

Л.П.Треножникова¹, А.Х. Хасенова¹, М.А.Акылова², А.С.Балгимбаева¹,
С.Ш.Шакиев¹

ИЗУЧЕНИЕ БИОСИНТЕЗА АНТИБИОТИКА-ПЕПТОЛИДА А-70, АКТИВНОГО ПРОТИВ КОККОВЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИЙ С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ

¹РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы², Центральная клиническая больница УДП РК, г. Алматы

Аннотация

Наиболее оптимальными для биосинтеза антибиотика-пептолида А-70 являются органические среды с дрожжевым и кукурузным экстрактом, гороховой и овсяной мукой, при культивировании на которых отмечена высокая величина антибактериальной активности культуральной жидкости и экстрактов из биомассы. Подобрана оптимальная питательная среда с дрожжевым экстрактом и пептоном, обеспечивающая максимальное накопление антибиотика А-70, суммарная антибиотическая активность на которой составляет 1002280 ед. разведения/л.

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 полирезистентные кокки [6,7]. Грамположительные бактерии 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 метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA). В течение многих лет метициллинрезистентные 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 метициллинрезистентных стафилококков является высокая частота ассоциированной устойчивости к антибактериальным препаратам разных групп. MRSA нечувствительны ко всем бета-лактамам: пенициллинам, в том

числе ингибиторзащищенным, цефалоспорином 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 появление штаммов *S.aureus* с недостаточной чувствительностью к ванкомицину и нарастание их числа требует развития новых подходов к лечению грамположительных инфекций [8]. В условиях растущей актуальности множественной резистентности к лекарствам и отсутствия антибиотиков с новыми механизмами действия необходимы разработки новых лекарственных средств.

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.

Целью данного исследования было изучение условий биосинтеза антибиотика А-70 на синтетических и органических питательных 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°C 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°C в течение 48 часов. Количество посевного материала, использованного для инокулирования посевной среды, составляло 1% (суспензия спор 10⁹/мл). Состав посевной среды А4 (%): глюкоза-1,0; соевая мука-1,0; NaCl-0,5; CaCO₃ -1,0; pH 7,2-7,4. 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 питательных сред приведен в г/л.

Синтетические среды:

1 среда—синтетическая среда Ваксмана: глицерин-30,0; K_2HPO_4 -1,0;

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,5; KCl -0,5; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,01; $NaNO_3$ -2,0; pH 7,2-7,4.

2 среда – синтетическая среда Красильникова: глюкоза-20,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -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; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -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; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,5;

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ -0,2; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ -0,02; pH 7,0.

Органические среды:

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

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

9 среда: соевая мука-10,0; глюкоза-20,0; $(NH_4)_2SO_4$ -0,65; K_2HPO_4 -0,45;

$CaCO_3$ -3,0; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 5H_2O$ - следы; pH 7,2-7,4.

10 среда—среда А₄: 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; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ -0,003, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ -0,003; $MnCl_2 \cdot 5H_2O$ -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; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -1,0; $NaCl$ -3,0; $ZnSO_4 \cdot 5H_2O$ -0,002;

FeSO₄x7H₂O -0,01; CuSO₄x5H₂O-0,07; MnCl₂x5H₂O-0,008; pH 7,4.

16 среда: дрожжевойэкстракт-5,0; глюкоза-20,0; пептон-10,0; CaCO₃ -2,0;
pH 7,3.

17 среда: крахмал растворимый-15,0; глюкоза-10,0; соевая мука-20,0;
дрожжевой экстракт-5,0; NaCl-2,5; CaCO₃-3,0;pH 7,6.

18 среда– среда Чапека с дрожжевым экстрактом и сахарозой: дрожжевой экстракт-4,0;
сахароза-15,0; NaNO₃-2,0;FeSO₄x7H₂O-0,01; K₂HPO₄-0,5;
пептон-10,0; CaCO₃-2,0; pH 7,3.

19 среда: пептон-5,0; дрожжевой экстракт-5,0; глюкоза-10,0; гидролизат казеина-
10,0; NaCl-5,0; pH 7,3.

20 среда – кукурузно-сахарозная среда: кукурузный экстракт-30,0; сахароза-
20,0; pH 7,0.

21 среда – 1% кукурузная среда: кукурузный экстракт-10,0; (NH₄)₂SO₄-3,5;
NaCl-5,0; CaCO₃-5,0; pH 7,4-7,6.

22 среда – 0,7% кукурузная среда: кукурузный экстракт-7,0; рыбная мука-10,0;
глюкоза-20,0; K₂HPO₄-0,25; MgSO₄ x7H₂O-0,5; NaCl-0,25; (NH₄)₂SO₄- 0,4; CaCO₃-3,0; pH 6,5-
7,0.

23 среда: кукурузный экстракт-10,0; крахмал нерастворимый-10,0;
(NH₄)₂SO₄-3,0; NaCl-3,0;CaCO₃-3,0; pH 7,0-7,2.

24 среда: кукурузная мука- 20,0; крахмал нерастворимый-15,0; NH₄NO₃-0,7; K₂HPO₄-
2,0; NaCl-3,0; CaCO₃-3,0; pH 7,0.

25 среда – кукурузно-соевая среда: глюкоза-20,0; соевая мука-20,0;
кукурузный экстракт-10,0; крахмал нерастворимый-20,0; NaCl-3,0; CaCO₃ -2,0; pH 7,6.

26 среда – среда 6613: глюкоза-10,0; кукурузный экстракт-10,0; KNO₃-1,0;
NaCl-5,0; CaCO₃-5,0; pH 7,0-7,2.

27 среда – среда Чапека с глюкозой и кукурузным экстрактом: кукурузный экстракт-
20,0; глюкоза-20,0; NaNO₃ -2,0; K₂HPO₄-1,0; MgSO₄ x7H₂O-0,5;
FeSO₄x7H₂O-0,01; CaCO₃-3,0; pH 7,0-7,3.

28 среда: рыбная мука-10,0; глюкоза-20,0; лактоза-20,0; крахмал
нерастворимый-10,0; пептон-5,0; (NH₄)₂SO₄-2,0; NaCl -5,0; CaCO₃ -
3,0; pH 7,0-7,2.

29 среда: рыбная мука-10,0; глюкоза-8,0; лактоза-16,0; крахмал

нерастворимый-4,0; пептон-5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1,6; K_2HPO_4 -2,8; NaCl -3,0; CaCO_3 -5,0; pH 7,0.

30 среда: рыбная мука-10,0; глюкоза-20,0; лактоза-20,0; пептон-5,0;

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1,0; NaCl -5,0; CaCO_3 -5,0; pH 7,2-7,3.

31 среда: глюкоза-20,0; гороховая мука-15,0; крахмал нерастворимый-8,5; NaNO_3 -5,0; CaCO_3 -5,0; пептон-5,0; NaCl -5,0; pH 7,5-7,7.

32 среда: глюкоза-10,0; гороховая мука-10,0; пептон-5,0; NaCl -5,0; pH 7,3.

33 среда: глюкоза-10,0; овсяная мука-10,0; CaCO_3 -2,5; NaCl -5,0; pH 7,0-7,2.

34 среда: арахисовая мука-10,0; соевая мука-20,0; глицерин-5,0; pH 7,2.

35 среда: отруби-20,0; глюкоза-10,0; NaCl -5,0; CaCO_3 -2,5; pH 7,0.

36 среда – глюкозо-пептонная среда: глюкоза-10,0; пептон-5,0; K_2HPO_4 -1,0;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; pH 7,2-7,4.

37 среда – органическая среда Ваксмана: глюкоза-10,0; пептон-5,0; мясной экстракт-5,0; NaCl -5,0; pH 7,2-7,4.

38 среда: глицерин-5,0; пептон-5,0; KNO_3 -0,5; K_2HPO_4 -0,5; NaCl -1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -1,0; pH 7,2.

39 среда: аспарагин-10,0; глюкоза-30,0; KH_2PO_4 -5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -5,0;

раствор солей-1мл; pH 7,2.

Эффективность биосинтеза антибиотика А-70 на используемых средах оценивали по величине антибактериальной активности культуральной жидкости и экстрактов из биомассы. Антибактериальную активность культуральных жидкостей и экстрактов определяли в отношении клинического метициллинрезистентного штамма *S.aureus* № 9. Отбор метициллинрезистентного штамма стафилококка проведен на базе Центральной Клинической Больницы Медицинского Центра Управления Делами Президента Республики Казахстан. Идентификацию штамма стафилококка и определение его резистентности к лекарственным препаратам проводили на автоматическом бактериологическом анализаторе “MINI API” фирмы “BIO MERIEUX”. *S.aureus* № 9 обладал устойчивостью к бета-лактамам, аминогликозидам (гентамицину), эритромицину, тетрациклину, миноциклину.

Антимикробную активность изучали методами двукратных серийных разведений и диффузии в агар. Антибиотическая активность выражалась в условных единицах: 1 условная единица была равна минимальному количеству антибиотических веществ, препятствующих росту тест-организмов при засеве из расчета 10^6 спор на 1мл среды. Микроорганизмы инкубировали при температуре 37°C в течение 24 часов.

Результаты исследований

При изучении биосинтеза антибиотика А-70 установлено, что антибиотическое вещество образуется как в культуральной жидкости, так и в биомассе штамма ИМВ 70. Данные по антибактериальной активности культуральной жидкости и экстрактов из биомассы приведены в таблице.

Таблица - Антибактериальная активность культуральной жидкости штамма ИМВ 70 на синтетических и органических средах

Номер среды	Активность в отношении MRSA № 9, ед.разведения/мл		Общая суммарная активность, ед.разведения/л
	Культуральная жидкость	Экстракты из биомассы	
1	20	10	20023
2	20	10	20036
3	20	10	20046
4	20	0	20000
5	10	0	10000
6	20	8	20032
7	8	0	8000
8	80	20	80128
9	40	10	40054
10	160	100	160860
11	80	10	80054
12	160	80	160528
13	40	10	40070
14	40	10	40170
15	100	20	100228
16	1000	200	1006900
17	80	40	80552
18	640	160	640896
19	640	80	640544
20	320	80	320880
21	40	10	40182
22	80	10	80100
23	80	10	80132
24	80	10	80086
25	160	20	160108
26	320	40	320336
27	160	40	160504
28	40	10	40144
29	40	20	40308
30	20	0	20000
31	320	40	320472
32	320	40	320224
33	200	40	200344
34	80	10	80146
35	160	20	160144
36	80	20	80096
37	160	10	160038
38	100	20	100020
39	40	10	40112

Активность культуральной жидкости на изученных средах №№1-39 варьирует в широких пределах, от 0 до 1000 ед.разведения/мл. На синтетических средах №№1-6 активность культуральной жидкости незначительная (10-20 ед.разведения/мл). Активность культуральной жидкости на средах с соевой мукой (№№7-15) - умеренная, либо низкая и изменяется от 8 до 160 ед.разведения/мл. На средах с рыбной мукой (№№28-30), аспарагином (№39) активность культуральной жидкости также невысокая и находится в пределах 20-40 ед.разведения/мл. На соевой среде № 7 с гидролизатом казеина активность культуральной жидкости самая низкая (8 ед.разведения/мл). Таким образом, введение в состав среды рыбной муки, аспарагина или гидролизата казеина отрицательно влияет на биосинтез антибиотика. На средах с арахисовой мукой (№34) и отрубями (№35) активность культуральной жидкости умеренная и составляет 80-160 ед.разведения/мл. Высокая активность культуральной жидкости наблюдается на средах с кукурузным экстрактом (до 320 ед.разведения/мл), гороховой мукой (320 ед.разведения/мл), овсяной мукой (200 ед.разведения/мл). Наиболее высокая активность культуральной жидкости наблюдается на органических средах с дрожжевым экстрактом (№№16-19) - до 1000 ед.разведения/мл.

Вес биомассы значительно изменяется в зависимости от типа сред. Минимальное накопление биомассы наблюдается на синтетических средах: от 2,3 до 6,0 г/л. Наиболее высокое накопление биомассы обеспечивают органические среды: от 3,8 до 18,2 г/л. Максимально высокое накопление биомассы наблюдается на средах: 1% кукурузной среде №21 (18,2 г/л), соевой среде №14 (17,0 г/л), рыбной среде №34 (15,4 г/л).

Антибактериальная активность экстрактов из биомассы значительно ниже активности культуральной жидкости и варьирует на изученных средах в пределах от 0 до 200 ед.разведения/мл. Наиболее высокая активность экстрактов из биомассы штамма ИМВ 70 наблюдается на соевой среде №10- 100 ед.разведения/мл, с дрожжевым экстрактом и пептоном № 16-200 ед.разведения/мл, с дрожжевым экстрактом и сахарозой №18-160 ед.разведения/мл. Отсутствие образования антибиотика в биомассе наблюдается на синтетических средах №№ 4-5 , соевой среде с гидролизатом казеина № 7 и среде с рыбной мукой №30.

Проведен расчет величин суммарных активностей культуральной жидкости и экстрактов из биомассы штамма ИМВ 70 для оценки эффективности биосинтеза антибиотика на средах №№1-39. Наиболее высокая общая суммарная активность наблюдается на органических средах: с дрожжевым экстрактом-№16 (1002280 ед.разведения/л), №18 (640896 ед.разведения/л) и №19 (640544 ед.разведения/л); с кукурузным экстрактом - №20 (320880 ед.разведения/л), №26 (320336 ед.разведения/л); с гороховой мукой-№31 (320472

ед.разведения/л), №32 (320224 ед.разведения/л); с овсяной мукой-№33 (200344 ед.разведения/л).

Таким образом, оптимальными для биосинтеза антибиотика А-70 в данном исследовании 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 и экстрактов из биомассы в отношении кокковых тест-микробов. Среда №16 с дрожжевым экстрактом и пептоном является наиболее оптимальной для биосинтеза антибактериального антибиотика А-70.

Полученные данные свидетельствуют о высокой значимости состава питательных сред для биосинтеза антибиотика А-70.

Литература:

1. Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлов С.Н. Антибактериальная терапия.— М.: Полимаг. - 2000. -190 с.
2. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. World Health Organization 2001. Available from: [http://www.who.int/emc/amrpdfs/WHO Global Strategy English](http://www.who.int/emc/amrpdfs/WHO_Global_Strategy_English).
3. Сидоренко С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины // Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. - Т. 4. - № 2. – С. 16-21
4. Alvarez-Lerma F., Grau S., Gracia-Arnillas M.P. Gram-positive cocci infections in intensive care: guide to antibacterial selection //Drugs. - 2006. - V.66. – P.751-68.
5. Страчунский Л.С., Дехнич А.В., Эдельштейн И.А. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Staphylococcus aureus* в России: результаты многоцентрового исследования // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. -2002. – Т.4. - № 4. – С.325-336.
6. Сидоренко С.В., Резван С.П., Грудина С.А. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге //Антибиотики и химиотерапия. - 1998. - №7. – С.15-25.
7. Plowman R., Graves N., Griffin M.A.S. The rate and cost of hospital-acquired infection occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed // J. Hospital. Infection. - 2001. – Vol. 47. – P.198-209.
8. Talbot G.H., Bradley J., Edwards Jr. J.E., Gilbert D., Scheld M., Bartlett J.G. Bad bugs 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. - Vol. 42. - P. 657-668.

L.P.Trenozhnikova¹, A. Kh.Khassenova¹, Akilova M.A.², A.S.Balgimbayeva¹,
S.S.Schakiyev¹

STUDIES OF BIOSYNTHESIS OF THE ANTIBIOTIC-PEPTOLID A-70, ACTIVE AGAINST COCCAL INFECTIOUS AGENTS WITH MULTIDRUG RESISTANCE

¹Institute of Microbiology and Virology CS MES RK¹,Almaty

²Medical Center of President's Affairs Administration of the Republic of Kazakhstan²,Almaty

Summary

The most optimal for the biosynthesis of the antibiotic-peptolid A-70 are organic media with yeast and corn extracts, pea and oat flour, the cultivation in which is characterized by a high value of antibacterial activity of the culture broth and biomass extracts. Optimal medium with yeast extract and peptone for biosynthesis of the antibacterial antibiotic A-70 was selected, in which summary activity equaled 1002280 dilution units/l.

Resistance of infectious agents to antibiotics is a serious problem in clinical medicine. The efficiency of many antibiotics, traditionally used to treat infectious diseases, is reduced because of the increasing spread of sustainable bacterial strains [1-3]. The end of the 20th and beginning of the present century were marked by a steady trend to the predominance of gram-positive bacteria in the nosological structure of both hospital-acquired and community-acquired infections [4, 5]. Thus, since the late 90's of the last century in the spectrum of hospital flora in intensive care and reanimation unit (ICRU) the first place was taken by gram-positive multiresistant cocci [6, 7]. Gram-positive bacteria have become leading pathogenic agents of hospital-acquired pneumonias, registered in the USA and Europe, with a mortality rate of 20-50%, and in ICRU - up to 70-90%.

Recently the unprecedented increase in the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) was observed. For years, methicillin-resistant staphylococci were considered only as hospital pathogens, but not long ago the situation has changed for the worse, these microorganisms are increasingly causing community-acquired infections. Practically important feature of methicillin-resistant staphylococci is the high frequency of associated resistance to antibiotics of different groups. MRSA are insensitive to all beta-lactam antibiotics: penicillins, including inhibitor-protected, I-IV generation cephalosporins and carbapenems. The increase in number and wide spread of resistant strains of gram-positive bacteria has led to the fact that in the treatment of caused by them infections glycopeptides are used predominately, the main representative of which is vancomycin. However, appearance of *S.aureus* strains with insufficient susceptibility to vancomycin and increase in their numbers require the development of new approaches to the treatment of gram-positive infections [8]. With the increasing importance of

multidrug resistance and lack of antibiotics with novel mechanisms of action it is necessary to develop new drugs.

In the Institute of Microbiology and Virology CS MES RK, the complex antibiotic A-70 has been developed, high active against clinical coccal pathogens: staphylococci, streptococci, micrococci, enterococci and aerococci with different types of drug resistance. The antibiotic A-70 is a complex of compounds of peptolid-heteropeptidolactone group; ethamycin and new and previously unknown components were found in its composition. The antibiotic A-70 has a pronounced therapeutic effect for experienced infected mice in the model of experimental staphylococchia (MRSA).

The study objective was to investigate the conditions for biosynthesis of antibiotic A-70 in the synthetic and organic media and selection of optimum media for the formation of antibiotic substance.

Materials and Methods

In order to obtain spore material the strain of actinomycete IMV 70 was grown at 28°C for 10 days on potato-dextrose agar.

The cultivation of the actinomycete strain IMV 70 was performed in two stages. Vegetative seed material was grown in Erlenmeyer flasks (750 ml) containing 100 ml of medium on a rotary shaker (180- 200 rpm) at 28°C during 48 hours. The amount of the seed material, used for the inoculation of the seed medium, composed 1 % (spore suspension 10⁹/ml). The composition of the seed medium A4 (%): soy flour-10,0; glucose-10,0; NaCl -5,0; CaCO₃-1,0. The amount of inoculum's for the sowing of fermentation medium composed 3% (vegetative mycelium). Biosynthesis of antibiotic was performed in Erlenmeyer flasks (750 ml) containing 100 ml of medium on a rotary shaker (180- 200 rpm) at 28°C during 96 hours.

Surveillance of conditions for biosynthesis of antibiotic A-70 was conducted on 6 synthetic and 33 organic media used for antibiotic fermentation. Composition of media is given in g/l.

Synthetic media

1 medium – Waksman's synthetic medium: glycerin-30,0; K₂HPO₄-1,0;

MgSO₄x7H₂O-0,5; KCl-0,5; FeSO₄x7 H₂O -0,01; NaNO₃-2,0; pH 7,2-7,4.

2 medium – Krasilnikov's synthetic medium: glucose-20,0; MgSO₄x7H₂O-0,5; K₂HPO₄-1,0; NaCl-0,5; KNO₃-1,0; CaCO₃-3,0; pH 7,0.

3 medium – starch-ammonia medium: starch-10,0; K₂HPO₄-1,0; NaCl-1,0;

(NH₄)₂SO₄-1,0; CaCO₃-3,0; pH 7,0.

4 medium – medium 52/6: glucose-5,0; indissoluble starch-10,0; KNO₃-2,0;

MgSO₄x7H₂O-0,25; K₂HPO₄-0,2; (NH₄)₂SO₄-1,0; NaCl-5,0; KNO₃-1,0; CaCO₃-1,0; pH 7,0.

5 medium: glucose-30,0; NaCl-2,0; NH₄Cl-0,8; K₂HPO₄- 0,5; CaCO₃- 5,0; pH 7,0.

6 medium: glucose-30,0; KNO₃- 4,0; K₂HPO₄-0,2; NaCl-1,0; MgSO₄x7H₂O-0,5; FeSO₄x7H₂O-0,2; ZnSO₄x5H₂O-0,02; pH 7,0.

Organic media

7 medium: soy flour-20,0; casein hydrolyzate-10,0; glucose-10,0; NaCl-1,0; pH 7,0.

8 medium: soy flour-20,0; glucose-10,0; NaCl-5,0; pH 6,9.

9 medium: soy flour-10,0; glucose-20,0; (NH₄)₂SO₄-0,65; K₂HPO₄-0,45; CaCO₃-3,0; ZnSO₄x5H₂O, FeSO₄x7H₂O, MnCl₂x5H₂O-traces; pH 7,2-7,4.

10 medium – medium A₄: soy flour-10,0; glucose-10,0; NaCl-5,0; CaCO₃-1,0; pH 7,2-7,4.

11 medium – sucrose medium: soy flour-10,0; sucrose-20,0; KNO₃-2,0; NaCl-3,0; CaCO₃-3,0; pH 7,0.

12 medium– medium 5339: soy flour-10,0; glycerin-20,0; (NH₄)₂SO₄-1,5; NaCl-3,0; CaCO₃-3,0; pH 6,8.

13 medium: soy flour-15,0; glucose-20,0; (NH₄)₂SO₄-2,0; NaCl-5,0; CaCO₃-3,0; pH 7,0.

14 medium: soy flour- 20,0; glucose -20,0; starch- 20,0; yeast extract-5,0; NaCl-2,5; CaCO₃ -3,0; ZnSO₄x5H₂O-0,003, CuSO₄x5H₂O-0,003; MnCl₂x5H₂O-0,003; pH 7,4.

15 medium: soy flour-20,0; glucose-10,0; starch-15,0; yeast extract-1,0; K₂HPO₄-1,0; MgSO₄x7H₂O-1,0; NaCl-3,0; ZnSO₄x5H₂O-0,002; FeSO₄x7H₂O-0,01; CuSO₄x5H₂O-0,07; MnCl₂x5H₂O-0,008; pH 7,4.

16 medium: yeast extract-5,0; glucose-20,0; peptone-10,0; CaCO₃-2,0; pH 7,3.

17 medium: dissoluble starch-15,0; glucose-10,0; soy flour-20,0; yeast extract-5,0; NaCl-2,5; CaCO₃-3,0; pH 7,6.

18 medium –Chapek's medium with yeast extract and sucrose: yeast extract-4,0; sucrose-15,0; Na NO₃-2,0; FeSO₄x7H₂O-0,01; K₂HPO₄-0,5; peptone-10,0; CaCO₃-2,0; pH 7,3.

19 medium: peptone-5,0; yeast extract-5,0; glucose-10,0; casein hydrolyzate-10,0; NaCl-5,0; pH 7,3.

20 medium – corn-sucrose medium: corn extract-30,0; sucrose-20,0; pH 7,0.

21 medium – 1% corn medium: corn extract-10,0; (NH₄)₂SO₄-3,5; NaCl-5,0; CaCO₃-5,0; pH 7,4-7,6.

22 medium – 0,7% corn medium: corn extract-7,0; fish flour-10,0; glucose-20,0; K₂HPO₄-0,25; MgSO₄x7H₂O-0,5; NaCl-0,25; (NH₄)₂SO₄-0,4; CaCO₃-3,0; pH 6,5-7,0.

23 medium: corn extract-10,0; indissoluble starch-10,0; (NH₄)₂SO₄-3,0; NaCl-3,0; CaCO₃-3,0; pH 7,0-7,2.

24 medium: corn flour-20,0; indissoluble starch-15,0; NH_4NO_3 -0,7; K_2HPO_4 -2,0; NaCl -3,0; CaCO_3 -3,0; pH 7,0.

25 medium: glucose-20,0; soy flour-20,0; corn extract-10,0; indissoluble starch- 20,0; NaCl -3,0; CaCO_3 -2,0; pH 7,6.

26 medium – medium 6613: glucose -10,0; corn extract-10,0; KNO_3 -1,0; NaCl -5,0; CaCO_3 -5,0; pH 7,0-7,2.

27 medium – Chapek's medium with glucose and corn extract: corn extract-20,0; glucose-20,0; NaNO_3 -2,0; K_2HPO_4 -1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,01; CaCO_3 -3,0; pH 7,0-7,3.

28 medium: fish flour-10,0; glucose-20,0; lactose -20,0; indissoluble starch-10,0; peptone-5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -2,0; NaCl -5,0; CaCO_3 -3,0; pH 7,0-7,2.

29 medium: fish flour-10,0; glucose-8,0; lactose-16,0; indissoluble starch-4,0; peptone-5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -1,6; K_2HPO_4 -2,8; NaCl -3,0; CaCO_3 -5,0; pH 7,0.

30 medium: fish flour-10,0; glucose-20,0; lactose-20,0; peptone-5,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,0; NaCl -5,0; CaCO_3 -5,0; pH 7,2-7,3.

31 medium: glucose-20,0; pea flour-15,0; indissoluble starch-8,5; NaNO_3 -5,0; CaCO_3 -5,0; peptone-5,0; NaCl -5,0; pH 7,5-7,7.

32 medium: glucose-10,0; pea flour-10,0; peptone-5,0; NaCl -5,0; pH 7,3.

33 medium: glucose-10,0; oat flour-10,0; CaCO_3 -2,5; NaCl -5,0; pH 7,0-7,2.

34 medium: peanut flour-10,0; soy flour-20,0; glycerin-5,0; pH 7,2.

35 medium: bran flour-20,0; glucose-10,0; NaCl -5,0; CaCO_3 -2,5; pH 7,0.

36 medium: glucose-10,0; peptone-5,0; K_2HPO_4 -1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5; pH 7,2-7,4.

37 medium– Waksman's organic medium: glucose-10,0; peptone-5,0; meat extract-5,0; NaCl -5,0; pH 7,2-7,4.

38 medium: glycerin-5,0; peptone-5,0; KNO_3 -0,5; K_2HPO_4 -0,5; NaCl -1,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -1,0; pH 7,2.

39 medium: asparagine-10,0; glucose-30,0; KH_2PO_4 -5,0; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ -5,0; saline solution-1 ml; pH 7,2.

Efficiency of antibiotic's A-70 biosynthesis on these media was evaluated based of the value of antibiotic activity of the culture broth, extractions from biomass, and accumulation of biomass.

Antibacterial activity of culture broths and extractions from biomass was determined against clinical methicillin resistant strain *S.aureus* № 9. The selection of methicillin resistant strain of Staphylococci was carried out at the premises of the Central Clinical Hospital of the Medical Presidential Center of Kazakhstan. The identification of Staphylococci strain and determination of its resistance towards medical preparations was performed on the automated bacteriological

analyzer «MINI API» from «BIO MERIEUX» company. *S.aureus* № 9 was resistant to beta-lactams, aminoglycosides (gentamicin), erythromycin, and tetracycline.

The antibacterial activity was surveyed by two-fold serial broth dilution method and by agar diffusion method. Antimicrobial activity was counted in conventional units: 1 conventional unit equals the maximum amount of antibiotic substances, inhibiting the growth of test-organisms after sowing at the rate of 10^6 spores/ml of medium. Microorganisms were incubated at 37 °C for 24 hours.

Research results

When studying biosynthesis of the antibiotic A-70 it was established that the antibiotic substance is produced both in the culture fluid and biomass of the strain IMV 70. Data on the antibacterial activity of culture fluid and biomass extracts are given in Table 1.

Table - Antibacterial activity of the culture fluid and biomass extracts of the strain IMV 70 in synthetic and organic media

№ of medium	Activity against <i>MRSA</i> № 9, dilution unit/ml		Total summarized activity, dilution unit/l
	Culturebroth	Extractsfrombiomass	
1	20	10	20023
2	20	10	20036
3	20	10	20046
4	20	0	20000
5	10	0	10000
6	20	8	20032
7	8	0	8000
8	80	20	80128
9	40	10	40054
10	160	100	160860
11	80	10	80054
12	160	80	160528
13	40	10	40070
14	40	10	40170
15	100	20	100228
16	1000	200	1006900
17	80	40	80552
18	640	160	640896
19	640	80	640544
20	320	80	320880
21	40	10	40182
22	80	10	80100
23	80	10	80132
24	80	10	80086
25	160	20	160108
26	320	40	320336
27	160	40	160504
28	40	10	40144
29	40	20	40308

30	20	0	20000
31	320	40	320472
32	320	40	320224
33	200	40	200344
34	80	10	80146
35	160	20	160144
36	80	20	80096
37	160	10	160038
38	100	20	100020
39	40	10	40112

Activity of culture broth fluctuates significantly in the tested media №№ 1-39-from 0 to 1000 dilution units/ml. On synthetic media №1-6 the activity of culture broth was insignificant (10-20 dilution units/ml). Activity of culture broth on media with soy flour №7-15 was moderate or low, fluctuating within 8-160 dilution units/ ml. In the media with fish flour and asparagine (№ 28-30, 39) the activity of culture broth is low and fluctuates within 20-40 dilution units/ml. On soy medium №7 with casein hydrolyzate activity of culture broth is completely absent (8 dilution units/ml). Therefore, introduction of fish flour, asparagine or casein hydrolyzate into a medium has a negative effect on the antibiotic's biosynthesis. In the media with peanut flour (№34) and bran (№35) the activity of culture broth is moderate and equals 80-160 dilution units/ml. The high activity of the culture broth is observed on media with corn extract (40-320 dilution units/ ml), pea (320 dilution units / ml) and oatmeal (200 dilution units / ml). The highest activity of the culture fluid in relation to the test microorganisms is observed in organic media with yeast extract (№№16-19) – up to 1000 dilution unit/ml.

Biomass weight varies considerably depending on the type of media. Minimal biomass accumulation is observed in synthetic media: from 2.3 to 6.0 g/L. Maximum biomass accumulation is provided by organic media: from 3.8 to 18.2 g/L. The highest biomass accumulation is observed in media: 1% corn medium (№ 21-18.2 g/L), soy medium №14(17.0 g/L), fish medium №34 (15.4 g /L).

Antibacterial activity of extractions from biomass is much lower than the activity of culture broth and fluctuates within 0-200 dilution units/ml in the tested media. The highest activity of biomass extracts of the strain IMV 70 was observed in soybean medium № 10-100 dilution unit/ml, medium with yeast extract and peptone №16-200 dilution unit/ml, medium with yeast extract and sucrose №18- 160 dilution unit/ml. No production of the antibiotic in biomass is observed in synthetic media №№ 4-5, soybean medium №7, and fish flour medium №30.

The values of total activities of the culture fluid and biomass extracts of the strain IMV 70 were calculated to evaluate the antibiotic biosynthesis efficiency in the tested media. The highest overall total activity is observed in organic media:with yeast extract - №16 (1002280 dilution

unit/L), №18 (640896 dilution unit/L), №19 (640544 dilution unit/L); with corn extract - №20 (320880 dilution unit/L), № 26 (320336 dilution unit/L); with pea flour - №31 (320472 dilution unit/L), №32 (320224 dilution unit/L); with oatmeal - №33 (200344 dilution unit/L).

Thus, the organic media with yeast and corn extracts, pea and oat flour, the cultivation in which is characterized by a high value of antibacterial activity of the culture fluid and biomass extracts against coccaltest microorganisms are optimal for biosynthesis of the antibiotic A-70 in this study. The medium №16 with yeast extract and peptone is the most optimal for biosynthesis of the antibiotic A-70. The data of the research indicates that the composition of the nutrient media is highly important for biosynthesis of the antibiotic A-70.

References:

1. Антибактериальная терапия. Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М.: Полимаг. - 2000. - 190 с.
2. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. World Health Organization 2001.
Available from: http://www.who.int/emc/amrpdfs/WHO_Global_Strategy_English.pdf.
3. Сидоренко С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины// Инфекции и антимикробная терапия. – 2002. -Т. 4 (2).
4. Alvarez-Lerma F., Grau S., Gracia-Arnillas M.P. Gram-positive cocci infections in intensive care: guide to antibacterial selection // Drugs.-2006.-V.66.-P.751-68.
5. Страчунский Л.С., Дехнич А.В., Эдельштейн И.А. и др. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов Staphylococcus aureus в России: результаты многоцентрового исследования// Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. -2002. –Т.4(4). –С.325-36.
6. Сидоренко С.В., Резван С.П., Грудинина С.А., с соавт. Результаты многоцентрового исследования чувствительности стафилококков к антибиотикам в Москве и Санкт-Петербурге// Антибиотики и химиотерапия. -1998. -№7. –С.15-25.
7. Plowman R., Graves N., Griffin M.A.S., et al. The rate and cost of hospital-acquired infections occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed// J. Hospital. Infection. -2001. –V.47. –P.198-209.
8. Talbot G.H., Bradley J., Edwards Jr. J.E., Gilbert D., Scheld M., Bartlett J.G. Bad bugs 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. -V.42. -P. 657-668.

Л.П.Треножникова¹, А.Х. Хасенова¹, М.А.Ақылова², А.С.Балғымбаева¹,
С.Ш.Шәкиев¹

КӨП ТӨЗІМДІ ДӘРІЛЕРГЕ ТҰРАҚТЫ КОКК ИНФЕКЦИЯЛАРҒА БЕЛСЕНДІЛІК ДЕНГЕЙІ ЖОҒАРЫ А-70 ПЕПТОЛИД-АНТИБИОТИГІНІҢ БИОСИНТЕЗІН ЗЕРТТЕУ

¹ЕМК«Микробиологияжәне вирусологияинституты» ҒКБҒМҚР, Алматы

²Қазақстан Республикасы Президенті Іс басқармасының Медициналық
орталығы, Алматы

Түйін

А-70 пептолид-антибиотигінің биосинтезі үшін ашытқыжәне жүгері экстрактары, ноқат жәнесұлы ұндары қосылған органикалық орталар қолайлы болып табылды, осы орталарда өсіргенде культуралдық сұйықтықжәнебиомасса экстрактарының антибактериалдық белсенділігінің мәні жоғары болатыны белгіленді. А-70антибиотикті ең жоғары мөлшемде құру үшін ашытқыш экстракты менпептон қосылған орта қолайлы болып табылды, осы ортадажиынтық антибиотикалық белсенділігі1002280 сұйылту бірлігі/л құрады.