

Литература

1. Скурьят А.Ф., Буныкина Е.М. Защита растений. – Минск. - 1985. - № 10. – С. 99-103.
2. Захваткин Ю.А., Третьяков Н.Н. Интегрированная защита растений. - М.: Наука, 1984. - С. 17-20.
3. Промышленная микробиология / под ред. Н.С. Егорова – М.: Высшая школа. - 1989. - 688 с.
4. Отчет по теме 8-71 Усовершенствование технологии производства бактериальных инсектицидных препаратов ВНИИБакпрепарат. - М., 1975. - 109 с.
5. Талалаев Е.В. //Сибирский вестник сельскохозяйственных наук. - //- Иркутск, 1975. - № 2. - С. 49 – 52.
6. Каменек Л.К. Способ получения бактериального энтомопатогенного препарата. Патент РФ № 2062577 от 27.06.1996

Түйін

Жұмыста +(4-8)°С температура сактау процесінде *Bac. thuringiensis ssp. kurstaki* негізінде энтомопатогенді препараттың препарат формаларының сапалық сипаттамаларының өзгеріс нәтижелері қаралды.

Summary

The paper discusses the results of changes in quality characteristics of entomopathogenic formulations of the drug on the basis of *Bac. thuringiensis ssp. kurstaki* during storage at + (4-8) ° C.

УДК 579.261.18

Треножникова Л.П., Хасенова А.Х.

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ВЫДЕЛЕНИЯ ПРИРОДНОГО АНТИБИОТИКА № 360, АКТИВНОГО ПРОТИВ МЕТИЦИЛЛИНРЕЗИСТЕНТНЫХ СТАФИЛОКОККОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, iratnikova@almanet.kz

Важной причиной возникновения и распространения инфекционных заболеваний является появление лекарственно-устойчивых форм возбудителей [1-2]. В настоящее время метициллинрезистентные стафилококки (MRSA) занимают лидирующее положение среди наиболее опасных возбудителей инфекционных заболеваний, вызывающих вспышки внутрибольничных инфекций, которые трудно поддаются лечению современными лекарственными препаратами [3-5]. Многие антибиотические препараты (беталактамы, макролиды, аминогликозиды, фторхинолоны, линкозамиды и др.), а в последнее время и гликопептиды (ванкомицин) становятся бесполезными при лечении инфекций, вызываемых MRSA, что приводит к высокому уровню летальности. Современная медицина остро нуждается в новых лекарственных препаратах, активных против MRSA с множественной лекарственной устойчивостью. Поэтому изыскание и изучение новых природных антибиотических веществ, активных против возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью является настоятельно необходимым [6-8]. Наличие подобного антимикробного спектра действия свидетельствует о перспективности исследования новых биологически активных соединений.

В Институте микробиологии и вирусологии МОН РК в процессе скрининга новых природных антибиотиков, активных в отношении резистентных условно-патогенных микроорганизмов, получен штамм актиномицета ИМВ 360. Целью данного исследования был подбор оптимальных условий культивирования и выделения антибиотика № 360.

Материалы и методы исследований. Для получения спорового материала штамм актиномицетов ИМВ 360 выращивали в течение 7-10 дней при температуре 28°С на агаре 1 Гаузе. Биосинтез антибиотиков осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 750мл в объеме среды 100мл на круговой качалке (180-200 об/мин) при температуре 28°С в течение 96 часов.

Посевным материалом для биосинтеза антибиотиков служила 48-часовая глубинная культура актиномицета ИМВ 360. Посевной материал выращивали на органической среде, содержащей (%): кукурузный экстракт (по сухому весу) - 0,5; $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ – 0,35; NaCl – 0,5; CaCO_3 – 0,5; крахмал нерастворимый – 1,5; глюкоза – 1,0; pH 7,4-7,6.

При изучении биосинтеза антибиотика № 360 использовали известные питательные среды и их модификации следующего состава (%):

Среда А₄: глюкоза - 1,0; соевая мука - 1,0; NaCl - 0,5; CaCO₃ - 0,25; pH 7,2-7,4.

Среда 5339: глицерин - 2,0; соевая мука - 0,5; (NH₄)₂SO₄ - 0,15; NaCl - 0,3; CaCO₃ - 0,3; pH 6,8.

Среда рыбная 8: рыбная мука - 1,0; пептон - 0,5; глюкоза - 2,0; лактоза - 2,0; (NH₄)₂SO₄ - 0,1; CaCO₃ - 0,5; NaCl - 0,5; pH 7,0 - 7,2.

Среда гороховая: гороховая мука - 1,5; сахароза - 2,1; крахмал - 0,85; NaNO₃ - 0,5; CaCO₃ - 0,5; NaCl - 0,5; pH 7,5-7,7.

Среда кукурузная 6: кукурузный экстракт - 1,0; глюкоза - 2,0; CaCO₃ - 0,3; MgSO₄ - 0,3; (NH₄)₂SO₄ - 0,5; pH 6,5-7,0.

Среда овсяная: овсяная мука - 1,0; глюкоза - 1,0; NaCl - 0,5; CaCO₃ - 0,25; pH 7,0-7,2.

Среда с дрожжевым экстрактом: дрожжевой экстракт - 0,5; пептон - 1,0; глюкоза - 2,0; CaCO₃ - 0,2; pH 7,3.

Среда сахарозная 3802: сахароза - 2,0; соевая мука - 1,0; KNO₃ - 0,2; NaCl - 0,3; CaCO₃ - 0,3; pH 7,0.

Для оценки эффективности накопления антибиотика на исследуемых средах учитывали величину биомассы (г/л), антибиотическую активность культуральной жидкости и ацетоновых экстрактов из мицелия в отношении клинического штамма MRSA № 3316 (ед/мл).

Культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием при 2000 оборотов в течение 20 минут. Мицелий отжимали от остатков влаги под прессом. Антибиотик выделяли отдельно из мицелия и нативного раствора штамма-продуцента экстракционным методом при pH 7: из культуральной жидкости - экстракцией н-бутанолом, этилацетатом, хлороформом, бензолом, петролейным эфиром (3:1), из мицелия - ацетоном (1:3).

Антимикробную активность изучали методами двукратных серийных разведений на питательном бульоне и диффузии в агар на питательном агаре. Микроорганизмы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов. Все исследования выполнены в трех повторностях.

Результаты исследований и их обсуждение

Данные по накоплению биомассы и величине антибиотической активности штамма ИМВ 360 представлены в таблице 1. Выход биомассы на изученных средах варьирует в пределах 10,0-26,3 г/л; величина антибиотической активности культуральной жидкости составила 0 - 8000 ед.разведения/мл; ацетоновых экстрактов из мицелия - 100-4000 ед.разведения/мл. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее оптимальные условия образования антибиотика обеспечивают органические среды с гороховой и рыбной мукой. На среде рыбная 8 достигается наибольшая величина антибиотической активности культуральной жидкости - 8000 ед./мл., суммарная активность составляет 8 млн. ед./л. Наиболее высокая активность ацетоновых экстрактов из мицелия наблюдалась также на среде рыбная 8 - 4000 ед/мл, но суммарная активность выше на гороховой среде - 76600 ед/л.

В условиях глубинной ферментации продуцента антибиотик № 360 накапливается в культуральной жидкости и в мицелии. Изучены условия выделения антибиотика № 360 экстракционным методом. Фильтрат культуральной жидкости экстрагировали органическими растворителями (н-бутиловый спирт, этилацетат, петролейный эфир, хлороформ, бензол) при pH 7,0. Антибиотические вещества из мицелия экстрагировали ацетоном при pH 7,0. Установлено, что наиболее оптимальными растворителями для экстракции антибиотика № 360 из культуральной жидкости являются н-бутиловый спирт и этилацетат (таблица 2).

Таблица 1 – Ферментация штамма ИМВ № 360 на различных питательных средах

Наименование среды	Вес биомассы, г/л	Антибиотическая активность, ед.разведения/мл (тест-организм <i>S.aureus</i> № 3316)	
		Культуральная жидкость	Ацетоновые экстракты
Соевая А ₄	24,4	0	100
Рыбная 8	19,0	8000	4000
Сахарозная 3802	13.2	400	1000
Гороховая	38.3	4000	2000
Кукурузная 6	42.2	400	400
Соевая 5339	21,2	0	400
Овсяная	19.5	0	100
Дрожжевая	10,0	1000	2000

Таблица 2 - Экстракция антибиотика № 360 из культуральной жидкости органическими растворителями

Растворители	Диаметр зоны подавления роста <i>S.aureus</i> № 3316, мм	Диаметр зоны подавления роста <i>Klebsiella pneumoniae</i> 444, мм
н-Бутиловый спирт	45	55
Этилацетат	42	52
Петролейный эфир	0	0
Хлороформ	38	46
Бензол	36	44

Таким образом, установлено, что наиболее оптимальной для роста и образования антибиотика №360 является среда рыбная 8. На данной среде наблюдается максимальная величина активности культуральной жидкости (8000 ед/мл) и ацетонового экстракта из мицелия (4000 ед/мл). Наиболее оптимальными условиями выделения антибиотика № 360 из культуральной жидкости являются экстракция н-бутиловым спиртом и этилацетатом.

Литература

1. Singer R.S., Finch R., Wegener H.C., Bywater R., Walters J., Lipsitch M. Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings//The Lancet Infect. Dis. - 2003. - №3. - P.47-51.
2. Talbot, G.H., Bradley J., Edwards. J.E., Gilbert D., Scheld M., J.G. Bartlett J.G. Bad bags Need Drugs: An update on the development pipeline from the antimicrobial availability task force of the infectious diseases society of America//Clin. Infect. Dis.- 2006. - №42. - P. 657-668.
3. Marchese A.S., Schito C., Debbia E.A. Evolution of antibiotic resistance in grampositive pathogens //J. of Chemother. - 2000.- V. 12, - № 6. - P. 259-462.
4. Embil J., Almunef M., Nicole D., Makki S., Cunningham G., Wylie J., Nicole L., Memish Z. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Profiles oceans apart Canadian and Saudi Arabian experiences // J. Chemother. - 2001. - V. 13. - № 1. - P. 28-33.
5. Афанасьева Т.И. Метициллинрезистентные стафилококки // Антибиотики и химиотерапия. - 1998. -Т. 43. - № 6. - С. 29-31.
6. Zhang, A., Demain A.L. Natural Products. Drug Discovery and Therapeutical Medicine. - 2005. – 382 p.
7. Newman, D.J., Cragg M.G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years//J. Nat. Prod. - 2007. - V.70. - P. 461-477.
8. Demain A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms//Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - V. 52. - P. 455–63.

Түйін

360 антибиотикті өсірудің және бөлудің ұтымды жағдайы іріктеп алынған. Антибиотик метициллинрезистенттік көптік дәрілік тұрақтылықты стафилококктарға қарсы жоғары белсенділігі бар.

Summary

Optimal conditions for cultivation and isolation of antibiotic № 360 active against methicillin-resistant Staphylococci with multiple drug-resistance were selected.