

Занятие семинарского типа № 2

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Скрининг продуцентов антибиотиков из почвенных микроорганизмов

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

1. Продуценты антибиотиков

Большинство антибиотиков были выделены в ходе систематического скрининга микроорганизмов.

Одним из богатых источников антибиотиков являются организмы, обитающие в почве. В почвенных микроэкосистемах очень развита конкуренция между обитателями, а антибиотики входят в тот природный «арсенал», который необходим для захвата экологической ниши. Образцы почв из разных районов мира постоянно анализируют в поисках новых антибиотиков.

Одним из продуктивных источников антибиотиков является род *Streptomyces*, к которому относятся многие актиномицеты. У них обнаружено и идентифицировано свыше 500 видов антибиотиков.

Основными продуцентами антибиотиков являются актиномицеты, плесневые грибы, бактерии. Некоторые из этих микроорганизмов способны продуцировать большое количество антибиотиков. В частности, 6 родов filamentозных грибов производит около 1000 разных антибиотиков, в том числе пенициллин и цефалоспорин, а 3 рода актиномицетов – 3000 антибиотиков.

При этом способностью вырабатывать антибиотики обладают не все микроорганизмы, а лишь некоторые штаммы отдельных видов.

Существуют определенные количественные или качественные различия между штаммами продуцентов антибиотиков. Например, один штамм обеспечивает максимальный выход антибиотика, когда развивается на поверхности плотной среды и находится в стационарных условиях, а другой – лишь, когда его культура погружена в жидкую среду и постоянно встряхивается.

Некоторые микроорганизмы выделяют не один, а несколько антибиотиков. Так, *Pseudomonas aeruginosa* образует пиоцианазу, пиоцианин, пиолипоевую кислоту и другие пиосоединения, *Bacillus brevis* – грамицидин и тироцидин и т.п.

Один и тот же антибиотик может продуцироваться микроорганизмами разных родов. Так, глиотоксин образуют виды *Gliocladium*, *Trichoderma*, *Aspergillus fumigatus* и др.

Разные микроорганизмы или их штаммы могут вырабатывать разные химические формы одного и того же антибиотика.

В последние годы выделено и описано огромное число антибиотиков, продуцируемых различными микроорганизмами.

К основным продуцентам антибиотиков относятся:

1. Неспорообразующие бактерии. Так, из группы бактерий рода *Pseudomonas aeruginosa*, выделены пиоцианин и пиоцианазу.

2. Спорообразующие бактерии. Многие виды спорообразующих бактерий вырабатывают различные антибиотики. Так, штаммы *Bacillus subtilis* производят бацитрацин, субтилилин и др.; *B. brevis* – тиротрицин, *B. polymixa* – полимиксин (аэроспорин).

3. Актиномицеты. Кроме пенициллина, наиболее важные антибиотики, применяющиеся в качестве химиотерапевтических средств, были получены из актиномицетов. К настоящему времени выделено и описано более 200 таких соединений (стрептомицин, тетрациклины, эритромицин, новобиоцин, неомицин и др.).

4. Грибки являются одним из наиболее важных продуцентов антибиотиков (цефалоспорин, гризеофульвин, микофеноловая кислота, пенициллиновая кислота, глиотоксин, клавацин, аспергилловую кислоту и др.).

5. Водоросли. Многие водоросли способны вырабатывать вещества, обладающие антибиотическими свойствами. Однако, пока ни одно из них не нашло применения в клинической практике.

6. Лишайники. К антибиотикам, вырабатываемым лишайниками, относятся лишенин и усниновая кислота.

7. Высшие растения. Высшие зеленые растения также образуют антибактериальные вещества, сходные по своим свойствам с истинными антибиотиками. К ним относятся фитонциды (аллицин, томатин и др.).

8. Животные. Среди продуктов животного происхождения, обладающих антибактериальными свойствами, важное место занимает лизоцим. Многие простейшие, личинки насекомых и др. могут переваривать живые бактерии и грибки. Однако, до сих пор не ясно, в какой степени данная способность связана с выработкой веществ, обладающих антибиотическими свойствами.

К основным этапам поиска антибиотиков относятся:

- ✓ выделение микроорганизмов-антагонистов из почвы;
- ✓ определение антагонистического спектра и активности антибиотиков;
- ✓ подбор условий культивирования продуцентов антибиотиков;
- ✓ выделение и химическая очистка антибиотиков;
- ✓ изучение физико-химических и фармакологических свойств антибиотиков;
- ✓ испытание химико-терапевтической эффективности;
- ✓ идентификация антибиотиков.

При этом прежде, чем начать поиск продуцентов антибиотиков, а также приступать к выделению микроорганизмов-антагонистов, синтезирующих антибиотики, из мест их естественного обитания, исследователь должен иметь ясную цель. В данном случае необходимо решить три основные задачи:

- ✓ поиск продуцентов уже известных, описанных в литературе и использующихся на практике антибиотиков;
- ✓ поиски новых антибиотиков, способных проявлять биологическое действие по отношению к конкретным организмам;

✓ обнаружение продуцентов антибиотиков, подавляющих в клетке определенную мишень.

В этой связи, при поиске продуцентов известных антибиотиков отсутствует необходимость выделять все организмы и изучать их антибиотическую активность. При этом достаточно выделить микроорганизмы, принадлежащие к определенному виду (или видам). Следует иметь в виду, что некоторые антибиотики, например, относящиеся к β -лактамам (пенициллины, цефалоспорины и др.), могут продуцироваться как плесневыми грибами, так и некоторыми видами стрептомицетов и собственно бактерий. Это подтверждает положение о том, что известные антибиотики образуются вполне определенными видами (или штаммами) микроорганизмов, которые могут принадлежать к разным систематическим группам.

Другой подход необходим для решения второй задачи – поиск продуцентов новых антибиотиков, активных в отношении определенных организмов. В данном случае продуценты антибиотиков следует попытаться выделить из всех групп организмов. Так, при необходимости поиска среди микроорганизмов штамма, подавляющего развитие, например, дрожжеподобного организма *Candida albicans*, в качестве тест-микроорганизма используют *C. albicans* или другой организм, близкий к нему по физиологическим свойствам.

Выделяя микроорганизм-антагонист, активный в отношении определенного возбудителя болезней растений, в качестве тест-организма следует использовать данный фитопатогенный организм. В таких случаях испытывают все выделяемые штаммы микроорганизмов, с тем чтобы не пропустить организм, нужный для решения поставленной задачи. При этом необходимо шире использовать потенциал микроорганизмов. Для этого следует разрабатывать новые методы и иные условия культивирования. Для того, чтобы выделять из природных источников новые виды и роды микроорганизмов.

Кроме того, в сферу поиска новых антибиотиков необходимо активнее включать представителей животного мира. Так, в начале 90-х гг. XX в. из тканей акулы семейства катранов выделен новый антибиотик, который по химическому строению отличается от всех ранее полученных антибиотических соединений. В 1989 г. из полиморфонуклеарных лейкоцитов человека изолированы дефензин-1 и азуроцидин, представляющие собой антибиотики, обладающие широким антимикробным спектром действия. В 1997 г. на коже человека обнаружен антибиотик β -дефензин-2.

Большое значение при поисках новых антибиотиков среди микроорганизмов-антагонистов имеет правильный выбор соответствующего теста. Ю.В. Дудник (1989) отмечает, что, используя в качестве тест-организма штамма *B. icheniformis*, высокочувствительного к антибиотикам β -лактамной структуры, при проверке более миллиона культур микроорганизмов удалось обнаружить новый класс антибиотиков – монобактамы (моноциклические бактериальные р-лактамы).

Значительно острее стоит проблема поиска продуцентов антибиотиков, активных в отношении вирусов и злокачественных новообразований. Если бактерии, грибы или простейшие, являющиеся возбудителями тех или иных заболеваний, могут быть использованы в опытах как тест-организмы при их культивировании на обычных лабораторных средах, то вирусы, как внутриклеточные паразиты, не могут культивироваться на таких средах. Для их развития нужны живые клетки и ткани. Аналогичные проблемы возникают и при поиске противораковых антибиотиков.

Решение третьей задачи, связанной с поиском новых лекарственных препаратов по принципу «мишень – антибиотик», должно базироваться на определении основной (существенной) мишени в бактериальной клетке.

В современных условиях задача поиска продуцентов новых антибиотиков реализуется на новых принципах. Перед исследователями ставится цель получения антибактериального или противогрибного препарата, подавляющего в клетке определенную мишень, конкретный фермент, ответственный за важнейшую функцию метаболизма патогенного микроорганизма. В бактериальной клетке присутствует не менее 3 тыс. ферментов, каждый из которых может быть мишенью для антибиотика. В этой связи, установление важнейших из них является одной из задач, стоящих перед исследователями.

В конечном итоге при реализации данной цели придется выделять новые продуценты из различных групп организмов и изучать воздействие продуктов их жизнедеятельности на соответствующие мишени.

С развитием геномики – науки об определении полного набора генов в клетке (в организме) и установлении биохимической функции каждого гена – появляется возможность изменить тактику поиска новых антибиотиков.

Основной задачей является определение существенных мишеней воздействия антибиотика. В этой связи, решение третьей задачи должно базироваться не на поиске новых антибиотиков, а на определении существенных мишеней клетки, на которые должны оказывать влияние антибиотики. При этом необходимо использовать сведения о геноме клетки патогенного микроорганизма и о функциональной (биохимической) роли каждого гена.

Данные, полученные в американском Институте геномных исследований, свидетельствуют о том, что удаление значительной части генов из клетки относительно несложной бактерии *Mycoplasma genitalium*, имеющей 517 генов, не приводит к ее гибели, даже в том случае, если в ней остается чуть больше половины генов (265). Полученные результаты показывают, что удаление части генов из бактериальной клетки не обязательно может привести ее к гибели. В связи с этим, мишенями для антибиотиков могут быть только те существенные гены (265), обеспечивающие жизненно-важные функции бактериальной клетки.

Данный подход к поиску антибиотиков по принципу «мишень – антибиотик» пока только формируется. Он будет реализовываться в наиболее научно подготовленных коллективах, использующих новейшее оборудование. Его успехи будут координироваться с развитием структурной и функциональной геномики микроорганизмов.

Использование «классических» методов поиска новых антибиотиков с активным применением направленного отбора будет оставаться основным способом их выделения. При этом необходимо шире использовать потенциал новых родов и видов микроорганизмов. Для этого следует:

- ✓ активнее привлекать разнообразные природные источники микроорганизмов, уникальные географические и экологические зоны их обитания;
- ✓ разрабатывать новые методы и нестандартные условия культивирования изолированных микроорганизмов, чтобы активировать «молчащие» гены, участвующие в биосинтезе антибиотиков.

В этой связи, основным при поиске продуцентов антибиотиков является их выделение из природных источников. Вместе с тем, для этих целей широко применяется метод изменения генома выделенного продуцента антибиотика с помощью мутагенеза и генной инженерии.

Для выделения микроорганизмов, синтезирующих антибиотики, отбирают пробы почвы. Определенную навеску почвы, растертую в ступке с небольшим количеством воды, количественно переносят в колбу со стерильной водой. Содержимое колбы встряхивают в течение 5 мин. Затем из водной суспензии готовят ряд последовательных разведений, которые высевают на соответствующую агаризованную среду, в которую в качестве источников углерода добавляют крахмал или глицерин, а в качестве источника азота – нитратные соли. На такой среде рост бактерий подавляется, а грибы развиваются в небольшом количестве. Для того, чтобы они росли лучше, среду необходимо подкислить до значения рН 4–4,5. Кроме того, можно использовать и среду Чапека, агаризованную почвенную вытяжку.

В дальнейшем для получения чистых культур отдельные колонии после инкубации в термостате при оптимальной температуре пересевают в пробирки со скошенным питательным агаром.

Важное значение при выделении микроорганизмов – продуцентов антибиотиков имеет специфика условий их культивирования. Их выделяют из субстратов, где обильно развиваются разнообразные формы микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, дрожжи, мицелиальные грибы), поэтому важно знать и учитывать специфику условий и развития тех организмов, которые необходимо выделить.

Так, большинство сапрофитных бактерий хорошо развивается на богатых по составу натуральных средах (мясопептонный агар, картофельный агар, сусло-агар и др.) при значении рН около 7,0 и температуре в пределах 30–37 °С. Для развития актиномицетов и некоторых грибов эти условия также пригодны, но менее благоприятны, чем для бактерий.

При выделении актиномицетов или грибов следует учитывать и особенности их развития. Актиномицеты растут медленнее, чем бактерии. Они могут использовать источники питательных веществ, которые не очень хорошо усваиваются бактериями.

После того как микроорганизм, обладающий антибиотическими свойствами выделен из субстрата, необходимо определить его принадлежность к определенному виду, установить его таксономическое положение. Для этого используют большой спектр признаков: культуральные свойства, морфологию и организацию клеток, физиологические и биохимические особенности организма, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина в ДНК, ДНК-гибридизацию и т.д.

Определенную помощь при идентификации стрептомицетов – продуцентов антибиотиков, принадлежащих к одной группе, оказывает метод, основанный на специфическом действии микроорганизмов-антагонистов. Эта специфика состоит в том, что продуценты стрептомицина, выделенные в разных районах земного шара, не подавляют развитие друг друга. Такая закономерность характерна и для других видов стрептомицетов. Исходя из этого для идентификации внешне сходных культур стрептомицетов предложено применять метод перекрестного антагонизма, сущность которого состоит в том, что агаровые блочки с одним видом выращенного стрептомицета помещают на поверхность агаровой пластинки, засеянной другим видом стрептомицета. В качестве тест-культуры наряду с другими используют тот же штамм. При этом обнаруживается, что один вид стрептомицета-антагониста может подавлять рост других видов и не подавляет развитие своего вида.

Метод специфики межвидового антагонизма может быть использован при идентификации внешне очень близких видов стрептомицетов и не может оказать помощи при систематике отдаленных видов.

Однако, следует иметь в виду, что при перекрестном антагонизме изучаемый штамм стрептомицета иногда не подавляет рост других известных видов, но может не принадлежать ни к одному из этих видов.

Оценивая все случаи, которые могут иметь место при использовании метода перекрестного антагонизма, следует заметить, что данный метод не помогает решению вопроса идентификации видов, но может оказать помощь при подразделении на виды культур внутри отдельных групп стрептомицетов.

Для идентификации микроорганизмов — продуцентов антибиотиков применяют и другие методы.

Использование организмов, устойчивых к определенному антибиотику. В основу этого метода положены два основных признака, связанных с образованием и действием антибиотиков. Каждый антибиотик вырабатывается одним или несколькими видами микроорганизмов. Микроорганизмы, устойчивые к одному антибиотику, устойчивы и к антибиотическим веществам, близким к нему по химическому строению и биологическим свойствам. Вместе с тем, они могут быть чувствительны к антибиотикам другой химической природы и, следовательно, обладать другим биологическим действием.

Антибиотик, образуемый неизвестным организмом, может быть определен путем испытания его биологического действия на ряд микроорганизмов, чувствительных и устойчивых к известным антибиотикам. Таким путем можно выяснить сходство или различие биологического действия изучаемого

вещества и известных антибиотиков и, тем самым, решить вопрос об их химическом сходстве или различии.

Для исследования данного явления изучаемый микроорганизм высевают на поверхность питательного агара в виде штриха или в виде отдельной макроколонии в центре чашки Петри. Вырабатываемый микроорганизмом антибиотик диффундирует в окружающий агар и создает определенную зону. Пересекая эту зону чувствительными и устойчивыми к определенному антибиотику микроорганизмами, выясняют сходство биологического действия изучаемого лекарственного препарата с известным антибиотиком.

Установив такое сходство, можно предположить, что изучаемое соединение относится к определенной группе антибиотиков и образуется соответствующими организмами. Однако, оценка принадлежности изучаемого организма к тому или иному виду продуцентов может быть лишь ориентировочной. Так, было известно, что β -лактамы вырабатываются плесневыми грибами, но последующие исследования показали, что их образуют некоторые виды стрептомицетов и собственно бактерий.

Метод хроматографии. Для идентификации антибиотиков и их продуцентов применяют метод хроматографии, открытый русским ученым М.С. Цветом в 1903 г. В настоящее время этот метод очень широко используют в лабораторной практике. Этот метод особенно важен при идентификации антибиотиков на ранних стадиях исследования. Иногда метод хроматографии необходимо дополнить результатами методов электрофореза, позволяющими выяснить ионный характер антибиотика.

Метод бумажной хроматографии антибиотиков состоит в том, что на полоски хроматографической бумаги длиной 20–30 см и шириной 1 см наносят испытуемый антибиотик. Подсушенные на воздухе полоски с антибиотиком помещают в хроматографический бак или цилиндр с соответствующим растворителем на 10–20 ч. Время выбирают в зависимости от скорости прохождения растворителя и высоты сосуда для хроматографии.

Для обнаружения антибиотиков на хроматограммах применяют биологические, химические и физические методы.

Наиболее распространенным методом обнаружения антибиотиков на хроматограммах является биоавтографический метод. В данном случае высушенные в вытяжном шкафу полоски бумаги накладывают на агаровую пластинку, засеянную культурой тест-организма, чувствительной к изучаемому антибиотику. Кюветы с полосками бумаги помещают в термостат на 18–20 ч при температуре, оптимальной для роста тест-организма. По зонам отсутствия роста тест-культуры, образующимся вокруг тех мест на хроматограмме, где находится пятно антибиотика, судят об однородности антибиотика, а также сравнивают полученные хроматограммы с хроматограммами известных антибиотиков.

Химические методы обнаружения антибиотиков на хроматограммах основаны на реакциях, в результате которых образуются соединения, выявляемые по соответствующей окраске или обесцвечиванию реактива в месте расположения пятна антибиотика. Физические методы обнаружения антибиоти-

ков включают способы, связанные: с выявлением люминесценции антибиотического пятна при воздействии УФ излучения; с поглощением УФ излучения и с определением радиоактивной метки антибиотика.

Для целей бумажной хроматографии антибиотиков с успехом используют и круговые хроматограммы.

Важное значение при оценке результатов хроматографии имеет положение пятен исследуемых веществ, характеризующееся коэффициентом R_f , который определяется отношением расстояния, которое проходит пятно изучаемого вещества от линии старта за определенное время, к расстоянию, пройденному фронтом растворителя от линии старта. Воспроизводимость значений R_f зависит от постоянства следующих факторов: качества бумаги, температуры, степени чистоты растворителей, состава газов атмосферы, в которую помещена бумага, однотипности процедур и аппаратуры.

Хроматографический спектр представляет собой ломаную линию, характеризующую подвижность антибиотика при хроматографировании с использованием определенного набора систем растворителей. По спектру значений или хроматографическому спектру, можно различать группы химически родственных антибиотиков и до некоторой степени отличать антибиотики внутри групп.

При этом сущность схемы хроматографической идентификации антибиотиков из культур на стадии культуральных жидкостей состоит в следующем. Культуральную жидкость с антибиотическими свойствами фильтруют и измеряют значение рН. Точно взятый объем фильтрата подвергают лиофильной сушке, затем лиофилизат взвешивают и разделяют на две части, одну из которых растворяют в воде, а другую экстрагируют безводным этанолом при встряхивании в течение 1 ч. Растворители берут в количестве, которое позволяет получить 5–10-кратные концентрации по сравнению с исходной культуральной жидкостью. Антибиотическую активность водного раствора и спиртового экстракта определяют методом бумажных дисков.

В случае, если антибиотическая активность спиртового экстракта близка к активности водного раствора лиофилизата, то проводят хроматографирование в соответствующей системе. Хроматограммы проявляют биоавтографически. Одновременно проводят электрофорез в ацетатном и фосфатном буферных растворах.

При этом полученные данные позволяют идентифицировать антибиотик, включить его в группу химически близких веществ или, наконец, идентифицировать его как новый.

Антибиотики, относящиеся к группе макролидов, наиболее детально идентифицируются с помощью нисходящей хроматографии в системах типа Заффарони: бензолформамид и хлороформформамид. В случае, если антибиотик принадлежит к другим группам соединений, то используют групповые системы.

Таким образом, если в результате идентификации выделенного микроорганизма установлено, что он является новым видом, и образуемый им антибиотик, не принадлежит к ранее описанным соединениям, то и организм, и

антибиотик должны быть детально исследованы. С этой целью, прежде всего, изучают условия культивирования микроорганизма, обеспечивающие максимальный биосинтез антибиотика. При подборе сред следует иметь в виду, что чем сложнее среда, тем труднее выделять и очищать антибиотик, поэтому среда для культивирования должна быть, по возможности, простой по составу и обеспечивать максимальный синтез антибиотика.

Выделение антибиотиков и их очистка осуществляются разными способами, выбор которых зависит от их химической природы, характера сопутствующих им продуктов жизнедеятельности организма (органические кислоты, аминокислоты, пигменты и др.), неиспользованных компонентов среды (углеводы, масла, азотсодержащие вещества, неорганические соли и др.), а также от того, где они накапливаются – в культуральной жидкости или в клетках продуцента.

Основная задача первых этапов выделения антибиотика состоит в его концентрировании и очистке от сопутствующих балластных веществ.

К основным методами выделения антибиотиков из нативных растворов (культуральная жидкость, освобожденная от биомассы продуцента) относятся: осаждение антибиотика, экстракция органическими растворителями, сорбционные методы с использованием поверхностно-активных веществ (активированный уголь, активированный оксид алюминия и др.) или ионообменных материалов (ионообменные смолы). При использовании сорбционных методов выделения антибиотиков наиболее проблематичной является десорбция (элюирование) лекарственного препарата. Выделение антибиотика из клеток продуцента осуществляют методом экстракции.

Антибиотик, выделенный одним из указанных способов, представляет собой лишь технически чистый препарат, который не может быть использован в медицинской практике. Дальнейшая его очистка осуществляется путем повторной сорбции, перекристаллизации, растворения антибиотика в органических растворителях или иными методами.

Выделенные штаммы продуценты антибиотиков часто переменчивы и нестабильны, поэтому путем селекции отбирают наиболее перспективные формы, а затем проводят отбор индуцированных мутантов. Выделенные мутантные штаммы культивируют на богатой по составу питательной среде. При этом процесс контролируют по концентрации биомассы или питательных веществ в среде.

В связи с этим, для выделения микроорганизмов, образующих антибиотики, берут пробу почвы, ее высушивают до воздушно-сухого состояния и делают посева на специальные среды.

Выделенные культуры микроорганизмов-антагонистов изучают по содержанию в них антибиотиков. При этом хроматографически определяют наличие известных антибиотиков. В случае, если обнаруживают новый антибиотик, то вначале осуществляют его первичное выделение и очистку, опре-

деляют токсичность и химико-терапевтические свойства на животных, зараженных возбудителями разных заболеваний.

Выделенные штаммы продуцентов антибиотиков часто вариабельны и нестабильны, поэтому с помощью селекции отбирают наиболее перспективные формы, а затем проводят отбор мутантов. Мутанты культивируют на богатой по составу среде. Процесс контролируют по концентрации биомассы или по концентрации питательных веществ в среде.

После получения антибиотика, проверяют их активность в отношении тест-штаммов. При этом существует большое разнообразие методов определения активности антибиотиков. Однако, основным методом, как правило, является микробиологический.

Способность убивать или тормозить развитие микроорганизмов называют биологической активностью лекарственного препарата. При этом различают цидное и статическое действие веществ. При определении активности выделенного антибиотика обычно в качестве эталона используют химически чистый препарат с заранее известной величиной активности. Определение активности антибиотика проводят методом серийных разведений в жидких или плотных средах или методом диффузии антибиотика в агар. Кроме микробиологического метода контроля, применяют химические и физико-химические методы (колориметрический, хроматографический, спектрофотометрический и др.).

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.