

Л.П.Треножникова¹, А.Х.Хасенова¹, С.М.Анохина², А.С.Балгимбаева¹,
С.Ш.Шакиев¹

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА НА БИОСИНТЕЗ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОГО АНТИБИОТИКА-ПЕПТОЛИДА А-70

¹Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК
²Центральная клиническая больница УДП РК

Аннотация

Изучено влияние источников углерода (глюкозы, мальтозы, сахарозы, крахмала, маннита, глицерина) на биосинтез антибактериального антибиотика-пептолида А-70. Установлено, что глюкоза в концентрации 20 г\л обеспечивает максимальное образование антибиотика А-70 в культуральной жидкости (1000000 ед.разведения\л), мальтоза в концентрации 30 г\л обеспечивает максимальное образование антибиотика А-70 в биомассе (12600 ед.разведения\л).

Грамположительные микроорганизмы занимают важное место в этиологии инфекционных болезней человека. Среди них наиболее распространенными возбудителями являются представители родов *Enterococcus*, *Staphylococcus* и *Streptococcus*[1-3]. В последние годы роль микроорганизмов, относящихся к двум первым родам, возросла не столько из-за их широкого распространения, сколько из-за приобретения ими устойчивости к подавляющему большинству доступных антибактериальных препаратов. Метициллинрезистентные стафилококки (MRSA) способны вызывать разнообразные клинические формы внутрибольничных инфекций, включая наиболее тяжелые, такие как: бактериемия, пневмония, синдром септического шока, септический артрит, остеомиелит и другие, которые требуют длительного и дорогостоящего лечения. Появление осложнений, вызванных MRSA, приводит к увеличению сроков госпитализации, показателей летальности, значительным экономическим потерям [4-5]. В настоящее время MRSA являются ведущими возбудителями внутрибольничных инфекций в стационарах многих странах мира [6-7]. Частота их выделения в стационарах США, Китая, Японии, ряда стран Западной Европы достигает 40 - 70 %. Сложившаяся система выбора препаратов для лечения стафилококковых инфекций учитывает наиболее распространенные механизмы устойчивости, но появление у микроорганизмов новых механизмов антибиотикорезистентности требует пересмотра некоторых устоявшихся представлений и внедрения в практику новых препаратов. Исследование свойств и разработка технологии биосинтеза новых антибиотиков активных против MRSA, является настоятельной необходимостью.

Целью данного исследования являлось изучение влияния источников углерода на биосинтез антибиотика-пептолида А-70, высокоактивного против MRSA.

Материалы и методы

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

Биосинтез антибиотика А-70 осуществляли в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл на круговой качалке (180-200 об/мин) при температуре 28°C в течение 96 часов. Влияние источников углерода (глюкозы, мальтозы, сахарозы, крахмала, маннита, глицерина) изучали на фоне ферментационной среды № 16, оптимальной для биосинтеза антибиотика А-70. Состав ферментационной среды №16 (г/л): дрожжевой экстракт-5,0; глюкоза-20,0; пептон-10,0; CaCO₃ -2,0; рН 7,3. Все источники углерода вносили в среду в концентрациях: 10, 20, 30, 40 г/л.

Для оценки уровня образования антибиотика А-70 использовали следующие критерии: активность культуральной жидкости и экстрактов из биомассы, накопление биомассы. Экстракцию антибиотика из биомассы проводили ацетоном в соотношении 1:3 (3мл ацетона на 1 г биомассы). Антибактериальную активность культуральных жидкостей и экстрактов из биомассы определяли в отношении клинического штамма *S.aureus* № 9 (MRSA). Антибактериальную активность изучали методами двукратных серийных разведений и диффузии в агар. Все исследования выполнены в трех повторностях.

Результаты и их обсуждение

Углеводы являются важными компонентами питательных сред и оказывают значительное влияние не только на накопление биомассы актиномицетов, но и на образование антибиотического вещества.

В таблице приведены данные по изучению влияния источников углерода на биосинтез антибиотика А-70.

Таблица – Активность культуральной жидкости и экстрактов из биомассы штамма ИМВ 70 на среде № 16 с различными источниками углерода

Источ-ник углерода	Кон-цент-рация г/л	Вес биомас-сы, г/л	Диаметр зоны подавления <i>S.aureus</i> №9, мм		Активность, ед.разведения/мл		Общая суммарная активность д.разведе-ния/л
			Культураль-ная жидкость	Биомас са	Культураль-ная жидкость	Биомас са	
Глюкоза	10	6,5	33	19	600	40	600780
	20	11,8	38	29	1000	200	1007080
	30	15,0	35	24	800	100	804500
	40	15,6	34	23	600	80	603744
Мальтоза	10	12,6	34	21	600	40	601512
	20	17,9	36	24	800	100	805370
	30	17,5	35	26	800	240	812600

	40	14,3	34	26	600	160	806864
Сахароза	10	2,9	20	0	40	0	40000
	20	3,3	24	12	100	0	100000
	30	3,1	24	14	100	10	100093
	40	2,4	25	15	160	10	160072
Крахмал	10	9,0	35	25	800	100	802700
	20	16,2	35	19	800	40	801944
	30	23,5	33	15	600	20	601410
	40	38,1	30	15	300	20	302286
Маннит	10	13,8	33	23	600	100	604140
	20	14,0	35	26	800	160	806720
	30	16,0	35	24	800	100	804800
	40	17,2	33	23	600	80	604128
Глицерин	10	6,6	30	19	400	40	400792
	20	10,0	34	25	600	100	603000
	30	6,5	31	19	400	40	400780
	40	5,6	30	18	400	40	400672

Все исследуемые концентрации источников углерода значительно влияют на накопление биомассы. При увеличении концентрации глюкозы, крахмала и маннита накопление биомассы возрастает; в случае использования мальтозы, сахарозы и глицерина вес биомассы достигает максимума при концентрации 20 г/л. Дальнейшее увеличение содержания данных источников углерода в среде приводит к уменьшению накопления биомассы. Сахароза во всех испытанных концентрациях ингибирует рост и накопление биомассы штамма ИМВ 70.

Полученные данные показывают, что все исследуемые источники углерода, за исключением сахарозы, могут быть использованы для биосинтеза антибиотика А-70. Наиболее высокая активность культуральной жидкости (1000 ед.разведения/мл) наблюдалась на среде с глюкозой в концентрации 20 г/л. Уменьшение концентрации глюкозы до 10 г/л, а также ее увеличение до 30-40 г/л, ингибировало образование антибиотика – до 600-800 ед.разведения/мл. Оптимальными концентрациями, обеспечивающими максимальное накопление антибиотика, для мальтозы и маннита являются концентрации 20-30 г/л, активность культуральной жидкости составляет 800 ед. разведения/мл в отношении MRSA № 9. При дальнейшем увеличении их содержания в среде образование антибиотика снижается. Крахмал в концентрации 10-20 г/л обеспечивает максимальный биосинтез антибиотика, при увеличении его содержания в среде, наблюдается репрессия его образования. Оптимальной концентрацией для глицерина, обеспечивающей максимальный синтез антибиотика А-70, как и для других источников углерода, является концентрация 20 г/л. При уменьшении и увеличении его концентрации накопление антибиотика резко падает. Сахароза оказывает противоположный эффект на образование антибиотика А-70, при увеличении ее концентрации в среде биосинтез антибиотика незначительно возрастает. В

целом, использование сахарозы в качестве источника углерода оказывает ингибирующий эффект на образование антибиотика А-70, активность на средах с различными концентрациями сахарозы составляет 40-160ед. разведения/мл.

На основании расчета общей суммарной активности при использовании различных источников углерода установлено, что глюкоза в концентрации 20 г/л обеспечивает максимальное образование антибиотика А-70 в культуральной жидкости (1000000 ед.разведения/л), мальтоза в концентрации 30 г/л обеспечивает максимальное образование антибиотика А-70 в биомассе (12600 ед.разведения/л).

Литература:

- 1.Сидоренко С.В.Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов // Инфекции и антимикробная терапия – 2003. - Т 5. - №2. С.47-49.
- 2.Никитенко Т.А., Кондратенко Н.Н. Ведущие микроорганизмы - возбудители внутрибольничных инфекций в стационарах различного профиля в современных условиях // В сб. «Роль клинической микробиологии в профилактике внутрибольничных инфекций. Тезисы докладов Российской научно-практической конференции с международным участием». Москва, 2004. – С. 68-69.
- 3.Страчунский Л.С., Дехнич А.В., Белькова Ю.А. Сравнительная активность антибактериальных препаратов, входящих в лекарственные формы для местного применения, в отношении *Staphylococcus aureus*: результаты российского мультицентрового исследования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия - 2002.-Т. 4. – С. 157-162.
- 4.Brigs J.P., Sexton D.J., Kaye K.S. Adverse clinical and economic outcomesattribu tableto methicillinresistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection // Clin.Infect.Dis. - 2003. - № 36.– P.592-597.
- 5.Rubin R.J., Harrington C.A., Poon A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infections in New York City hospitals // Emerg. Infect. Dis. – 1999.- № 5. – P. 9-17.
- 6.Lowy F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* // J. Clin. Invest. - 2003. – V. 111. - № 9. –P. 1265-1273.
- 7.Rybakm.J., Pharm D.L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review // Pharmacotherapy – 2005. – V. 25.- № 1. – P. 74-85.

UDC 615.579.64

L.P.Trenozhnikova¹, A. Kh.Khassenova¹, S.M. Anohina²,
A.S. Balgimbayeva¹, S.S.Schakiyev¹

SURVEILLANCE OF THE INFLUENCE OF CARBON SOURCES ON BIOSYNTHESIS OF THE ANTIBIOTIC-PEPTOLIDE A-70

¹Institute of Microbiology and Virology CS MES RK

²Central Clinical Hospital of the Medical Presidential Center of Kazakhstan

Summary

There was studied the influence of carbon sources (glucose, maltose, sucrose, starch, mannitol, and glycerol) on biosynthesis of the antibacterial antibiotic-peptolide A-70. It was determined that glucose in concentration of 20 g/l maximazies the formation of the antibiotic A-70 in culture broth (1000000 dilution

units/l), and maltose in concentration of 30 g/l maximizes formation of the antibiotic A-70 in biomass (12600 dilution units/l).

Gram-positive microorganisms play an important role in the etiology of infectious diseases in humans. Among them, the most common pathogens are of the genera *Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Streptococcus* [1-3]. In recent years, the role of microorganisms belonging to the first two genera has increased not only because of their wide distribution, but because of the acquisition of resistance to the vast majority of available antibiotics. Methicillin-resistant *Staphylococci* (MRSA) can cause a variety of clinical forms of nosocomial infections, including the most severe, such as bacteremia, pneumonia, septic shock syndrome, septic arthritis, osteomyelitis, and others that require extensive and expensive treatment. The complications caused by MRSA result in prolonged hospitalization, increased fatality rates, and significant economic losses [4-5]. Currently, MRSA is the leading pathogens of nosocomial infections in hospitals of many countries of the world [6-7]. The frequency of their isolation in the hospitals of United States, China, Japan, and a number of Western European countries is 40 - 70%. The current system of selecting drugs for the treatment of *Staphylococcal* infections takes into account the most common mechanisms of resistance, but with the emergence of the new mechanisms of antibiotic resistance there has been a need for the review of some of the preconceived ideas and introduction of new products. Investigation of the properties and development of biosynthesis technology for new antibiotics active against MRSA is imperative.

The aim of this study was to investigate the influence of carbon sources on the biosynthesis of the antibiotic-peptolide A-70, highly active against MRSA.

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.

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. Influence of different carbon sources (glucose, maltose, sucrose, starch, mannitol, and glycerol) on biomass accumulation and value of antibiotic activity was studied with use the fermentation medium number 16, the optimal for the biosynthesis of the antibiotic A-70. Composition of the fermentation medium number 16 (g/l) was as follows: yeast extract - 5.0, glucose - 20.0; peptone - 10.0; CaCO₃-2.0; pH 7.3. All the carbon sources were added to the medium at concentrations of 10, 20, 30, and 40 g/l.

To evaluate the level of formation of antibiotic A-70 there were used the following criteria: activity of culture broth, acetone extracts from biomass, and biomass accumulation. The extraction of the antibiotic biomass was performed with acetone in a ratio of 1:3 (3 ml acetone per 1 g of

biomass). The antibacterial activity of the culture broths and the acetone extracts of biomass were determined against clinical strains of *S.aureus* № 9 (MRSA). The antibacterial activity was surveyed by two-fold serial broth dilution method with nutrient broth and by agar diffusion method with nutrient agar.

Research results

Carbohydrates are important components of culture broth and have a significant impact not only on the biomass accumulation of actinomycetes but also on the formation of the antibiotic substance.

The table summarizes the data on the effect of carbon sources on the biosynthesis of the antibiotic A-70.

Table - Activity of culture fluid and the acetone extracts from biomass IMV 70 strain on the medium number 16 different carbon sources

Carbon source	Concentration, g/l	Weight of biomass, g/l	Diameter of inhibition zone of <i>S.aureus</i> № 9, mm		Activity, dilution unit/ml		Total summarized activity, dilution units/l
			Culture broth	Biomass	Culture broth	Biomass	
Glucose	10	6,5	33	19	600	40	602960
	20	11,5	38	29	1000	240	1029760
	30	15,0	35	24	800	100	816700
	40	15,6	34	23	600	80	613880
Maltose	10	12,6	34	21	600	40	605580
	20	17,9	36	24	800	100	819900
	30	17,5	35	26	800	200	838900
	40	14,3	34	26	600	160	825360
Sucrose	10	2,9	20	0	40	0	40000
	20	3,3	24	12	100	0	100000
	30	3,1	24	14	100	10	100340
	40	2,4	25	15	160	10	160265
Starch	10	9,0	35	25	800	100	810300
	20	16,2	35	19	800	40	807400
	30	23,5	33	15	600	20	605380
	40	38,1	30	15	300	20	308720
Mannitol	10	13,8	33	23	600	100	615300
	20	14,0	35	26	800	160	824880
	30	16,0	35	24	800	100	815550
	40	17,2	33	23	600	80	615280
Glycerol	10	6,6	30	19	400	40	402940
	20	10,0	34	25	600	100	611050
	30	6,5	31	19	400	40	402900
	40	5,6	30	18	400	40	402480

All the surveyed concentrations of carbon sources significantly influenced the accumulation of biomass. When the concentration of glucose, starch, or mannitol is increased, the accumulation

of biomass also increases; when maltose, sucrose, and glycerol were used, the weight of biomass reached its maximum at the concentration of 20 g/l. The further increase of concentration of these carbon sources leads to the decrease of biomass accumulation.

According to the data, all the surveyed carbon sources with the exception of sucrose may be used for biosynthesis of the antibiotic A-70. The highest activity was observed in the medium with glucose in the concentration of 20 g/l. The decrease in concentration of glucose to 10 g/l, as well as its increase to 30 – 40 g/l, inhibits the formation of the antibiotic. Optimal concentrations that ensure the maximum accumulation of the antibiotic for maltose and mannitol are 20-30 g/l; activity of culture broth against *MRSA № 9* equals 800 dilution units/l. Further increase of their concentration in the medium decreases the formation of the antibiotic. In the concentration of 10-20 g/l starch ensures maximum biosynthesis of the antibiotic. Further increase of its concentration in the medium represses the formation of the antibiotic. For glycerol, like for the rest of carbon sources, the optimal concentration is 20 g/l. Further increase or decrease of its concentration negatively affects the formation of the antibiotic. Sucrose has a reversed effect on the formation of the antibiotic A-70; the increase of its concentration in the medium boosts biosynthesis of the antibiotic, although insignificantly. Overall, sucrose as a carbon source inhibits the formation of the antibiotic.

Based on the calculations of the total summarized activity with different carbon sources it, it was determined that glucose in the concentration of 20 g/l ensures the maximum formation of the antibiotic A-70 in culture broth (900000 dilution units/l), maltose in the concentration of 30 g/l ensures the maximum formation of the antibiotic A-70 in biomass (12600 dilution units/l).

References:

1. Сидоренко С.В. Клиническое значение антибиотикорезистентности грамположительных микроорганизмов // Инфекции и антимикробная терапия – 2003. – Т. 5. - №.2. - С.47-49.

2. Никитенко Т.А., Кондратенко Н.Н. Ведущие микроорганизмы - возбудители внутрибольничных инфекций в стационарах различного профиля в современных условиях // В сб. «Роль клинической микробиологии в профилактике внутрибольничных инфекций. Тезисы докладов Российской научно-практической конференции с международным участием». Москва. - 2004. – С. 68-69.

3. Страчунский Л.С., Дехнич А.В., Белькова Ю.А. Сравнительная активность антибактериальных препаратов, входящих в лекарственные формы для местного применения, в отношении *Staphylococcus aureus*: результаты российского мульти-центрового исследования // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия - 2002.- Т. 4. – С. 157-162.

4. Brigs J.P., Sexton D.J., Kaye K.S. Adverse clinical and economic outcomes attributable to methicillin resistance among patients with *Staphylococcus aureus* surgical site infection // Clin. Infect. Dis. - 2003. - № 36. – P. 592-597.

5. Rubin R.J., Harrington C.A., Poon A. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infections in New York City hospitals // Emerg. Infect. Dis. – 1999.- № 5. – P.9-17.

6.Lowy F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus* // J. Clin. Invest. -2003. – Vol. 111. - № 9. – P. 1265-1273.

7.Rybak M.J., Pharm D.L. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a review // Pharmacotherapy – 2005. –Vol. 25.- №1. –P.74-85.

Л.П.Треножникова¹, А.Х.Хасенова¹, С.М.Анохина², А.С.Балгимбаева¹,
С.Ш.Шакиев¹

А 70 АНТИБИОТИК-ПЕПТОЛИДИНІҢ АНТИБАКТЕРИАЛДЫҚ БИОСИНТЕЗИНЕ КӨМІРТЕГІ КӨЗДЕРІНІҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ

¹ЕМК «Микробиология және вирусология институты» ҒКБҒМҚР¹, Алматы

²Қазақстан Республикасы Президенті Іс басқармасының Медициналық орталығы², Алматы

Түйін

А-70 антибиотик-пептолидинің антибактериалдық биосинтезіне көміртегі көздерінің (глюкозаның, малтозаның, сахарозаның, крахмалдың, манниттың, глицериндың) тигізетін әсері зерттелінді. А 70 антибиотигін културалды сұйықтықта ең көп мөлшерде (1000000 бір. сұйылту/л) түзілуін глюкоза 20 г/л концентрацияда қаптамасыз етсе, малтоза 30 г/л концентрацияда А 70 антибиотигін ең көп мөлшерде биомассада түзуді қаптамасыз ететіні анықталды (12600 бір. сұйылту/л).