

Занятие семинарского типа № 2

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Скрининг продуцентов антибиотиков из почвенных микроорганизмов.

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Характеристика методов селекции

СЕЛЕКЦИЯ	<ol style="list-style-type: none">1. наука о методах создания новых сортов и гибридов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов с нужными для человека признаками;2. направленный отбор мутантов, т.е. организмов, наследственность которых претерпела скачкообразное изменение вследствие структурной модификации в нуклеотидной последовательности ДНК;3. отрасль сельскохозяйственного производства, занимающаяся выведением новых сортов и гибридов сельскохозяйственных культур, пород животных.
-----------------	--

Генеральный путь селекции – это путь от слепого отбора продуцентов к сознательному конструированию их геномов.

Теоретической основой селекции является генетика.

Выделяют три перспективных направления применения достижений селекции – селекция растений, животных и микроорганизмов. При этом третье направление – селекция микроорганизмов – способствует развитию такой сферы человеческой деятельности, как биотехнология.

К традиционным методам селекции относят: отбор, гибридизацию и мутагенез.

Предмет селекции состоит в изучении и претворении на практике специфических закономерностей эволюции культурных растений, сельскохозяйственных животных и искусственных штаммов.

Практическое значение селекции заключается в повышении продуктивности сельскохозяйственных животных, урожайности сельскохозяйственных растений и эффективности биотехнологических производств.

Методы селекции

Отбор. Различают естественный и искусственный отбора.

Естественный отбор – основной движущий фактор эволюции. Учение о естественном отборе создано Ч. Дарвином (1858–1859 гг.).

Естественный отбор – результат борьбы за существование, выражающийся в преимущественном выживании и оставлении потомства наиболее приспособленными особями каждого вида организмов, и гибели менее приспособленных особей. Необходимой предпосылкой для его действия является наследственная изменчивость организмов, а его непосредственным результатом – формирование приспособлений организмов к конкретным условиям внешней среды. Следствиями естественного отбора являются увеличение разнообразия форм организмов, последовательное усложнение организации в ходе прогрессивной эволюции и вымирание менее приспособленных видов.

Искусственный отбор – отбор, проводимый человеком, состоящий в выбраковке особей, не представляющих ценности в хозяйственной деятельности и в оставлении для потомства особей с ценными признаками.

Бессознательный искусственный отбор – отбор, при котором человек, отбирая особей для потомства, не ставит перед собой задачи изменить данный организм в каком-либо направлении, а лишь учитывает определенные его качества, необходимые для улучшения хозяйственной деятельности.

Целевой (сознательный) отбор – отбор, проводимый селекционерами, состоящий в том, что он осуществляется в соответствии с определенной, заранее поставленной целью, когда свойства организмов корректируются в определенном направлении.

Различают следующие виды целевого отбора:

✓ единичный отбор – отбор, проводимый однократно из определенной группы особей;

✓ методический (систематический) отбор – отбор, проводимый в течение нескольких поколений с целью выведения форм организма, в наибольшей степени отвечающих нуждам человека;

✓ индивидуальный отбор – отбор на уровне конкретных особей данной породы животных или сортов растений;

✓ массовый отбор – отбор потомства большого числа особей одновременно.

В селекции используют все перечисленные виды отбора. Однако, отбор сам по себе не дает результата, если у организмов не будут возникать определенные изменения. Изменения сами по себе возникают медленно, стихийно и не всегда в нужных направлениях, поэтому селекционеры используют воздействия на организм, инициируя возникновение целевых изменений.

Гибридизация (скрещивания) заключается в том, что получают потомство от особей, различающихся определенными признаками, которые можно использовать в дальнейшей селекционной работе. Гибридизация позволяет в некоторой степени нарушать консерватизм наследственности, что способствует селекционной работе.

Различают близкородственную, неродственную и отдаленную гибридизацию.

Близкородственной гибридизацией (инбридингом) называют скрещивание, в котором участвуют близкородственные организмы. Инбридинг используют для получения «чистых линий», в которых свойства, присущие данному сорту растений, породе животных или штамму микроорганизмов, выделяются в наиболее концентрированном виде. Подобное выделение целевого признака связано с тем, что генотип родственных организмов близок, а их скрещивание способствует возникновению гомозиготных форм. Следует отметить, что при инбридинге наблюдается гибридная депрессия – снижение жизнеспособности и продуктивности вследствие близкородственного скрещивания. Получение «чистых линий» находит широкое применение в селекции, т.к. позволяет выявить свойства организмов, важные для хозяйственной деятельности, а затем использовать полученные формы в дальнейшей селекционной работе.

Неродственной гибридизацией называют скрещивание особей данного вида, принадлежащих к разным семьям.

Отдаленная гибридизация – скрещивание организмов, принадлежащих не только к разным породам, но и к разным видам.

Реализация межвидовой гибридизации возможна за счет полиплоидии – явления, при котором в клетке возникает набор хромосом, в кратное число раз больший, чем это характерно для нормы.

Мутагенез – искусственное получение мутаций с помощью мутагенов.

Термин «мутагенез» предложен голландским ученым де Фризом в 1901 г.

В селекционной практике мутагенез используют для получения перспективных мутантов животных, растений и микроорганизмов.

Мутант – наследственно измененная в результате мутации форма организма. Мутанты могут возникать спонтанно или под действием мутагенов. Большинство мутантов от-

личаются от исходных организмов нарушением различных структур и функций и, как правило, отличаются пониженной жизнеспособностью. Гораздо реже возникают мутанты, обладающие преимуществами, которые широко используют для выведения новых сортов растений, пород животных и получения штаммов микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ (БАВ). В генетике мутанты используют для изучения закономерностей мутационного процесса: строения и функционирования генетического аппарата, путей биосинтеза и т.п. Мутанты играют важную роль в эволюции, т.к. представляют собой материал для естественного отбора.

Мутации – внезапные, естественные или вызванные искусственно наследуемые изменения генетического материала, приводящие к изменению тех или иных признаков организма. Мутации могут быть обусловлены перестройкой репликона (изменением в нем числа и порядка расположения генов) или изменениями внутри индивидуального гена.

Классификация мутаций

Различают спонтанные мутации, возникающие с относительно низкими частотами, и индуцированные мутации, индуцируемые воздействием мутагенов.

Виды мутагенов:

К физическим мутагенам относят: нагревание, ионизирующие, ультрафиолетовое (УФ) и микроволновое излучения. Первичный эффект ионизирующих и УФ излучений заключается в образовании одиночных или двойных разрывов в молекуле ДНК.

Мутагенным действием обладают многие химические соединения (алкилирующие соединения, нитрозосоединения, противоопухолевые антибиотики и др.). Химические мутагены классифицируют на: мутагены прямого действия, непосредственно взаимодействующие с генетическим материалом клетки, и мутагены непрямого действия, влияние которых на генетический материал клетки опосредованно, реализуется через ряд метаболических превращений. Однако, в отличие от ионизирующих и УФ излучений, для химических мутагенов свойственна специфичность действия, зависящая от природы объекта и стадии развития клетки. При взаимодействии химических мутагенов с компонентами наследственных структур возникают их первичные повреждения, приводящие к возникновению мутаций.

К биологическим мутагенам относят ДНК- и РНК-содержащие вирусы, некоторые полипептиды, белки, ряд рестриктаз и т.п. Механизм образования мутации в результате воздействия разных биологических факторов не вполне ясен. Однако, агенты, содержащие нуклеиновые кислоты, могут вызывать нарушение рекомбинации, приводящие к возникновению мутаций.

Мутации называют прямыми, если их проявление приводит к отклонению признаков от дикого типа, и обратными мутациями (реверсиями), если их проявление приводит к полному или частичному восстановлению дикого типа.

Мутации бывают: генеративными (происходят в половых клетках и передаются следующим поколениям), соматическими (происходят в соматических клетках организма и наследуются только при вегетативном размножении), ядерными (затрагивают хромосомы ядра), цитоплазматическими (затрагивают генетический материал, заключенный в цитоплазматических органоидах клетки).

По характеру изменения генотипа различают следующие виды мутаций:

Генные мутации представляют наследственные, микроскопически не выявляемые изменения в хромосомах. Они сопряжены с заменой пары азотистых оснований в полинуклеотидной цепи ДНК или с вставкой или выпадением отдельных нуклеотидов.

Хромосомные мутации (хромосомные абберации) классифицируют на: внутривхромосомные и межхромосомные. К внутривхромосомным мутациям относят: делецию (утрата части хромосомы), дупликацию (удвоение части хромосомы) и инверсию (изменение последовательности расположения генов по длине хромосомы за счет перевертывания

(инверсии) участка хромосомы на 180°). К межхромосомным мутациям относят транслокацию (обмен участками между двумя и более хромосомами).

Геномные мутации заключаются в изменении числа хромосом. Увеличение числа хромосом, кратное гаплоидному набору хромосом, называют полиплоидией. Отсутствие или избыточное количество отдельных хромосом объединяют понятием анеуплоидия, которую подразделяют на гиперплоидию (увеличение числа хромосом) и гипоплоидию (потеря отдельных хромосом). Данные мутации возникают за счет повреждений в процессе мейоза, ведущих к нерасхождению хромосом или хроматид по дочерним клеткам.

Мутационный процесс у микроорганизмов можно использовать более эффективно, чем у высших организмов, т.к. их геном является гаплоидным, что позволяет выделять любые мутации уже в первом поколении. Кроме того, к преимуществам микроорганизмов как объектов биотехнологии относятся: простота генетической организации в сравнении с эукариотами, простота генетической регуляции, отсутствие или не столь сложное взаимодействие генов. В той связи, используя методы генетической инженерии можно заставить бактерии или другие группы микроорганизмов продуцировать те соединения, синтез которых в дикой природе был им несвойственен.

2. Скрининг

В основе скрининга лежит тотальная проверка клонов, полученных в результате предварительного мутагенеза. Отобрав наиболее продуктивные клоны, повторяют обработку тем же или другим мутагеном, и вновь отбирают наиболее продуктивный вариант и т.д. В данном случае речь идет о ступенчатом отборе по целевому признаку.

Скрининг БАВ является одним из старейших методов обнаружения новых лекарственных веществ. В частности, практически все антибиотики были выделены в результате испытания супернатанта (надосадочной жидкости) посевов микроорганизмов на наличие БАВ, способных замедлять или ингибировать рост патогенной микрофлоры. Современные полусинтетические антибиотики являются результатом химической модификации базового вещества, полученного в результате скрининга.

При оптимизации любого технологического процесса, протекающего с участием живых организмов, основные усилия бывают направлены на улучшение их генетически обусловленных свойств. Традиционно для повышения продуктивности микробных штаммов используют мутагенез с последующим скринингом и отбором наиболее подходящих вариантов.

В прошлом для увеличения продуктивности штаммов – продуцентов БАВ обычно использовали мутагенез и отбор. Таким путем удалось повысить выход антибиотиков, синтезирующихся микроскопическими грибами и актиномицетами. С этой целью было последовательно отобрано свыше 20 штаммов, продуцирующих все большее количество пенициллина, и, в конечном счете, продуктивность удалось повысить в 55 раз в сравнении с исходным диким штаммом. Как в этом случае, так и во многих других, отбора не происходило, т.к. не удавалось создать условия, при которых росли бы только искомые штаммы. Вместо этого пришлось применять скрининг. Для этого клетки, выжившие после воздействия мутагенов, размножали в колбах на качалках, и после в фильтрах культуральной жидкости определяли наличие антибиотика и его количественное содержание.

К недостаткам скрининга относятся: длительность и трудоемкость. Часто штаммы продуцентов, для которых был достигнут большой выход целевого продукта при выращивании в колбах, оказывались неэффективными в условиях роста в промышленном ферментере. Кроме того, нередко успеху скрининга способствовало знание «секретов мастерства». Так, установлено, что высокая продуктивность, как правило, свойственна особым морфологическим вариантам. Еще одним недостатком скрининга является отсутствие сведений о характере мутаций, исследователь проводит отбор по конечному результату.

В случае, если речь идет о штаммах бактерий, устойчивых к тяжелым металлам, то она может быть обусловлена мутациями разных типов: подавлением системы поглощения

катионов металлов бактериальной клеткой, активацией выброса поглощенных катионов из клетки или перестройкой систем, чувствительных к ингибирующему действию тяжелых металлов.

Шанс на удачу при «скрининге наугад» исключительно низок. Обнаружение «хорошего ведущего состава» возможно с помощью простых, быстрых и селективных методов определения. В частности с помощью ситового метода, представляющего собой автоматизированный тест, позволяющий легко установить, связывается ли БАВ из библиотеки веществ с клонированным человеческим рецептором или ферментом. После того как БАВ отобрано, должно быть установлено, обладает ли оно и если да, то в какой степени, антагонистической или агонистической активностью. Для этого проводят функциональные испытания, позволяющих установить, приводит ли связывание лиганда с рецептором к передаче сигнала. При реализации современных методов скрининга все чаще используют клетки, в которых клонированный рецептор или фермент связываются с простой для определения системой считывания. Так, получены клетки, начинающие расти или изменяющие свой цвет или форму, только после стимуляции клонированного рецептора. Данные методы позволяют ежегодно оценивать биологическую активность многих БАВ.

Скрининг, реализующийся с помощью чашек с агаром вместо колб на качалках, позволяет исследовать значительно большее количество мутантов. При этом синтез антибиотиков или других БАВ нередко оценивается с помощью биологических проб, связанных с введением в агар индикаторных организмов. В настоящее время разработаны устройства для автоматического скрининга чашек, в которых используются механические приспособления для инокуляции, проводится периодическое фотографирование и последующий компьютерный анализ полученных изображений.

Кроме того, можно создавать особые условия, при которых мутанты с нужными свойствами не растут. В этом случае применяют метод обогащения, при котором активно растущие клетки дикого типа погибают, а не растущие мутантные формы выживают. Так, пенициллин или нистатин вызывают гибель растущих клеток бактерий или микроскопических грибов, соответственно. При работе с микроскопическими грибами недостаток инозитола в среде приводит к автолизу растущих, но не покоящихся клеток.

Для отбора мутантных форм одним из наиболее подходящих методов служит прямой отбор, при котором создаются оптимальные условия только для их роста. Этот подход применялся для выделения штаммов сверхпродуцентов некоторых метаболитов (аминокислот и др.). При этом культуру, обработанную мутагеном, выращивают в присутствии ингибитора (аналога аминокислоты), отбирая мутанты, преодолевающие нарушение обмена за счет образования избытка целевого БАВ.

Отбор на чашках с агаром основан на том, что часть организмов отвечает на воздействия по принципу «все или ничего», т.е. колонии мутантов растут, а диких клеток – нет. Однако, при получении производственных штаммов, особенно предназначенных для реализации длительной ферментации, нередко стремятся достичь для конкретных условий небольших различий в скорости роста. В данном случае отбор происходит при непрерывном культивировании. Так, в хемостатах при длительном выращивании культура все время находится в экспоненциальной фазе роста, что позволяет выделить и те мутанты, у которых сродство к субстрату, удельная скорость роста или устойчивость к токсическому действию высоких концентраций субстрата или продукта незначительно превышает исходный уровень.

Скрининг новых БАВ, в том числе и антибиотиков, отличающийся комплексностью, многоэтапностью и трудоемкостью, включает следующие этапы:

1. создание селективных условий для выделения из почвы микроорганизмов определенных таксонов;
2. выделение микроорганизмов из почвы;
3. использование потенциала коллекций культур микроорганизмов;
4. определение чистоты выделенных культур;

5. изучение способности выделенных культур образовывать антибиотики или другие БАВ на агаризованной и жидкой средах;
6. оценка культурально-морфологических и цитологических свойств выделенных культур;
7. оптимизация условий биосинтеза БАВ;
8. исследование фармакологической активности БАВ с помощью традиционных и новых тест-культур;
9. применение комплекса химических и биологических методов, позволяющих установить соединения с определенными химическими и биологическими свойствами;
10. идентификация антибиотиков или других БАВ;
11. оценка эффективности полученных соединений в условиях *in vivo* на моделях определенных заболеваний.

3. Антибиотики

Вторичные метаболиты (идиолиты) – низкомолекулярные соединения, не требующиеся для роста в чистой культуре, производящиеся ограниченным числом таксономических групп, часто представляющие собой смесь близкородственных соединений, относящихся к одной и той же химической группе. К ним относятся: антибиотики, алкалоиды, гормоны роста, токсины и т.п.

Антибиотики – специфические продукты жизнедеятельности организмов и их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (бактериям, микроскопическим грибам, водорослям и др.), простейшим, вирусам и злокачественным новообразованиям, избирательно задерживающие их рост или полностью подавляющих развитие.

Классификации антибиотиков

1. По спектру действия:
 - ✓ антибактериальные препараты, вызывающие гибель грамположительных (бензилпенициллин, ристомицин, новобиоцин) и грамотрицательных (полимиксин) бактерий, а также антибиотики широкого спектра действия (левомецетин, канамицин, мономицин, гентамицин);
 - ✓ противогрибковые антибиотики (нистатин, леворин, гризеофульвин);
 - ✓ противоопухолевые антибиотики, включающие в себя 6 групп: актиномицины, антракциклины, оливомицины, брунегмицины, блеомицины, интерфероны (стоталон, эленин).
2. По химической структуре:
 - ✓ ациклические антибиотики (нистатин, кандицин);
 - ✓ гетероциклические антибиотики (гризеофульвин);
 - ✓ макроциклические антибиотики (макролидазы, эритромицины);
 - ✓ ароматические антибиотики (гигромицин);
 - ✓ аминогликозидные антибиотики;
 - ✓ полипептазы (грамицидин, полимиксин);
 - ✓ пенициллины;
 - ✓ актиномицины;
 - ✓ стрептомицины.
3. По молекулярному механизму действия:
 - ✓ антибиотики, действующие на синтез бактериальной клеточной оболочки (пенициллины, ристомицин);
 - ✓ антибиотики, нарушающие синтез белков (тетрациклины, макролиды, левомецетин);
 - ✓ антибиотики, нарушающие синтез белков и порядок генетического кода (аминогликозиды);

- ✓ антибиотики, нарушающие синтез нуклеиновых кислот (противоопухолевые);
- антибиотики, нарушающие целостность цитоплазматической мембраны (противогрибковые).

К причинам поиска новых антибиотиков относятся:

- ✓ многие антибиотики являются незаменимыми лекарственными препаратами, широко применяющимися при лечении целого ряда инфекционных заболеваний, ранее считавшихся неизлечимыми, сопровождавшихся летальным исходом (туберкулез, чума, холера, брюшной тиф и др.);

- ✓ антибиотики необходимы в сельском хозяйстве, прежде всего, в качестве лекарственных препаратов, применяющихся в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и растениеводстве; некоторые антибиотики применяют в качестве стимуляторов роста животных;

- ✓ в результате широкомасштабного применения антибиотиков в качестве лекарственных препаратов происходит быстрое накопление резистентных к ним форм микроорганизмов;

- ✓ некоторые антибиотики с успехом применяются в пищевом производстве в качестве консервантов скоропортящихся продуктов (свежей рыбы, мяса, сыра, овощей);

- ✓ антибиотики – новые, ранее не известные по химическому строению соединения – представляют огромный интерес для специалистов в области химии природных соединений, изучение их структуры, а также синтез некоторых из них способствуют бурному развитию химии, а, следовательно, и науки об антибиотиках;

- ✓ антибиотики нашли широкое применение в научных исследованиях в качестве веществ, используемых при изучении отдельных сторон метаболизма организмов, расшифровки тонких молекулярных механизмов биосинтеза белка, механизма функционирования мембран и других биохимических превращений в качестве специфических ингибиторов определенных реакций. Так, одни антибиотики (хлорамфеникол, пуромицин, тетрациклин) специфически ингибируют отдельные этапы биосинтеза белка на рибосомах, другие – синтез на разных уровнях нуклеиновых кислот (саркомицин подавляет активность полимераз, актиномицин, блеомицин, рубомицин и др. нарушают функции ДНК), третьи – образование клеточных стенок (пенициллины) и т.п.;

- ✓ изучение путей биосинтеза антибиотиков способствует глубокому проникновению в механизмы синтетической деятельности их продуцентов и раскрытию основных этапов их метаболизма.

В настоящее время описано свыше 6000 антибиотиков. Однако, только 2–3 % известных антибиотиков применяются в медицинской практике, а остальные вследствие высокой токсичности, инактивации в организме и других причин не используются.

Большинство антибиотиков выделено в ходе систематического скрининга микроорганизмов, а их количество существенно увеличено за счет химической модификации. При этом к основным целям модификации антибиотиков относятся:

- ✓ расширение спектра и повышение эффективности их действия;
- ✓ снижение их токсичности и устранение нежелательных побочных эффектов;
- ✓ создание их аналогов, устойчивых к разрушению микроорганизмами, обладающих большим временем «полужизни»;
- ✓ усовершенствование способов их введения.

Физиологическое значение антибиотиков для их продуцентов до конца неясно. Одни исследователи считают, что биосинтез антибиотика создает определенные преимущества микроорганизмам – продуцентам в борьбе за существование в природных популяциях. Согласно другой точки зрения, антибиотики представляют собой «отбросы» обмена веществ микроорганизмов, не имеющие приспособительного назначения.

Одним из наиболее богатых источников антибиотиков является почвенная микрофлора. В почвенных микроэкосистемах сильно развита конкуренция между их обитателями. При этом антибиотики входят в тот природный «арсенал», который необходим для захвата экологической ниши. Образцы почв из разных регионов мира постоянно анализируют в поисках новых антибиотиков. Одним из самых активных продуцентов антибиотиков является род *Streptomyces*, к которому принадлежат многие актиномицеты.

При оптимизации любого технологического процесса, протекающего с участием живых организмов, основные усилия, как правило, направлены на улучшение их генетически обусловленных свойств. Традиционно для увеличения продуктивности микробных штаммов используют мутагенез с последующим скринингом и отбором наиболее подходящих вариантов. До «эры» генетической инженерии ценные для производства антибиотиков штаммы с повышенной продуктивностью получали в основном с помощью мутагенеза и селекции природных микроорганизмов. Так, в результате селекции и улучшения техники ферментации выход пенициллина достиг 20 г/л, что в 10 тыс. раз выше уровня, свойственного для исходного «дикого» штамме *Penicillium*.

4. Биотехнологическое производство антибиотиков

4.1. Структура биотехнологического производства антибиотиков

Подготовка питательной среды. При разработке биотехнологического производства антибиотиков учитывают общие свойства их продуцентов, а также то обстоятельство, что каждый антибиотик является конечным продуктом длинной цепи специфических ферментативных реакций.

Продуценты большинства антибиотиков, в том числе и ценных для клинической практики, являются аэробами или реже факультативными анаэробами.

Процесс развития микроорганизмов – продуцентов антибиотиков имеет двухфазный характер:

Первая фаза (трофофаза или фаза сбалансированного роста) характеризуется тем, что происходит быстрое накопление биомассы продуцента антибиотика, сопровождающееся интенсивным потреблением основных компонентов субстрата (источников углерода, азота, фосфора и др.), некоторым снижением значения рН среды вследствие образования кислых продуктов. В этот период биосинтез антибиотика не происходит или осуществляется в очень незначительном количестве.

Вторая фаза (идиофаза или фаза несбалансированного роста) характеризуется снижением общего количества биомассы. В этот период еще происходит образование новых клеток. Однако, в культуре начинают преобладать автолитические процессы, приводящие к снижению общего количества биомассы. При этом среда обогащается продуктами обмена и автолиза клеток, возрастает значение рН и наблюдается интенсивный биосинтез антибиотика.

Биосинтезу антибиотиков способствует значительное снижение содержания в среде источников углерода и азота, особенно легко усваиваемых. Однако, выращивание продуцентов с самого начала ферментации на обедненных средах нецелесообразно, т.к. незначительное накопление биомассы в течение трофофазы ведет, в конечном счете, и к невысокому выходу антибиотика.

Продуценты антибиотиков выращивают на простых и сложных (комплексных) средах. В состав комплексных сред могут входить: соевая или хлопковая мука, кукурузный экстракт и другие природные многокомпонентные источники питательных веществ. Кроме того, в состав сред вводят индивидуальные органические соединения и минеральные соли. Для каждого штамма продуцента состав среды, оптимальной для биосинтеза антибиотика, подбирают индивидуально. Это относится и к штаммам одного вида, продуцирующим один и тот же антибиотик.

Отмечают некоторые общие закономерности, которые следует учитывать при работе с большинством продуцентов антибиотиков. Углеродкатаболическая регуляция является одним из механизмов регуляции биосинтеза вторичных метаболитов. Известно, что глюкоза служит лучшим источником углерода и энергии для многих организмов. Однако, быстрый катаболизм глюкозы резко снижает биосинтез антибиотиков. Доказано, что глюкоза ослабляет биосинтез β -лактамов, аминогликозидов и др. Кроме того, установлено, что глюкоза, фруктоза, сахароза и галактоза являются сильными репрессорами биосинтеза антибиотиков. При этом продукты катаболизма глюкозы подавляют не активность ферментов биосинтеза антибиотиков, а синтез этих ферментов. Медленно утилизирующиеся полисахариды (крахмал и др.) более благоприятны для биосинтеза антибиотиков. Медленно утилизирующаяся лактоза также не является репрессором биосинтеза антибиотиков. Глюкоза, высвобождающаяся при ее гидролизе, репрессирует β -галактозидазу, что замедляет гидролиз лактозы.

Высокое содержание в среде фосфора (в виде неорганических фосфатных солей) неблагоприятно влияет на биосинтез большинства антибиотиков. Общая причина этого состоит в обогащении клеток макроэргическим фосфорными соединениями (АТФ), повышающими скорость роста мицелия. При этом накапливается большое количество биомассы и синтезируется небольшое количество антибиотика. Однако, фосфор не может быть полностью исключен из среды. Учитывая, что биосинтез антибиотиков снижается при избыточном содержании источников фосфора, их оптимальное содержание в среде для каждого штамма продуцента определяют индивидуально.

Аммоний и другие легкоутилизирующиеся источники азота подобно легкоокисляющимся углеводам усиливают рост продуцентов β -лактамовых и полиеновых антибиотиков. Однако, они отрицательно влияют на их биосинтез. Соевая и хлопковая мука, белково-витаминный концентрат медленно расщепляется в процессе ферментации, из них медленно высвобождаются аминокислоты и ионы аммония, поэтому их используют в качестве компонентов сред, обеспечивающих высокий выход антибиотиков. Механизм отрицательного действия легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков не ясен. Вероятно, что у разных продуцентов этот механизм различен. В любом случае неблагоприятное действие легкоусвояемых источников азота на биосинтез антибиотиков обязательно учитывают при подборе питательных сред.

Некоторые первичные метаболиты являются прямыми предшественниками антибиотиков. Так, валин включается в трипептид, из которого формируется β -лактамовый структуры. При избытке валина в мицелии происходит подавление биосинтеза антибиотика по принципу обратной связи. Избыток валина в среде подавляет активность ацетогидрокси-синтетазы – первого фермента своего биосинтетического пути. В результате снижается образование трипептида, а в, конечном счете, и β -лактамового антибиотика.

Кроме того, некоторые первичные метаболиты являются конечными продуктами разветвленного метаболического пути. Одно «ответвление» или один конец этого пути заканчивается первичным метаболитом, другое «ответвление» – антибиотиком. Так, α -аминоадипиновая кислота является, с одной стороны, прямым предшественником лизина, с другой – β -лактамового антибиотика, т.к. включается в исходный для его биосинтеза трипептид. При избытке лизина происходит подавление образования α -аминоадипиновой кислоты по принципу обратной связи и, следовательно, снижается синтез не только лизина, но и β -лактамового антибиотика.

У высокоактивных штаммов продуцентов антибиотиков, полученных методами генетической инженерии, должны быть нарушены механизмы обратной регуляции биосинтеза тех первичных метаболитов, которые необходимы для образования молекулы антибиотика. В частности, лизин подавляет биосинтез пенициллина у малоактивных продуцентов. При этом полученные на их основе «изогенные» высокоактивные штаммы уже не отвечают снижением биосинтеза антибиотика на избыток лизина в среде.

Кроме того, на выход целевого продукта влияет значение рН среды. Для развития бактерий оптимум рН среды составляет около 7,0, для микроскопических грибов – 4,5–5,0, для актиномицетов – 6,7–7,5. Для большинства известных антибиотиков оптимальное значение рН близко к нейтральному. При значительном закислении или защелачивании среды биосинтез целевого продукта снижается. Многие антибиотики в щелочных или кислых средах неустойчивы и легко инактивируются. Для регулирования величины рН в среды для биосинтеза антибиотиков часто добавляют некоторое количество мела, который вступая в реакцию с образующимися в процессе метаболизма кислотами, образует нейтральные соли и углекислый газ, впоследствии удаляемый из среды.

Отсутствие посторонней микрофлоры является одним из важных параметров биотехнологического производства антибиотиков. Для обеспечения асептических условий при реализации биопроизводства антибиотиков, подвергают стерилизации все технологическое оборудование и коммуникации, питательную среду и воздух для аэрации. При этом засев ферментера, отбор проб на анализ осуществляются в асептических условиях.

Развитие посторонней микрофлоры при биотехнологическом производстве антибиотиков опасно в следующих отношениях:

- ✓ посторонняя микрофлора, развиваясь в среде, видоизменяя ее и, тем самым, нарушая оптимальные условия биосинтеза антибиотика;
- ✓ наличие посторонней микрофлоры затрудняет дальнейшую обработку культуральной жидкости, ее отделение от мицелия, приводя к получению некачественного нативного раствора;
- ✓ продукты жизнедеятельности посторонней микрофлоры могут загрязнять целевой продукт, снижая его качество.

Важность аэрации для обеспечения накопления биомассы обусловлена тем, что большинство продуцентов антибиотиков являются аэробами. Кислород необходим для биосинтеза ряда антибиотиков. При этом он расходуется на замыкание β -лактамного и тиазолидинового колец в процессе биосинтеза β -лактамной структуры. В целом потребность в кислороде зависит от концентрации биомассы и ее метаболической активности. Оптимизация снабжения кислородом обеспечивается за счет увеличения скорости его переноса.

Для осуществления биосинтеза антибиотиков необходим оптимальный температурный режим. Так, оптимальная температура для биосинтеза пенициллина культурой рода *Penicillium* составляет 25–26 °С. В то время, как при образовании антибиотиков актиномицетами обычно поддерживают более высокую температуру 27–29 °С.

Подготовка культуры продуцента. Подготовка посевного материала включает следующие этапы:

мутантный штамм → колба на качалке → первый инокулятор (10 л) →
→ второй инокулятор (100–500 л) → ферментер (биореактор).

Ферментация – специализированный процесс получения разных БАВ в химической или родственной отраслях производства с помощью биологических объектов, включая процесс их размножения.

Современная ферментационная установка состоит из нескольких небольших емкостей для инокуляции и ферментера большого размера (от 1 л до 1000 м³) для реализации конечной стадии получения целевого продукта, соединенные между собой с помощью фиксированных трубопроводов или гибких шлангов. В ферментерах часто используют механическое перемешивание. Кроме того, ферментационные установки включают в себя установки для обработки сырья, емкости для приготовления питательной среды, оборудование для непрерывной стерилизации, установки для получения пара высокого давления и больших объемов стерильного воздуха.

При биотехнологическом производстве антибиотиков используют поверхностную или глубинную ферментацию.

Ферментация, как правило, сопровождается выделением большого количества тепла, поэтому для поддержания оптимального температурного режима необходимо постоянное охлаждение среды.

В связи с тем, что продуценты антибиотиков, как правило, являются аэробами, для их нормальной жизнедеятельности необходимо обеспечить оптимальный уровень аэрации. Во время ферментации происходит одновременно два процесса – растворение кислорода в среде и потребление кислорода культурой продуцента. Микроорганизмы используют для дыхания только растворенный в среде кислород. В этой связи, их обеспеченность кислородом определяется скоростью его растворения в культуральной жидкости. При глубинном культивировании в промышленных масштабах данный процесс осуществляется путем пропускания воздуха через питательную среду и культуральную жидкость с помощью специальных аэрирующих приспособлений (барботеров и т.п.). При этом культуральная жидкость интенсивно перемешивается.

Основное назначение аэрации и перемешивания заключается в снабжении культуры кислородом. Кроме того, эти процессы способствуют поддержанию мицелия в равномерно взвешенном состоянии и выравниванию концентрации питательных веществ и продуктов обмена в культуральной жидкости.

Питательные среды для биосинтеза антибиотиков содержат вещества, способные образовывать стойкие пены. Кроме того, они могут образоваться в процессе ферментации. Аэрация и перемешивание среды также обуславливают образование слоя пены на поверхности культуральной жидкости, ухудшающего условия развития продуцента. Пеногашение, в основном, осуществляется за счет введения поверхностно активных веществ (ПАВ), способствующих снижению стойкости пены и в дальнейшем ее разрушению.

После завершения ферментации культуральная жидкость содержит растворенный антибиотик, мицелий продуцента, продукты его лизиса, ряд компонентов неиспользованной питательной среды, в том числе высоко- и низкомолекулярные органические вещества и неорганические соли. В некоторых случаях антибиотик содержится не только в культуральной жидкости, но и в мицелии. Культуральная жидкость нередко отличается высокой вязкостью, поэтому выделение антибиотика из такой сложной гетерогенной системы представляет очень трудоемкую процедуру.

Выделение и очистка целевого продукта. Используемые в настоящее время методы выделения и очистки разрабатывается применительно к конкретному антибиотику. Их выбор определяется физико-химическими свойствами антибиотика: локализацией, составом культуральной жидкости, ее реологическими и другими характеристиками.

На стадии предварительной обработки растворенный антибиотик отделяют от суспензии мицелия и компонентов культуральной жидкости, находящихся в коллоидном состоянии. В случае, если часть антибиотика находится в мицелии, то его переводят в водную фазу, например, путем изменения величины рН культуральной жидкости (тетрациклины). Иногда, наоборот, растворенный и связанный с мицелием антибиотик объединяют в общем осадке, из которого его экстрагируют. Нативный раствор отделяют от мицелия и коллоидных частиц с помощью фильтрации или центрифугирования.

На следующей стадии решается задача выделения антибиотиков в виде индивидуального вещества. При этом следует учитывать высокую лабильность многих антибиотиков, что ограничивает условия их выделения.

Экстракция с помощью органических растворителей используется при очистке таких антибиотиков, как пенициллин, эритромицин и др. При переходе в органический растворитель соответствующие антибиотики освобождаются от многих примесей. Варьируя значение рН и, изменяя таким путем растворимость антибиотика в воде (точнее, в буферном растворе), можно многократно переводить антибиотик из одной фазы в другую, освобождая его каждый раз от определенного количества примесей.

При очистке антибиотиков широко используются ионообменные смолы. Особую роль сорбционные методы в свое время сыграли при решении проблемы получения высоко-

коочищенных аминогликозидных антибиотиков (стрептомицина и др.), имеющих свойства оснований. Аминогликозиды плохо растворимы в органических растворителях, поэтому для их выделения экстракционный метод не используют. В производстве стрептомицина могут быть успешно использованы карбокислые катиониты в натриевой форме. При этом десорбция антибиотика с колонки осуществляется раствором серной кислоты. После дополнительной процедуры, связанной с пропусканием стрептомицина через сульфокатионит (для удаления ионов натрия), получают сульфат стрептомицина.

Помимо традиционных экстракционных и сорбционных методов при выделении и очистке антибиотиков все большее значение приобретает комплекс приемов, объединяемых под названием мембранной технологии.

При обезвоживании препаратов антибиотиков в зависимости от их свойств применяют лиофильную или распылительную сушку. В последнем случае раствор антибиотика распыляется с помощью форсунок до частиц диаметром 5–25 мкм в токе воздуха, нагретого до температуры 160 °С. При этом сушка реализуется в течение долей секунды. Затем полученный лекарственный препарат фасуют в стерильные флаконы с соблюдением условий, гарантирующих стерильность.

Поскольку биосинтез антибиотиков осуществляется в асептических условиях, то при их выделении, очистке и получении лекарственных форм также соблюдаются все возможные меры против микробной контаминации. Тем не менее, проблема стерильности инъекционных препаратов и обсемененности лекарственных препаратов для наружного применения остается одной из самых сложных для производства, как антибиотиков, так и лекарственных средств, в целом. В этой связи, в некоторых случаях при обнаружении расфасованных нестерильных серий лекарственных препаратов применяют метод радиационной стерилизации. При такой стерилизации микроорганизмы, загрязняющие лекарственный препарат, утрачивают способность к размножению и гибнут вследствие повреждения ДНК. Радиационная стерилизация используется на отдельных производствах в виду объективных трудностей при внедрении технологии получения нового лекарственного препарата, а иногда и по экономическим причинам.

Готовый продукт (антибиотики медицинского назначения) подвергается биологическому и фармакологическому контролю. Биологический контроль позволяет определить степень стерильности лекарственного препарата. При фармакологическом контроле проводят всесторонние испытания лекарственного препарата на токсичность, пирогенность, токсикогенность и др., устанавливают максимально переносимую дозу антибиотика, дозы, вызывающие 50 % и полную гибель экспериментальных животных.

Антибиотики немедицинского назначения (биовит, биомидин, гризин, бацитрацин, гигромицин и др.), используемые в сельском хозяйстве, также получают в строго стерильной культуре. Однако, готовый продукт представляет собой высушенную биомассу продуцента или культуральную среду. В таком продукте, кроме антибиотика, содержатся и другие БАВ (витамины, ферменты, аминокислоты и др.).

Антибиотики, полученные микробиологическим способом, как правило, подвергают химической модификации, в результате которой возможно получение лекарственных препаратов с более выраженным физиологическим действием.

4.2. Частная биотехнология антибиотиков

Биотехнология гентамицина сульфата

Гентамицина сульфат – антибиотик, относящийся к группе аминогликозидов, представляющий собой смесь гентамицина сульфатов, продуцируемых культурой *Micromonospora purpurea*. Он подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе *Proteus* и *Pseudomonas*, не оказывает воздействия на микроскопические грибы. Данный лекарственный препарат эффективен при инфекциях мочевыводящих путей, респираторных и желудочно-кишечных болезнях. В связи с широким спектром дей-

ствия его часто назначают при смешанной инфекции, а также в тех случаях, когда возбудитель не установлен.

Современное биотехнологическое производство гентамицина сульфата представляет собой сложную многоступенчатую систему, состоящую из ряда последовательных технологических стадий.

Приготовление посевного материала и питательной среды. Исходной в производстве гентамицина является культура *M. purpurea var. violacca* штамм ВНИИ-7R, выращенная в пробирках на скошенной агаризованной среде Гаузе-1.

Подготовка посевного материала является одной из ответственных операций при биотехнологическом производстве гентамицина сульфата. От качества и количества посевного материала зависит как развитие культуры в биореакторе, так и биосинтез целевого продукта в целом.

При получении вегетативного посевного материала второй генерации используют вегетативный посевной материал первой генерации, если он отвечает следующим требованиям:

- ✓ биомасса средней густоты от бежевого до розово-сиреневого цвета, при взбалтывании мицелий обволакивает стенки флакона, не оседает на дно и не расслаивается;
- ✓ при микроскопии окрашенного препарата наблюдаются микроколонии, гифы длинные или средней длины, волнистые, протоплазма базофильная, иногда в виде пунктира;
- ✓ посторонняя микрофлора отсутствует.

Выращивание вегетативного посевного материала второй генерации осуществляют в посевном аппарате (инокуляторе) для глубинного культивирования, снабженного мешалкой, барботером для подачи воздуха, рубашкой для нагрева и охлаждения среды.

Приготовление питательной среды проводят в биореакторе.

Ферментация (биосинтез гентамицина сульфата). Биосинтез гентамицина сульфата осуществляется путем периодической глубинной ферментации.

Посевной материал вносят в ферментационную среду в количестве 5–10 % от ее объема. Время ферментации составляет 6–7 сут. Режимы культивирования продуцента в биореакторе изменяют в процессе роста мицелия (табл. 1).

Таблица 1

Режимы культивирования продуцента гентамицина сульфата

Регулируемые показатели	Продолжительность культивирования, ч		
	0 – 24	24 – 96	96 – до слива
Температура, °С	37±1	33±1	33±1
Расход воздуха на аэрацию, дм ³ /мин.	75	105	75
Частота вращения мешалки, об./мин.	3,5	4,16	35

Изменение режима аэрации в биореакторе осуществляют с учетом массообменных характеристик аппаратов по сульфитному числу.

Давление в процессе биосинтеза поддерживается в пределах 0,05–0,2 кгс/см².

При вспенивании культуральной жидкости вводят стерильный пеногаситель.

Постферментационная обработка. Предварительная обработка и ультрафильтрация культуральной жидкости. Культуральную жидкость из биореактора выгружают в приемную емкость, включают насос на перемешивание и проводят предварительную обработку за счет последовательного введения реагентов (растворы щавелевой кислоты, цетилперидиний бромид) для коагуляции белков и удаления поливалентных металлов.

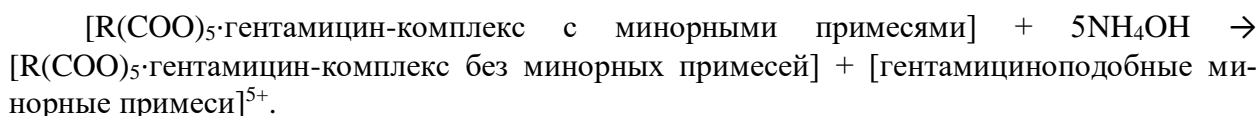
При ультрафильтрации культуральной жидкости происходит одновременное концентрирование растворов высокомолекулярных соединений (ВМС), в том числе и антибиотиков, и их очистка от низкомолекулярных примесей путем пропускания данного раствора через мембрану.

Сорбция гентамицина на катионите КБ-2 в аммонийной форме и десорбция. Процесс выделения и очистки гентамицина сульфата на катионите КБ-2 включает следующие опе-

рации: его сорбцию из раствора, вымывание минорных компонентов и десорбцию целевого продукта.

Для сорбции гентамицина сульфата его нативный раствор из сборной емкости подают с помощью насоса снизу вверх на ионнообменную колонку, заполненную катионитом КБ-2 в аммонийной форме.

В колонке десорбции осуществляют химическую очистку (удаление гентамициноподобных и окрашивающих примесей) и десорбцию гентамицина сульфата. Вымывание минорных компонентов примесей проводят 0,043N раствором аммиака, пропуская его через слой катионита в ионообменной колонне сверху вниз:



Десорбцию гентамицина сульфата проводят 5 % раствором аммиака, пропуская его через колонну с катионитом сверху вниз.

Получение концентрата гентамицина. Полученный элюат гентамицина сульфата упаривают на роторном испарителе при температуре 50–55 °С и давлении 0,085 МПа для удаления аммиака и концентрирования гентамицина сульфата до 60000–70000 мкг/см².

Осветление концентрата гентамицина основания углем и перевод его в сульфат форму. Очищенный и сконцентрированный гентамицина основание помещают в колбу, подкисляют раствором 20 % серной кислоты до значения рН 6–6,5, добавляют уголь активированный (7 % от объема концентрата) и нагревают до температуры 40–45 °С в течение 30 мин. при перемешивании, затем уголь отфильтровывают.

Распылительная сушка водных растворов гентамицина сульфата. Распылительную сушку осветленного концентрата гентамицина сульфата проводят с помощью сушилки, предназначенной для распылительного обезвоживания растворов в асептических условиях. В данном случае осушителем является очищенный воздух. Перед началом работы все детали сушильной камеры моют, обрабатывают дезинфицирующим средством и высушивают горячим воздухом при температуре 108 °С. Затем устанавливают значения температур воздуха-теплоносителя на входе – 175–185 °С и на выходе из сушильной камеры – 103–105 °С. Раствор антибиотика, подаваемый в сушильную камеру, распыляется в токе нагретого воздуха до мелких капель.

Фасовка, упаковка и маркировка лекарственного препарата гентамицина сульфата. Загрузку, выгрузку лекарственного препарата из сушилки, а также его фасовку проводят в помещениях, в которых поддерживаются асептические условия.

В данном случае фасовка осуществляется в ламинарном боксе. Порошок гентамицина сульфата переносят из приемной тары распылительной сушилки во флаконы из оранжевого стекла с винтовой горловиной и навинчивающейся крышкой. На каждый флакон наклеивают этикетку, на которой указывают министерство, предприятие-изготовитель, его товарный знак, название лекарственного препарата, активность в 1 мг, содержание действующего вещества в млрд. ЕД, массу нетто, регистрационный номер, номер серии, срок годности, условия хранения (при комнатной температуре, в темном сухом месте).

5. Антибиотикорезистентность

5.1. Механизмы антибиотикорезистентности

Одновременно с расширением области применения антибиотиков увеличилось число патогенных штаммов микроорганизмов, проявляющих повышенную устойчивость к отдельным или нескольким антибиотикам, что привело к снижению, а в ряде случаев к потере эффективности примененных этих лекарственных средств.

Появление устойчивых штаммов микроорганизмов обусловлено, в том числе и включением антибиотиков в качестве кормовых добавок в рацион сельскохозяйственных

животных. Так, у поросят, получавших с кормом хлортетрациклин, выделили кишечные палочки, устойчивые не только к нему, но и к стрептомицину, левомецитину и сульфаниламидам. Признак устойчивости при конъюгации передавали 40 % таких штаммов.

Увеличение числа резистентных микроорганизмов вызвало необходимость детального изучения причин появления факторов, способствующих их распространению и последующей разработки методов предупреждения и преодоления лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний.

Комитетом экспертов ВОЗ одобрено два определения устойчивости бактерий к антибиотикам в клиническом и бактериологическом аспектах.

В клиническом смысле микроорганизм условно может быть признан устойчивым, если он переносит концентрацию антибиотика, которую не представляется возможным достичь в месте инфекции. Устойчивость в клиническом аспекте обусловлена и токсичностью антибиотика, которая может ограничивать дозу вводимого лекарственного средства.

С бактериологической точки зрения микроорганизм устойчив, если он переносит более высокие концентрации лекарственного препарата, чем другие штаммы того же вида.

В этой связи, устойчивость – это понятие относительное, оно может считаться абсолютным только в том случае, если микроорганизм совершенно лишен определенных структур, на которые воздействует антибиотик. Так, L-формы бактерий, не имеющие клеточной стенки, которая является местом воздействия пенициллина, абсолютно устойчивы к данному антибиотику.

Различают природную, приобретенную и трансмиссивную (плазмидную) антибиотикорезистентность.

Примером природной антибиотикорезистентности может служить невосприимчивость *E. coli* к бензилпенициллину, основанная на особенностях структуры ее оболочки, затрудняющей доступ антибиотика к чувствительному субстрату.

Приобретенная устойчивость развивается благодаря способности отдельных бактериальных клеток к мутации, которая не является направленной и не связана с воздействием лекарственных веществ. В результате применения антибиотика, который в данном случае играет роль селективного агента, чувствительные клетки погибают, а устойчивые мутанты выживают, размножаются и становятся источником распространения антибиотикорезистентных штаммов. С генетической точки зрения приобретенная устойчивость – это приобретение клеткой нового признака, который не отражается на ее таксономическом положении, и может быть утрачен без изменения остальных признаков.

По скорости возникновения различают два вида приобретенной антибиотикорезистентности: стрептомициновая устойчивость, возникающая за счет одноступенчатой мутации, когда резистентные мутанты популяции выявляются после одно- или двукратного контакта с антибиотиком, и пенициллиновая устойчивость, возникающая в результате многоступенчатых мутаций, когда резистентные мутанты популяции выявляются после многократного контакта с антибиотиком.

В зависимости от механизма, лежащего в основе возникновения приобретенной антибиотикорезистентности, также различают ферментативную устойчивость, основанную на способности бактерий инактивировать антибиотик с помощью специфических ферментов (β -лактамаз, амидаз и т.п.). Данный тип защиты микробной клетки часто является причиной отрицательного результата проводимой антибиотикотерапии. Ферментативной инактивации подвергаются все важнейшие классы антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, эритромицин и др.).

Трансмиссивная (плазмидная) антибиотикорезистентность возникает в результате переноса от клеток-доноров к клеткам-реципиентам ДНК-содержащего генетического материала, находящегося в хромосомах или расположенного вне хромосом.

Внехромосомные ДНК-содержащие элементы относятся к классу плазмид (эписом). Плазмиды, ответственные за передачу антибиотикорезистентности, называются R-плазмидами (R-факторами). Они содержат детерминанты резистентности к антибиотикам

и единицы переноса R^{TF}. Для переноса антибиотикорезистентности необходимо сочетание этих генетических структур. Одна R-плазмида может содержать детерминанты резистентности одновременно к двум и более антибиотикам. Происхождение R-плазмид не зависит от применения антибиотиков. При этом антибиотики в качестве селективных веществ способствуют лишь отбору штаммов – носителей R-плазмид. Широкое распространение R-плазмид, главным образом, связано с наличием природного резервуара бактерий – носителей R-плазмид (домашние животные, птицы, рыбы, человек и т.п.), а также с возможностью межбактериальной передачи R-плазмид от непатогенных видов патогенным с помощью трех механизмов:

- ✓ трансформация – процесс передачи ДНК-содержащих материалов от лизированных клеток клетками-реципиентами; является очень редким способом передачи антибиотикорезистентности;

- ✓ трансдукция – процесс передачи генетического материала от клеток-доноров к клеткам-реципиентам с помощью фага; данный способ передачи антибиотикорезистентности отмечен у стафилококков и энтерококков;

- ✓ конъюгация – половой процесс передачи генетического материала при прямом контакте клеток через плазматические мостики; данный путь передачи антибиотикорезистентности является преобладающим, он установлен для сальмонелл, эшерихий, шегел и других грамотрицательных микроорганизмов.

Широкое распространение носительства R-плазмид среди патогенных и непатогенных микроорганизмов, изолированных от сельскохозяйственных животных, свидетельствует о серьезной угрозе снижения эффективности антибиотиков и необходимости поиска способов для предупреждения и подавления передачи R-плазмид.

5.2. Пути преодоления антибиотикорезистентности

Потребность периодического обновления антибиотиков, применяющихся в клинической практике, обусловлена постепенным распространением в микромире вариантов резистентности к антимикробным препаратам. Постоянное применение в клиниках определенного географического региона конкретного антибиотика в течение 20–30 и более лет приводит к тому, что резистентные к нему штаммы начинают обнаруживаться все чаще. Антибиотики, применяющиеся в медицинской практике, непосредственно с геномом микроорганизмов не реагируют, т.е. не являются мутагенами.

Однако, в популяциях микроорганизмов происходят, хоть и редко, разнообразные спонтанные мутации отдельных генов, причины которых неизвестны. При этом образуются мутанты с измененными субклеточными структурами и отклонениями в метаболизме. Нормальные клетки, являясь результатом длительной эволюции, хорошо приспособлены к окружающим естественным условиям. В то время, как мутанты к таким условиям приспособлены хуже и, спустя некоторое время, после ряда генераций исчезают. Однако, в случае, если внешняя среда изменилась, и данные изменения длительно сохраняются, то мутантные формы могут оказаться лучше приспособленными к новым условиям, что и объясняет распространение такого разнообразия антибиотикорезистентных форм.

Одни и те же антибиотики при их массовом и непрерывном применении играют роль селективных факторов отбора резистентных к ним мутантных форм. В этом случае именно мутанты, обладающие резистентностью, реализуют свой потенциал. Исходные антибиотикочувствительные культуры такой возможности не получают даже в случае, если скорость их размножения в свободной от антибиотиков среде выше, чем у мутантных. Однако, спонтанные мутации не являются единственным источником генов антибиотикорезистентности.

У продуцентов некоторых антибиотиков (аминогликозидов) имеются ферменты, модифицирующие или трансформирующие молекулу собственного антибиотика, что приводит к его последующей инактивации. Гены, кодирующие ферменты инактивации, могут включаться в ДНК некоторых фагов, а иногда и в плазмиды. Они переносятся из проду-

центров в клетки патогенных и непатогенных бактерий. В этой связи, попадание генов резистентности в патогенные микроорганизмы предопределено существованием в биоценозах самих продуцентов антибиотиков.

Получены прямые доказательства того, что гены резистентности к антибиотикам и, соответственно, разные ее механизмы существовали до конца 50-х гг. XX в., т.е. до того, как в клинике стали применять пенициллин, стрептомицин, левомицетин и др.

Музейные коллекции культур бактерий, хранившиеся с конца XIX в. и не соприкасавшиеся с антибиотиками (музейные культуры пересеваются 2–3 раза в год в боксах с особыми предосторожностями), содержат, хотя и редко, варианты, устойчивые к тем или иным антибиотикам. Так, у этих культур обнаружены гены, кодирующие образование β -лактамаз.

Кроме того, еще одно доказательство изначального существования генов антибиотикорезистентности получено микробиологами в 60-х гг. XX в. в труднодоступных районах планеты, в которых местное население еще не соприкасалось с антибиотиками (верховья Амазонки, острова Полинезии). Из кишечной микрофлоры аборигенов, хотя и редко, но выделяли штаммы с генами резистентности, обуславливающими образование β -лактамаз или ферментов, инактивирующих антибиотики аминокликозидной структуры.

Все перечисленные факторы свидетельствуют, что полностью избавиться от генов антибиотикорезистентности теоретически невозможно, но частоту их распределения можно минимизировать. Изъятие антибиотика из клинической практики будет означать уменьшение распространенности к нему генов резистентности. Через определенное время антибиотик и близкие к нему лекарственные препараты восстановят свою эффективность и могут быть возвращены в клинику. Так, в США ставший малоэффективным стрептомицин, был вытеснен из клинической практики гентамицином, амикацином, полусинтетическими β -лактамами и другими новыми антибиотиками. В небольших городах, не являющихся транзитными пунктами для большого количества людей, стрептомицин восстановил свою эффективность спустя примерно 20 лет после прекращения его применения. В Нидерландах было запрещено использование тетрациклина в животноводстве в виду широкого распространения тетрациклино-резистентных сальмонелл. Уже спустя 5 лет частота встречаемости этих бактерий в стране снизилась в 2 раза, а применение тетрациклина при пищевых отравлениях стало в 2 раза более эффективным.

Общая стратегия борьбы с антибиотикорезистентностью может заключаться в последовательной замене одних лекарственных препаратов другими с возвращением «старых» лекарственных средств в клиническую практику через определенное время. Такая «цикличность» быстрее приведет к необходимым результатам, если она будет соблюдаться в крупных географических регионах.

В настоящее время в клинической практике ассортимент антибиотиков и других антимикробных препаратов не позволяет эффективно полностью заменять одни группы антибиотиков другими. Однако, при условии получения ряда новых групп антибиотиков принцип цикличности может быть реализован. В этом случае постепенно произойдет значительное уменьшение генов резистентности к представителям временно исключенных из клиники групп антимикробных препаратов.

В этой связи, не только эффективность лечения, но и возвращение к экологическому равновесию в микрофлоре, окружающей человека, требует усиления работы в области создания с помощью био- и оргсинтеза антибиотиков с новыми механизмами действия.

Значительное число исследований посвящено разработке методов подавления межбактериальной передачи резистентности к антибиотикам. Установлено, что некоторые антибиотики (стрептомицин, неомицин, рифампицин, полимиксин), нитрофурановые препараты (фурагин, фуразолин), пиронин, кофеин и др. препятствуют передаче трансмиссивной устойчивости к антибиотикам. Одновременно с этим проводятся исследования, направленные на разработку способов преодоления резистентности микроорганизмов к антибиотикам. Учитывая, что хромосомный и плазмидный тип резистентности микроор-

организмов к антибиотикам обусловлен субклеточными молекулярными структурами, состоящими из ДНК, представляется возможным применение ДНК-тропных соединений, обладающих способностью элиминировать R- и RTF-факторы или необратимо нарушать генетические функции бактериальной хромосомы. Такой способностью обладают хинакрин, акрифлавин, митомицин С и др. Принимая во внимание, что у резистентных форм снижается способность поглощать антибиотики, предприняты попытки изменить их чувствительность к антибиотикам за счет одновременного использования мембранотропных препаратов и ПАВ, способных увеличивать проникновение антибиотиков в микробную клетку. Среди испытанных веществ наиболее перспективными оказались протамин, гистоны, имидазолин, а также антибиотики микробомитин и флавомицин. Целесообразен также поиск веществ, повышающих чувствительность к антибиотикам белоксинтезирующей системы бактерий. В частности, отмечено, что протамин гидрохлорид снижает резистентность бактерий к хлорамфениколу.

Большое внимание исследователи уделяют изучению возможности подавления бактериальных ферментов, инактивирующих β -лактамы, аминогликозиды, хлорамфеникол. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что наиболее активно угнетают пенициллиназы или элиминируют пенициллиназные плазмиды анионогенные детергенты (сульфанол), 3,6-диаминоакридные (профлавин, акрифлавин) и производные антибиотиков (сульфанид феноксиметилпенициллина, оксациллин, цефалотин, цефалоридин). Кроме того, обнаружены вещества, подавляющие инактивацию хлорамфеникола, – производные трифенилметанового ряда, протамин гидрохлорид, пенициллин.

Несомненно, что проведенные исследования послужат основой для разработки приемлемых методов борьбы с антибиотикорезистентностью. Практически проблема повышения эффективности применения антибиотиков в настоящее время решается в нескольких направлениях:

- ✓ поиск новых природных антибиотиков, эффективных против заболеваний, вызываемых резистентными штаммами микроорганизмов;
- ✓ получение новых лекарственных препаратов с лучшими антимикробными фармакокинетическими параметрами за счет направленной химической трансформации молекул природных антибиотиков;
- ✓ применение сочетаний двух или нескольких антибиотиков с разными механизмами антимикробного действия или антибиотиков с другими лекарственными веществами для того, чтобы затруднить развитие резистентности у возбудителей заболевания и снизить токсичность отдельных компонентов за счет уменьшения дозы каждого из них.

6. Методы определения антимикробной активности антибиотиков

Дискодиффузионный метод является одним из ведущих методов определения антимикробной активности антибиотиков. Данный метод отличается простотой выполнения и экономичностью. Он основан на измерении диаметра зон задержки роста испытуемого микроорганизма вокруг диска, пропитанного раствором антибиотика.

Взвесь изучаемой культуры засевают «газоном». В качестве посевного материала используют суточную бульонную культуру или одну миллиардную микробную взвесь. Засеянные чашки высушивают при комнатной температуре в течение 30–40 мин. Затем на поверхность засеянного агара пинцетом помещают бумажные диски, пропитанные растворами разных антибиотиков. Каждый диск слегка прижимают для того, чтобы они плотно прилегли к поверхности агара. Диски помещают на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 2 см от края чашки. В частности, одну чашку можно использовать для изучения чувствительности одного штамма к 4–5 антибиотикам. Засеянные чашки с нанесенными на них дисками помещают в термостат при температуре 37 °С на 18–24 ч. При этом чашки помещают в термостат вверх дном, чтобы избежать попадания конденсационной воды на поверхность посевов.

Оценка результатов осуществляется по феномену задержки роста вокруг диска с антибиотиком. Диаметр зон задержки роста определяют с помощью линейки, включая диаметр самого диска. Между степенью чувствительности микроорганизма к антибиотикам и величиной зоны отсутствия роста различают следующие соотношения (табл. 2):

Таблица 2

Зависимость степени чувствительности микроорганизма от диаметра зоны задержки роста

Степень чувствительности микроорганизма к антибиотику	Диаметр зоны задержки роста, мм
Чувствительные	Больше 10
Малочувствительные	Меньше 10
Устойчивые	Полное отсутствие

Дискодиффузионный метод также используют для подбора эффективных комбинаций антибактериальных препаратов в лабораторной практике. В этом случае диски, пропитанные растворами антибиотиков, наносят на чашки Петри, предварительно засеянные изучаемой культурой возбудителя, на расстоянии равном или несколько большем, чем сумма радиусов зон подавления его роста. При этом эффект может быть различным: индифферентным (независимым), если после инкубации имеются две независимые зоны подавления роста возбудителя вокруг каждого из дисков, синергидным (потенцированным), аддитивным (суммарным) при слиянии зон подавления роста или антагонистическим, когда зоны подавления роста уменьшаются в части обращенной друг к другу.

Кроме того, применяют диски, пропитанные одновременно двумя лекарственными препаратами. При этом для сравнения зон подавления роста возбудителя одновременно используют диски, содержащие по одному из данных лекарственных препаратов. В случае, если зона вокруг двойного диска больше, то это свидетельствует об аддитивном или синергидном эффекте, а если меньше – об антагонистическом.

Методы последовательных (серийных) разведений антибиотиков в жидкой или плотной питательной среде. Основным достоинством метода серийных разведений является высокая точность, а недостатком – громоздкость. При применении данного метода антибиотик разводят в пробирках с жидкой средой и засевают в них одинаковое количество бактерий. Учет результатов проводят по отсутствию или наличию роста микроорганизмов. Мерой чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам при использовании этого метода служит минимальная подавляющая концентрация (МПК) – наименьшая концентрация антибиотика, подавляющая развитие штамма при стандартных условиях постановки опыта, выражающаяся в абсолютных единицах действия (мкг/мл).

Метод серийных разведений в жидкой среде. В данном случае для постановки опыта необходимо иметь: чистую культуру испытуемого штамма микроорганизма, основной раствор антибиотика, мясопептонный бульон на переваре Хоттингера, содержащий 1,2–1,4 г/л аминного азота.

Для приготовления основного раствора антибиотика используют антибиотики, имеющиеся в продаже с указанием их количества во флаконе. Из этого раствора и должны быть получены требуемые разведения антибиотиков.

Затем получают взвесь культуры микроорганизма, предварительно выращенной на плотной питательной среде, с помощью стерильного изотонического раствора натрия хлорида из расчета: до 10^6 микробных тел в 1 мл. Для получения соответствующего разведения микробной взвеси готовят ряд последовательных десятикратных разведений. С этой целью в 12 стерильных пробирок разливают по 1 мл жидкой среды. В первую пробирку вносят 1 мл основного раствора антибиотика, ее содержимое перемешивают и 1 мл полученного раствора переносят во вторую пробирку, из второй – в третью, из третьей – в чет-

вертую и так до десятой, из которой 1 мл раствора удаляют. При этом первая пробирка будет содержать 16 ЕД, вторая – 8 ЕД и т.д. Для приготовления каждого разведения используют отдельную пипетку. Содержимое одиннадцатой пробирки служит контролем роста микрофлоры, а двенадцатой – контролем стерильности среды. Во все пробирки, кроме двенадцатой, вносят 0,1 мл испытуемой культуры определенной концентрации. Посев инкубируют в термостате в течение 18–24 ч и регистрируют результаты опыта.

Учет результатов проводят при наличии роста в контроле роста культуры и отсутствии роста в контроле стерильности. Затем определяют последнюю пробирку с полной видимой задержкой роста микроорганизмов. Количество антибиотика в этой пробирке соответствует его МПК для испытуемого штамма и определяет степень его чувствительности к данному антибиотику.

Метод серийных разведений на плотной среде. В данном случае готовят двукратные разведения антибиотика. Затем отбирают 1 часть каждого разведения антибиотика и 9 частей агаризованной среды, расплавленной и охлажденной до температуры 42 °С (из расчета 1 мл антибиотика на 9 мл мясопептонного агара), хорошо перемешивают и помещают в чашку Петри.

Консистенцию культуры определяют с помощью оптического стандарта мутности № 10. Испытуемую культуру разводят стерильным изотоническим раствором из расчета: 10^7 микробных тел в 1 мл. Бактериальной петлей наносят изучаемые культуры на поверхность среды с антибиотиком (на одну чашку делают посев 20–25 штаммов). Засеянные чашки помещают в термостат при температуре 37 °С на 16–20 ч. При этом чашка со средой без антибиотика, на которую наносят испытуемые культуры, служит контролем роста.

Учет результатов проводят при наличии роста в контрольной чашке. При этом МПК антибиотика определяют по последней чашке Петри, в которой определяют полную задержку роста испытуемой культуры.

Метод дорожки по Флемингу применяют для определения спектра действия антибиотика. В чашке Петри с мясопептонным агаром стерильным скальпелем вырезают дорожку шириной 1 см и удаляют. Затем в пробирку с растопленным и охлажденным до температуры 42–45 °С мясопептонным агаром вносят определенную концентрацию раствора антибиотика. Содержимое пробирки перемешивают и выливают в дорожку так, чтобы жидкость не выходила за ее пределы. Затем перпендикулярно к дорожке засевают культуры нескольких изучаемых штаммов. Посевы помещают в термостат на 18–24 ч.

Учет результатов: культуры, чувствительные к лекарственному препарату, начинают расти лишь на некотором расстоянии от дорожки, тогда как нечувствительные – растут до самого края.

Критерии чувствительности микроорганизмов к антибиотикам зависят не только от особенностей самих микроорганизмов, но и от концентрации антимикробного препарата в патологическом очаге, его фармакокинетических и фармакодинамических свойств (величины максимальной терапевтической дозы, токсичности и т.п.).

Схема получения гентамицина сульфата

