УДК 615.33(076.5) (075.8)

Л.П. ТРЕНОЖНИКОВА, А.Х. ХАСЕНОВА,
А.С. БАЛГИМБАЕВА, С.Ш. ШАКИЕВ, М.А. АКЫЛОВА

ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕЗА АНТИБИОТИКА А-70, ВЫСОКОАКТИВНОГО ПРОТИВ КОККОВЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ, И ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ОБРАЗОВАНИЯ АКТИВНОГО ВЕЩЕСТВА

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК

Наиболее оптимальными для биосинтеза антибиотика А-70 являются органические среды с дрожжевым экстрактом, кукурузным экстрактом, гороховой мукой, овсяной мукой и пептоном, при культивировании на которых отмечена высокая величина антибактериальной активности культуральной жидкости в отношении кокковых тест-микроорганизмов. Полученные данные свидетельствуют о высокой значимости состава питательных сред для биосинтеза антибиотика А-70.

Резистентность возбудителей инфекционных заболеваний к антибиотикам является возрастающей проблемой в клинической медицине. Эффективность многих антибактериальных препаратов, традиционно используемых для лечения инфекционных болезней, снижается из-за возрастающего распространения устойчивых штаммов бактерий [1-3]. Конец XX и начало нынешнего века ознаменовались устойчивой тенденцией к преобладанию грамположительных микроорганизмов в нозологической структуре как внутри-, так и внебольничных инфекций [4,5]. Так, с конца 90-х годов прошлого столетия в спектре госпитальной флоры отделений интенсивной терапии и реанимации (ОИТР) на первое место стали выходить грамположительные аэробные и анаэробные полирезистентные кокки: метициллинрезистентные стафилококки – *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Staphylococcus epidermidis* (MRSE), пенициллинрезистентные стрептококки (PRS), и ванкомицинорезистентные энтерококки (VRE) [6,7]. Грамположительные бактерии, прежде всего MRSA и PRS, стали ведущими возбудителями внутрибольничных пневмоний, регистрируемых в США и Европе со смертностью 20-50%, а в ОИТР – до 70-90%.

В последнее время наблюдается беспрецедентное увеличение распространенности MRSA. В течение многих лет метициллинорезистентные стафилококки рассматривались исключительно как госпитальные патогены, однако в последнее время ситуация изменилась в худшую сторону, эти микроорганизмы все чаще вызывают внебольничные инфекции. Практически важной особенностью метициллиноустойчивых стафилококков является высокая частота ассоциированной устойчивости к антибактериальным препаратам разных групп. MRSA нечувствительны ко всем беталактамным антибиотикам: пенициллинам, в том числе ингибиторозащищенным, цефалоспоринам I-IV поколений и карбапенемам. Чаще всего наблюдают ассоциированную устойчивость к аминогликозидам, макролидам и линкозамидам. Увеличение численности и широкое распространение резистентных штаммов грамположительных микроорганизмов привело к тому, что в лечении вызванных ими инфекций использовались преимущественно гликопептиды, основным представителем которых является ванкомицин. Однако появившиеся в 1996 г. штаммы S.aureus с недостаточной чувствительностью к ванкомицину (VISA) и нарастание числа требуют развития новых подходов к лечению грамположительных инфекций [8]. Необходимо создание новых эффективных лекарственных препаратов, в настояшее время в процессе разработки находятся несколько групп антибиотиков, в том числе для лечения полирезистентных грамположительных инфекций – эверномицины, стрептограмины и даптомицины.

В Институте микробиологии и вирусологии КН МОН РК получен комплексный антибиотик А-70, высокоактивный против клинических кокковых возбудителей инфекций: стафилококков, стрептококков, микрококков, энтерококков и аэрококков с различными типами устойчивости к лекарственным препаратам. Антибиотик А-70 представляет собой комплекс соединений группы пептолидов-гетеропептидолактонов, в его составе обнаружены этамицин А и новые, ранее не известные компоненты. Антибиотик А-70 оказывает выраженный лечебный эффект для опытных зараженных мышей на модели экспериментальной стафилококковой (MRSA) инфекции, а также вызывает увеличение продолжительности жизни зараженных мышей

Целью данного исследования было изучение условий биосинтеза антибиотика А-70 на синтетических и органических средах и подбор оптимальной среды для получения стабильных по составу и высокоактивных партий антибиотика.

Материалы и методы

Для получения спорового материала штамм актиномицета ИМВ 70 выращивали в течение 10 дней при температуре 28°С на картофельно-декстрозном агаре.

Глубинное культивирование штамма актиномицета ИМВ 70 осуществляли в два этапа. Вегетативный посевной материал выращивали в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180-200 об/мин) при температуре 28°С в течение 48 часов. Количество посевного материала, использованного для инокулирования посевной среды, составляло 1% (суспензия спор 10^9/мл).

Состав посевной среды А4 (%): глюкоза-1,0; соевая мука-1,0; NaCl-0,5; $CaCO_3$ - 0,25.

Количество инокулюма для засева ферментационной среды составляло 3% (вегетативный мицелий). Биосинтез антибиотика осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180-200 об/мин) при температуре 28° С в течение 96 часов.

Изучение условий биосинтеза антибиотика А-70 проводили на 6 синтетических и 33 органических средах, используемых для ферментации антибиотиков. Состав сред приведен в г/л.

Синтетические среды:

1 среда – синтетическая среда Ваксмана: глицерин-30,0; K_2HPO_4-1,0; $MgSO_4$ x $7H_2O$ -0,5; KCl-0,5; $FeSO_4$x 7 H_2O -0,01; $NaNO_3$ -2,0; pH 7,2-7,4.

2 среда – синтетическая среда Красильникова: глюкоза-20,0; $MgSO_4$ x $7H_2O$ -0,5; K_2HPO_4-1,0; NaCl -0,5; KNO_3 -1,0; $CaCO_3$ -3,0; pH 7,0.

3 среда – крахмало-аммиачная среда: крахмал-10,0; K_2HPO_4-1,0; NaCl -1,0; $(NH_4)_2SO_4$ -1,0; $CaCO_3$ -3,0; pH 7,0.

4 среда – среда 52/6: глюкоза-5,0; крахмал нерастворимый – 10,0; KNO_3 -2,0; $MgSO_4$ x $7H_2O$ -0,25; K_2HPO_4-0,2; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; NaCl -5,0; KNO_3 -1,0; $CaCO_3$ -1,0; pH 7,0.

5 среда: глюкоза 30,0; NaCl -2,0; NH_4Cl – 0,8; K_2HPO_4- 0,5; $CaCO_3$ - 5,0; pH 7,0.

6 среда: глюкоза – 30,0; KNO_3 - 4,0; K_2HPO_4- 0,2; NaCl – 1,0; $MgSO_4$ x $7H_2O$ – 0,5; $FeSO_4$x 7 H_2O -0,2; $ZnSO_4$x 5 H_2O – 0,02; pH 7,0.

Органические среды:

С соевой мукой:

7 среда: соевая мука – 20,0; гидролизат казеина – 10,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 1,0; pH 7,0.

8 среда – соевая среда 53: соевая мука -20,0; глюкоза -10,0; NaCl -5,0; pH 6,9.

9 среда – соевая среда №2: соевая мука -10,0; глюкоза -20,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 0,65; K_2HPO_4-0,45; $CaCO_3$ -3,0; $ZnSO_4$x 5 H_2O, $FeSO_4$x 7 H_2O, $MnCl_2$x 5 H_2O – следы; pH 7,2-7,4.

10 среда – среда A_4: соевая мука – 10,0; глюкоза - 10,0; NaCl - 5,0; $CaCO_3$ - 1,0; pH 7,2-7,4.

11 среда – сахарозная среда: соевая мука – 10,0; сахароза -20,0; KNO_3 -2,0; NaCl -3,0; $CaCO_3$ - 3,0; pH 7,0.

12 среда – среда 5339: соевая мука – 10,0; глицерин -20,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,5; NaCl -3,0; $CaCO_3$ - 3,0; pH 6,8.

13 среда – среда Г: соевая мука – 15,0; глюкоза -20,0; $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; NaCl -5,0; $CaCO_3$ -3,0; pH 7,0.

14 среда: соевая мука – 20,0; глюкоза -20,0; крахмал – 20,0; дрожжевой экстракт – 5,0; NaCl - 2,5; $CaCO_3$ -3,0; $ZnSO_4$x 5 H_2O – 0,003, $CuSO_4$x 5 H_2O – 0,003; $MnCl_2$x 5 H_2O – 0,003; pH 7,4.

15 среда: соевая мука – 20,0; глюкоза -10,0; крахмал – 15,0; дрожжевой экстракт – 1,0; K_2HPO_4-1,0; $MgSO_4$ x $7H_2O$ -1,0; NaCl -3,0; $ZnSO_4$x 5 H_2O – 0,002; $FeSO_4$x 7 H_2O -0,01; $CuSO_4$x 5 H_2O – 0,07; $MnCl_2$x 5 H_2O – 0,008; pH 7,4.

С дрожжевым экстрактом: