberrant forms of staphylococci is associated with the formation of a temporary phenotype, which reverts to a sensitive one in the absence of selective pressure. The research at the molecular genetic level is required for a more detailed study of the mechanisms of acquisition of antibiotic resistance *in vitro*. In our opinion, found phenotypic differences of *S. aureus* subpopulations, that adapted to high concentrations of benzylpenicillin, should be considered as a morpho-functional reorganization of bacterial cells under the influence of antibacterial compounds. The data we obtained are consistent with the positions of other researchers, who consider the bacterial population as a dynamic self-regulating heteromorphic and polyfunctional system with a high adaptation potential, aimed at preserving the species. **Conclusion.** According to the results of the conducted research, it was established that the formation of resistance to benzylpenicillin for staphylococci *in vitro* was accompanied by a decrease in growth properties, a loss of the ability to form pigments, and also a change in sensitivity to other groups of antibiotics.

Keywords. Museum strains, *Staphylococcus aureus*, adaptation to benzylpenicillin *in vitro*, antibiotic sensitivity, biological properties.

Referenses

1. Coque T. M., Cantón R., Pérez-Cobas A. E., Fernández-de-Bobadilla M. D., Baquero F. Antimicrobial Resistance in the Global Health Network: Known Unknowns and Challenges for Efficient Responses in the 21st Century. *Microorganisms*. 2023. Vol. 11(4). P. 1050. doi: 10.3390/microorganisms11041050
2. EClinicalMedicine. Antimicrobial resistance: a top ten global public health threat. *EClinicalMedicine*. 2021. Vol. 41. P. 101221. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101221.
3. Mancuso G., Midiri A., Gerace E., Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens. *Pathogens*. 2021. Vol. 10, No. 10. P. 1310. doi: 10.3390/pathogens10101310
4. Andryukov B. G., Somova L. M., Matosova E. V., Lyapun I. N. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review). *Sovremennye tehnologii v medicine*. 2019. Vol. 11(2). P. 164–182. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.2>
5. Rong M, Zheng X, Ye M, Bai J, Xie X, Jin Y He X. Phenotypic Plasticity of *Staphylococcus aureus* in Liquid Medium Containing Vancomycin. *Front. Microbiol*. 2019. Vol. 10. P. 809. doi: 10.3389/fmicb.2019.00809
6. Romanko M. Y., Ushkalov V. O., Paliy A. P., et al. Physiological activity of *Salmonella* spp. bacteria after lyophilization and rehydration. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2022. Vol. 32(2). P. 158–163.
7. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 11.0. 2021. <http://www.eucast.org>
8. Standardization of preparation of microbial suspensions: information sheet. Auth. : Volyanskiy Y. L., Myronenko L. G., Kalinichenko S. V., Sklyar N. I.,

Kolokolova O. B., Tkach L. M., Peretyatko O. G. Kyiv, Ukrmedpatentinform, 2006. 7 p..

9. Andryukov B. G., Somova L. M., Matosova E. V., Lyapun I. N. Phenotypic plasticity as a strategy of bacterial resistance and an object of advanced antimicrobial technologies (review). *Sovremennyye tehnologii v medicine*. 2019. Vol. 11(2). P. 164–182. <https://doi.org/10.17691/stm2019.11.2.2>

10. Van Teeseling M. C. F., de Pedro M. A., Cava F. Determinants of bacterial morphology: from fundamentals to possibilities for antimicrobial targeting. *Front Microbiol.* 2017. Vol. 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01264.2>

11. Kysela D. T., Randich A. M., Caccamo P. D., Brun Y. V. Diversity takes shape: understanding the mechanistic and adaptive basis of bacterial morphology. *PLoS Biol.* 2016. Vol. 14(10). doi:10.1371/journal.pbio.1002565

12. Rong M, Zheng X, Ye M, Bai J, Xie X, Jin Y He X. Phenotypic Plasticity of *Staphylococcus aureus* in Liquid Medium Containing Vancomycin. *Front. Microbiol.* 2019. Vol. 10. P. 809. doi: 10.3389/fmicb.2019.00809