

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова

КЛАССИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТСКИЙ УЧЕБНИК



Н.С. Егоров

ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ АНТИБИОТИКАХ

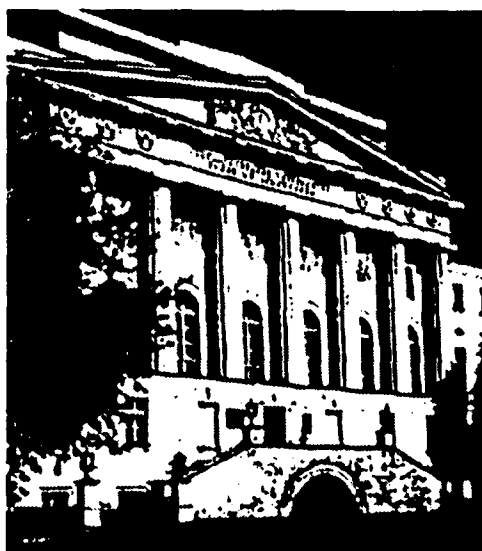
НЕ ДЛЯ ПРОДАЖИ



Серия
**КЛАССИЧЕСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТСКИЙ УЧЕБНИК**

основана в 2002 году по инициативе ректора
МГУ им. М.В. Ломоносова
академика РАН В.А. Садовниченко
и посвящена

**250-летию
Московского университета**



КЛАССИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТСКИЙ УЧЕБНИК

Редакционный совет серии

Председатель совета
ректор Московского университета
В.А. Садовничий

Члены совета:

Виханский О.С., Голиченков А.К., Гусев М.В.,
Добреньков В.И., Донцов А.И.,
Засурский Я.Н., Зинченко Ю.П. (ответственный секретарь),
Камзолов А.И. (ответственный секретарь),
Карпов С.П., Касимов Н.С., Колесов В.П.,
Лободанов А.П., Лунин В.В., Лупанов О.Б., Мейер М.С.,
Мионов В.В. (заместитель председателя),
Михалев А.В., Моисеев Е.И., Пушаровский Д.Ю.,
Раевская О.В., Ремнева М.Л., Розов Н.Х.,
Салецкий А.М. (заместитель председателя),
Сурин А.В., Тер-Минасова С.Г.,
Ткачук В.А., Третьяков Ю.Д., Трухин В.И.,
Трофимов В.Т. (заместитель председателя),
Шоба С.А.



Н.С. Егоров

ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ АНТИБИОТИКАХ

6-е издание, переработанное и дополненное

*Рекомендовано Министерством образования Российской Федерации
в качестве учебника для студентов высших учебных заведений,
обучающихся по направлению 510600 «Биология», специальностям
011600 «Биология», 012300 «Биохимия» 012400 «Микробиология»*



ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА

МОСКВА
2004

ИЗДАТЕЛЬСТВО
"НАУКА"

УДК 577.18
ББК 28.072
Е30

*Печатается
по решению Ученого совета
Московского университета*

Р е ц е н з е н т:

доктор биологических наук, профессор *В.Д. Самуилов*

Егоров Н.С.

Е30

Основы учения об антибиотиках: Учебник. 6-е изд., перераб. и доп. / Н.С. Егоров. – М.: Изд-во МГУ; Наука, 2004. – 528 с. – (Классический университетский учебник).

ISBN 5-211-04669-2

ISBN 5-02-033595-9

В учебнике рассмотрены основные принципы и новые методы выделения продуцентов антибиотиков, условия их биосинтеза и генетического контроля за процессом. Уделено внимание основам промышленного получения этих биологически активных соединений, применению их в медицине, сельском хозяйстве и пищевой промышленности, экологическим аспектам, связанным с получением и использованием антибиотиков.

В 6-м издании (5-е вышло в 1994 г.) приведена новая классификация антибиотических веществ по их химическому строению, расширены и дополнены новыми данными практически все разделы, и особенно те, которые посвящены механизму действия, проблеме резистентности микроорганизмов, модификации антибиотических веществ, рассмотрению группы макролидов и ее новых представителей – азалидов, авермектинов.

Для студентов и аспирантов, обучающихся по специальностям “Микробиология”, “Биотехнология”, “Биохимия”, “Биология”.

**УДК 577.18
ББК 28.072**

ISBN 5-211-04669-2
ISBN 5-02-033595-9

© Издательство Московского университета, 2004
© МГУ им. М.В. Ломоносова, художественное оформление, 2004

ПРЕДИСЛОВИЕ

Уважаемый читатель!

Вы открыли одну из замечательных книг, изданных в серии “Классический университетский учебник”, посвященной 250-летию Московского университета. Серия включает свыше 150 учебников и учебных пособий, рекомендованных к изданию Учеными советами факультетов, редакционным советом серии и издаваемых к юбилею по решению Ученого совета МГУ.

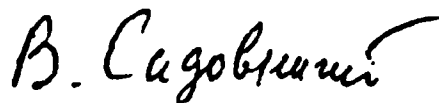
Московский университет всегда славился своими профессорами и преподавателями, воспитавшими не одно поколение студентов, впоследствии внесших заметный вклад в развитие нашей страны, составивших гордость отечественной и мировой науки, культуры и образования.

Высокий уровень образования, которое дает Московский университет, в первую очередь обеспечивается высоким уровнем написанных выдающимися учеными и педагогами учебников и учебных пособий, в которых сочетаются как глубина, так и доступность излагаемого материала. В этих книгах аккумулируется бесценный опыт методики и методологии преподавания, который становится достоянием не только Московского университета, но и других университетов России и всего мира.

Издание серии “Классический университетский учебник” наглядно демонстрирует тот вклад, который вносит Московский университет в классическое университетское образование в нашей стране и, несомненно, служит его развитию.

Решение этой благородной задачи было бы невозможным без активной помощи со стороны издательств, принявших участие в издании книг серии “Классический университетский учебник”. Мы расцениваем это как поддержку ими позиции, которую занимает Московский университет в вопросах науки и образования. Это служит также свидетельством того, что 250-летний юбилей Московского университета — выдающееся событие в жизни всей нашей страны, мирового образовательного сообщества.

Ректор Московского университета
академик РАН, профессор



В.А. Садовничий

Прошло девять лет после выхода пятого издания «Основ учения об антибиотиках» (1994). За этот период интерес к науке об антибиотиках не только не уменьшился, а, наоборот, значительно возрос. Продолжается поиск новых антибиотических веществ с применением традиционных и новых методов, включающих использование клеточной и генной инженерии, приемов, способствующих пробуждению «молчащих» генов, которые ответственны за биосинтез антибиотиков. Выделение новых соединений проводится с учетом решения таких конкретных задач, как подавление в клетках патогенного микроорганизма вполне определенного (заданного) фермента (мишени); получение препаратов, устойчивых к воздействию различных ферментов, оказывающих деструктивное воздействие на эти препараты; выделение антибиотических веществ, способных инактивировать ферменты, разрушающие практически ценные антибиотики; выделение биологически активных соединений, подавляющих развитие резистентных форм микроорганизмов.

Возрастает внимание исследователей к проблеме резистентности микроорганизмов к антибиотикам, которая становится одним из факторов, приводящим к сдерживанию широкого использования антибиотиков в медицинской практике. Соответственно разрабатываются различные подходы к практическому применению этих лекарственных средств, способствующие снижению возникновения устойчивых форм. К их числу можно отнести комбинированную антибиотикотерапию, разумное повышение лечебных доз, сокращение сроков лечения больных одним и тем же антибиотиком, периодическую замену одного препарата другим, применение липосомальных и других форм антибиотиков.

Не уменьшается интерес исследователей и практиков к химической и биологической модификации широко известных и новых антибиотиков, что дает возможность получать наиболее эффективные по сравнению с природными соединения.

Все вышеназванные и другие важнейшие проблемы науки об антибиотиках нашли отражение в предлагаемом читателю учебнике.

В этом издании приведена другая по сравнению с предыдущими классификация антибиотиков по принципу их химического строения, что потребовало некоторого изменения структуры рассматриваемых групп антибиотических веществ.

Многие разделы учебника, и прежде всего посвященные рассмотрению механизма действия, проблемы резистентности микроорганизмов, модификации антимикробных препаратов и некоторых других вопросов, дополнены новыми данными. Значительно расширены сведения о группе макролидов. При этом обращено особое внимание на антибиотики (азалиды, кетолиды, ангидролиды), полученные в результате химической модификации эритромицина, а также на авермектины. Одновременно с этим сокращен менее значимый материал, что позволило сохранить прежний объем учебника.

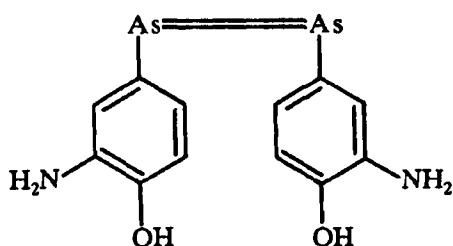
После каждой главы приведен перечень вопросов для самоконтроля.

Учение (наука) об антибиотиках — сравнительно молодая синтетическая ветвь современного естествознания. Прошло немногим более 60 лет с того времени, когда впервые в 1940 г. был получен в кристаллическом виде замечательный химиотерапевтический препарат микробного происхождения — пенициллин, открывший эру антибиотиков.

Многие ученые мечтали о создании таких препаратов, которые могли бы использоваться при лечении различных заболеваний человека и были бы способны убивать патогенные бактерии, не оказывая вредного действия на организм больного.

Еще в XVI в. известный немецкий или, как некоторые считают, швейцарский врач и естествоиспытатель Парацельс* наряду с изучением терапевтического действия различных веществ пытался применять мышьяк в борьбе с сифилисом. Однако его опыты не имели успеха, и дальнейшее испытание этого вещества было надолго приостановлено.

Спустя примерно 380 лет немецкий врач, бактериолог и биохимик, один из основоположников иммунологии и химиотерапии Пауль Эрлих (1854–1915) в результате многочисленных и кропотливых опытов в 1909 г. синтезировал мышьяковистый препарат, убивающий *in vitro* возбудителя сифилиса и в 1910 г. предложил использовать его для лечения этой болезни. Эрлих назвал препарат *сальварсаном* и установил его химическую структуру:

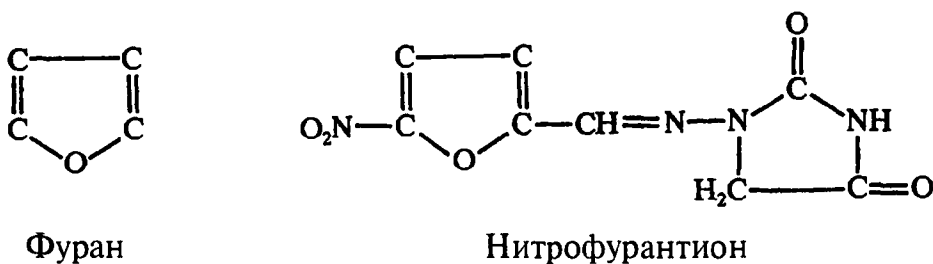


Однако в 1949 г. советский химик М. Крафт показал, что арсеносоединения не содержат и не могут содержать связи As=As.

* Парацельс (т.е. «равный Цельсу») — прозвище Филиппа фон Гогенгейма (1493–1541), сравнивавшегося по способностям врачевания с древнеримским ученым и писателем Авлом Цельсом (I в. до н. э.).

Открытие сульфаниламидных препаратов и применение их в медицинской практике составили известную эпоху в химиотерапии многих инфекционных заболеваний, в том числе сепсиса, менингита, пневмонии, рожистого воспаления, гонореи и некоторых других.

В 1944 г. Додд и Штильман сообщили об антибактериальной активности нитрофуранов, которые были давно известны. Эти авторы изучили более 40 производных фурана и показали, что среди них наиболее интересен с точки зрения используемых в медицине свойств (лечение мочепроводящих путей) нитрофурантион:



Очень важную роль для медицины играют различные биологически активные вещества, полученные биосинтетическим путем, т.е. соединения, образующиеся в процессе жизнедеятельности разнообразных организмов.

Еще в 1870 г. врач и бактериолог Д. Сандерсон обратил внимание на то, что в среде, содержащей плесень (пенициллиум), не развиваются бактерии. Несмотря на то что он дал неправильное толкование наблюдаемому явлению, это сообщение Д. Сандерсона стимулировало Д. Листера провести в 1871 и 1872 гг. серию опытов, в которых он убедительно доказал способность плесневого гриба *Penicillium glaucum* подавлять рост бактерий. Д. Листер даже пытался использовать свои наблюдения в клинической практике.

В 1871 г. русский терапевт и общественный деятель В.А. Манассеин (1841–1901), а в 1872 г. один из основоположников отечественной дерматологии А.Г. Полотебнов (1838–1908) показали, что грибы из рода *Penicillium* способны задерживать в условиях *in vivo* развитие возбудителей ряда кожных заболеваний человека. Спустя три года английский биолог Т. Хексли также наблюдал антибактериальный эффект пенициллиума.

В 1877 г. Л. Пастер и С. Джебарт сообщили, что аэробные бактерии подавляют рост *Bacillus anthracis*. И.И. Мечников (1845–1916), получивший в 1908 г. совместно с П. Эрлихом Нобелевскую премию за исследования по фагоцитозу, в 1894 г. обратил внимание на возможность использования некоторых сапрофитных бактерий в борьбе с патогенными микроорганизмами.

В 1896 г. Б. Гоцио из культуральной жидкости *Penicillium brevicompactum* выделил кристаллическое соединение — микофеноловую кислоту, подавляющую рост бактерий сибирской язвы.

Р. Эммерих и О. Лоу в 1899 г. сообщили об антибиотическом веществе, образуемом *Pseudomonas pyocyanea* (*P. aeruginosa*), и назвали его пиоцианазой; препарат, состоящий из смеси антибиотиков, использовался в качестве лечебного фактора как местный антисептик.

В 1910–1913 гг. О. Блэк и У. Альсберг выделили из гриба рода *Penicillium* пеницилловую кислоту, обладающую антимикробными свойствами.

К сожалению, эти и некоторые другие наблюдения и открытия в то время не получили дальнейшего развития, однако они оказали огромное положительное влияние на более поздние исследования в области изучения биологически активных продуктов жизнедеятельности организмов.

В 1929 г. А. Флемингом был открыт новый препарат пенициллин, который только в 1940 г. удалось выделить в кристаллическом виде. Это новое и весьма эффективное химиотерапевтическое вещество получено в результате жизнедеятельности плесневого гриба, т.е. биосинтетическим путем.

С получением пенициллина как препарата (1940) возникло новое направление в науке — учение об антибиотиках, которое необычайно быстро начало развиваться во всем мире.

Предложение американца П. Криаза (1939) считать началом науки об антибиотиках не 1940, а 1939 г. (открытие Р. Дюбо тиротрицина) не получило поддержки научной общественности.

Открытие пенициллина — огромная победа биологической, медицинской и химической наук, а также технологии и инженерной мысли, что особенно наглядно проявилось в годы Второй мировой войны. Применение пенициллина при лечении раненых на фронтах Второй мировой войны спасло многие тысячи жизней. С неменьшим успехом пенициллин и, прежде всего, его производные применяются в медицинской практике и в настоящее время.

Применение пенициллина в борьбе с различными инфекционными заболеваниями и воспалительными процессами явилось мощным стимулом для поиска новых, еще более эффективных антибиотических веществ, образуемых различными группами организмов: бактериями, дрожжами, водорослями, плесневыми грибами, высшими грибами, высшими растениями и животными.

Настойчивые поиски продуцентов новых антибиотиков увенчались блестящими успехами. Так, если проследить за динамикой роста числа описываемых в литературе антибиотиков, то можно заметить следующую закономерность. В 1896 г. Б. Гоziо выделил микофеноловую кислоту, в 1899 г. Р. Эммерих и О. Лоу — пиоцианазу. В 1937 г. М. Вельш открыл первый антибиотик стрептомицетного

происхождения — актиномицетин, в 1939 г. Н. А. Красильниковым и А.И. Кореняко был получен мицетин и Р. Дюбо — тиро-трицин. Таким образом, к моменту выделения пенициллина в очищенном виде (1940) было известно пять антибиотических веществ; в последующем число антибиотиков росло очень быстрыми темпами (табл. 1).

Таблица 1

Общее число антибиотиков, образуемых микроорганизмами и высшими формами жизни
(по Berdy, 1980)

Годы	Антибиотики, образуемые микроорганизмами					Антибиотики, образуемые высшими формами жизни	Общее число
	стрептомицетами	редкими формами	бактериями	грибами	всего		
До 1940	2		2	1	5	1	6
1945	10	2	25	51	88	105	193
1950	72	10	94	140	316	218	534
1955	325	22	137	223	707	356	1063
1960	760	40	181	294	1275	465	1740
1965	1177	75	223	423	1898	627	2525
1970	1745	136	328	680	2889	990	3879
1975	2361	250	518	970	4099	1438	5537
1978	2769	396	567	1151	4973	1795	6768

По данным Ю.В. Дудника (1989), только за период 1981–1985 гг. было открыто свыше 2000 новых антибиотиков микробного происхождения. Суммируя данные Дж. Берди и Ю.В. Дудника и полагая, что за 1978–1981 гг. было описано также около 1000 антибиотиков, получим, что к 1986 г. было известно почти 8000 антибиотиков, образуемых лишь микроорганизмами.

Если предположить, что в последние 15 лет открытие новых антибиотиков происходило с той же скоростью, что и в 1981–1985 гг. (т.е. примерно по 400 наименований в год), то окажется, что за 1985–2000 гг. открыто около 6000 новых препаратов. Таким образом, можно с некоторой долей уверенности считать, что к настоящему времени описано около 14 000 антибиотиков, образуемых лишь микроорганизмами. Кроме этого числа, не менее 1800 антибиотических веществ продуцируется высшими растениями и животными. Следовательно, общее число известных антибиотиков к 2000 г. составило приблизительно 15,8 тыс. наименований. Из названного числа антибиотиков только более 200 природных соединений используется в медицинской практике: при лечении

воспалительных процессов (пневмония, перитонит, фурункулез), различных форм туберкулеза, при борьбе со многими инфекционными заболеваниями, считавшимися ранее неизлечимыми или трудноизлечимыми, и т.д. Применение этих соединений привело к резкому снижению смертности при таких заболеваниях, как крупозное воспаление легких, сепсис, различные формы менингита и др. Большинство же антибиотиков не находит применения в медицинской практике из-за их токсичности, инактивации в организме больного или других причин.

Работы по изысканию новых антибиотических веществ, эффективных при лечении бактериальных, вирусных и раковых заболеваний, системных микозов, протозойных и паразитарных болезней, антибиотиков, обладающих иммуностимулирующими и иммуносупрессорными свойствами, активно продолжаются. Так, если в 70-х гг. ежегодно описывалось более 300 новых антибиотиков, то в 80-х гг. — более 400. При этом наблюдается тенденция к увеличению выделения новых антибиотиков из грибов.

Открытие и изучение свойств нового антибиотика, применяемого в медицинской или сельскохозяйственной практике, — это огромный труд ученых различных направлений (микробиологов, биохимиков, генетиков, химиков, технологов, фармакологов, врачей и др.). По подсчетам, проведенным в начале 60-х гг., над открытием лишь одного антибиотика широкого спектра 55 ученых непрерывно работали 2,5 года; было обследовано более 100 тыс. образцов почвы, израсходовано на это более 4 млн долларов. Итальянской фармацевтической компании «Лепетит» для производства нового противотуберкулезного антибиотика потребовалось 11 лет научно-исследовательских работ, которые обошлись в несколько миллионов долларов.

В настоящее время для полной разработки нового антибиотического препарата (от поиска продуцента до получения готового антибиотика) требуются затраты от 300 до 500 млн американских долларов.

Каковы же основные причины столь быстрого роста числа антибиотиков? Среди них можно назвать следующие.

1. Многие антибиотические вещества или продукты их модификации — незаменимые лечебные препараты, широко применяемые при инфекционных заболеваниях, которые ранее считались неизлечимыми или сопровождались высоким летальным исходом. К их числу следует отнести некоторые формы туберкулеза, чуму, азиатскую холеру, брюшной тиф, бруцеллез, пневмонию, различные септические процессы.

Среди других лекарственных препаратов, применяемых в медицинской практике, антибиотики составляют более 30%.

2. В последние годы заметно изменилась этиологическая структура инфекционных заболеваний. Возросло число видов бактерий, вызывающих инфекционные заболевания, и в настоящее время достигает около 3000 наименований (Навашин, 1989). Вместе с тем широкое распространение получили инфекции, вызываемые грамотрицательными палочковидными бактериями, оттеснив стафилококковые заболевания. Однако хорошо известно, что грамотрицательные бактерии в большей степени устойчивы к антибиотикам, чем грамположительные формы, и число антибиотиков, активных в отношении грамотрицательных микроорганизмов, ниже, чем в отношении грамположительных. В связи с этим требуется увеличение числа новых антибиотиков наряду с ростом выпуска известных препаратов.

3. Антибиотики — вещества, необходимые в сельском хозяйстве, прежде всего как лечебные препараты в животноводстве, птицеводстве, пчеловодстве и растениеводстве, а отдельные антибиотические вещества — и как стимуляторы роста животных.

4. При широком применении антибиотиков в качестве лечебных препаратов происходит быстрое накопление форм микроорганизмов, резистентных к этим соединениям. Проблема резистентности микроорганизмов ставит задачу замены одних антибиотиков другими, т.е. поиска новых, более эффективных антибиотических веществ.

5. Некоторые антибиотики с успехом применяются в пищевой и консервной промышленности в качестве консервантов скоропортящихся продуктов (свежей рыбы, мяса, сыра, различных овощей).

6. В результате химической модификации природных антибиотиков получены десятки тысяч полусинтетических препаратов, многие из которых представляют большой практический интерес. Это также стимулирует поиск новых антибиотиков с иной химической структурой.

7. Антибиотики как специфические ингибиторы определенных реакций широко применяются в научных исследованиях в качестве веществ, используемых при изучении отдельных сторон метаболизма организмов, расшифровке тонких молекулярных механизмов биосинтеза белка, механизма функционирования мембран и других биохимических превращений.

Некоторые антибиотики используют в качестве ингибиторов ферментов, инактивирующих практически ценные антибиотические препараты, а также антибиотиков-иммуномодуляторов.

8. Изучение путей образования антибиотиков способствует глубокому проникновению в механизм синтетической деятельности продуцентов этих биологически активных соединений, раскрытию основных этапов их метаболизма.

9. В заинтересованности поиска новых антибиотиков существенную роль играет и экономический фактор. Производство антибиотиков — весьма прибыльная отрасль биологической промышленности.

Таким образом, все эти факторы способствовали и продолжают способствовать тому, что к проблеме антибиотиков привлечено внимание огромных групп ученых различных направлений: микробиологов, микологов, биохимиков, химиков, генетиков, цитологов, фармацевтов, врачей, технологов и т.д. Изучение антибиотиков — типичный пример комплексного подхода к проблеме, что само по себе обусловило прогресс в исследовании этих биологически активных соединений.

Большой вклад в развитие науки об антибиотиках и их промышленное получение внесли советские ученые, и в первую очередь З.В. Ермольева, Г.Ф. Гаузе, Н.А. Красильников, В.Н. Шапошников, Х.Х. Планельес, А.С. Хохлов, А.Б. Силаев, В.А. Шорин, С.М. Навашин и многие другие.

Впервые курс «Антибиотики» по инициативе академика В.Н. Шапошникова был прочитан для студентов IV курса кафедры микробиологии МГУ в 1946/47 учебном году Г.Ф. Гаузе. С 1953 г. чтение этого курса поручено кандидату (ныне доктору) биологических наук Н.С. Егорову.

АНТАГОНИЗМ В МИРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ И ОБРАЗОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

Первая часть книги посвящена рассмотрению общих вопросов, связанных с образованием антибиотиков микроорганизмами. Образование антибиотиков — это проявление одной из форм антагонизма между видами микроорганизмов, т.е. свойство, возникшее в процессе их эволюции. К настоящему времени описано около 16 тыс. антибиотических веществ, синтезируемых различными группами организмов. Естественно поэтому, что вопросам классификации этих биологически активных природных соединений уделено определенное внимание. Рассмотрены условия культивирования микроорганизмов, обеспечивающие образование антибиотических веществ. Среди этих условий основное внимание уделено влиянию состава сред, физическим и физико-химическим факторам, вопросам совместного культивирования микроорганизмов.

Антибиотики вырабатываются на определенном этапе развития продуцента — во вторую фазу. Эти биологически активные вещества оказывают заметное влияние на собственные продуценты, выступая иногда в качестве регуляторов ферментативных реакций.

Выделение продуцентов антибиотических веществ из природных источников, методы определения их биологической активности и идентификация образуемых антибиотиков — важнейшие этапы их исследования. Этим и некоторым другим вопросам посвящена первая часть учебника.

Глава 1

АНТАГОНИЗМ В МИРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

Среди разнообразных форм взаимоотношений микроорганизмов, находящихся в естественных местах обитания, для нас представляют интерес лишь антагонистические взаимоотношения,

которые характеризуются тем, что один вид микробов так или иначе подавляет развитие или задерживает рост других микроорганизмов. На антагонистические свойства бактерий и плесневых грибов еще в XIX в. обращали внимание многие исследователи как у нас в стране, так и за рубежом. Однако эти наблюдения носили разрозненный, случайный характер и не могли быть обобщены в целостную систему учения об антагонизме, так как это явление в тот период не имело практического применения. Позднее отдельные факты микробного антагонизма обобщил И.И. Мечников. Он наметил пути использования этого явления на практике. Положение И.И. Мечникова о преждевременной старости человека в связи с постоянной интоксикацией организма продуктами жизнедеятельности гнилостных бактерий кишечника и использование им молочнокислых палочек простокваши для вытеснения этих гнилостных бактерий заложили научные основы современного учения об антагонизме микроорганизмов.

Антагонизм широко распространен среди различных групп микроорганизмов. Его можно обнаружить у бактерий, грибов, водорослей и других групп. В зависимости от наследственных особенностей, а также различных экологических факторов и условий культивирования микроорганизмы могут проявлять антагонистические свойства по отношению к другим организмам. Это явление широко распространено в природе.

Причины, вызывающие антагонизм, самые разнообразные, и для оценки факторов, связанных с антагонизмом микроорганизмов, их следует объединить в определенные группы. Если использовать главным критерий антагонизма — причину, вызывающую проявление антагонистических свойств организма, то все известные к настоящему времени формы микробного антагонизма можно объединить в две основные группы: «*пассивный*» и «*активный*».

Сущность «пассивного» антагонизма состоит в том, что угнетение роста одного вида микроорганизмов другим может происходить только при определенных, иногда крайне ограниченных условиях развития этих организмов. Такие условия обычно наблюдаются при лабораторном культивировании микроорганизмов. В обычных естественных условиях роста подобного проявления антагонизма, как правило, не бывает.

При «активном» антагонизме угнетение роста или полное подавление жизнедеятельности одного вида микроба другим происходит в результате обогащения окружающей среды продуктами обмена, выделяемыми организмами при развитии. Однако при определенных концентрациях этих продуктов метаболизма организмы, их продуцирующие, могут развиваться свободно.

«Пассивный» антагонизм. К этой группе следует отнести:

- 1) антагонизм, складывающийся при совместном развитии разных видов, нуждающихся в одних и тех же питательных веществах;
- 2) насильственный антагонизм.

1. Антагонизм, обусловленный использованием разными организмами, совместно развивающимися, одних и тех же питательных веществ. При этом преимущественное положение в развитии будет у того микроорганизма, скорость роста которого выше скорости роста других организмов, его окружающих. Так, при одновременном высеве бактерий и актиномицетов на субстрат, вещества которого в равной степени необходимы для развития того и другого организма, и при условии, что эти вещества находятся в ограниченном количестве, бактерии, как организмы с более высоким темпом роста, овладевают субстратом быстрее и не дают возможности развиваться актиномицетам. Подобное явление можно наблюдать при одновременном высеве на МПА *E. coli* или *Pseudomonas fluorescens* и некоторых видов актиномицетов. Однако угнетение роста актиномицета может иметь место лишь в том случае, если он не способен выделять специфические продукты жизнедеятельности, подавляющие развитие бактерий.

2. Насильственный антагонизм. Ассистент И.И. Мечникова И.Г. Шиллер еще в 1914 г. обратил внимание на то, что при совместном посеве в бульон ацидофильной палочки и стрептококка последний полностью погибает примерно через 18 ч культивирования (превращается в аморфную массу). Изучение этого явления показало, что ацидофильная палочка выделяет бактерицидные вещества, лизирующие стрептококки, причем только в их присутствии.

И.Г. Шиллеру (1952) удалось вызвать антагонизм у организмов, обладающих протеолитической активностью (*Bacillus mesentericus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*) по отношению к бактериям, не имеющим этих ферментов. Например, если поместить *B. subtilis* или *B. mesentericus* одновременно со стрептококком на водный агар или просто в воду, то при этом произойдет размножение бацилл с выделением специфических бактериолизин и растворение стрептококка. Шиллер получил эти лизины* в концентрированном виде путем упаривания при 37 °С культуральной жидкости, в которой развивается *B. mesentericus*. При добавлении бактериального лизина, предварительно разбавленного водой, к свежим клеткам стрептококков, находящимся в полноценной питательной среде, происходит лизис стрептококков.

* Под лизинами Шиллер подразумевал литические формы.

Итак, если бактериям, которые в естественных условиях не проявляют никаких признаков антагонизма, создать условия недостатка в среде питательных веществ (азотных или углеродных), то одна из бактерий, обладающая протеолитическими ферментами, в качестве питательного материала может использовать клетки других бактерий, не имеющих этих ферментов. В этом состоит основное свойство насильственного антагонизма.

И.Г. Шиллер показал, что при насильственном антагонизме живые клетки в качестве питательного материала потребляются тем же способом, каким бактерии используют нерастворимые белковые вещества, т.е. путем выделения в окружающую среду протеолитических ферментов. Количество лизинов, по его мнению, зависит от количества клеток, подлежащих литическому действию.

Весьма вероятно, что лизины, получающиеся при насильственном антагонизме, являются теми продуктами жизнедеятельности бактериальной клетки, которые, нарушая обмен и вызывая гибель бактерий другого вида, растворяют их. По функции убивать живые клетки микроорганизмов другого вида эти лизины являются антибиотическими веществами, а по функции растворять предварительно убитую специфическим веществом обмена и превращенную таким образом в субстрат клетку они выступают как адаптивные протеолитические энзимы.

Явление насильственного антагонизма наблюдали Г.А. Надсон и А.Я. Жолкевич (1922) при совместном выращивании гриба *Spiraria purpurogenes* и дрожжей. При таком культивировании дрожжи погибают в результате образования антагонистом пигмента, обладающего литическими свойствами.

«Активный» антагонизм. В эту группу следует включить взаимоотношения, обусловленные:

1) образованием микробами органических кислот, спиртов или других продуктов обмена в результате использования отдельных компонентов субстрата;

2) выработкой и выделением в окружающую среду антибиотических веществ.

К активному антагонизму следует отнести явления паразитизма и хищничества.

1. Антагонизм, связанный с образованием органических кислот, спиртов или других продуктов обмена в результате использования отдельных компонентов среды. У ряда микроорганизмов способность образовывать те или иные продукты жизнедеятельности в процессе эволюционного развития сопровождается параллельной адаптацией их к относительно высоким концентрациям этих веществ. В результате различные по свойствам и химической природе

продукты, образуемые в процессе жизнедеятельности микроорганизмов, служат им орудием в борьбе за существование, подавляя или тормозя рост конкурентных организмов.

Многие микроорганизмы (бактерии, плесневые грибы и др.) в процессе развития образуют из углеродсодержащих компонентов субстрата органические кислоты, которые резко изменяют активную кислотность среды и тем самым препятствуют развитию организмов других видов. Такое явление может наблюдаться, например, в процессе смены микрофлоры свежего молока. В свежесвыдоенном коровьем молоке содержатся как молочнокислые, так и гнилостные бактерии. При этом соотношение их при хранении молока меняется, по данным А.Ф. Войткевич (1940), в определенной последовательности: вначале в молоке все бактериальные группы развиваются как бы независимо одна от другой, причем группа гнилостных бактерий преобладает над остальными микроорганизмами. Затем в результате размножения лактобактерий накапливается молочная кислота и среда (в данном случае молоко) значительно подкисляется. В этих условиях наблюдается угнетение развития гнилостных бактерий, а затем их полная гибель. Преобладающее место в молоке начинают занимать лактобациллы и лактококки.

Отношение различных видов молочнокислых бактерий к подкислению субстрата также неодинаково. В первый период развития молочнокислых бактерий, когда значение рН молока еще не очень низкое, сильно размножаются лактококки. Достигнув максимального развития, лактококки подавляются лактобациллами, приспособленными к более высоким концентрациям молочной кислоты и, следовательно, к более низкому рН субстрата.

Образование лимонной кислоты грибами, как отмечал в 1923 г. В.Н. Шапошников, имеет двоякое значение. С одной стороны, оно представляет собой специфическое приспособление к созданию среды, наиболее благоприятной для развития гриба, с другой — резкий сдвиг рН субстрата в кислую зону является средством устранения конкурентной микрофлоры, главным образом бактериальной, в большинстве случаев неспособной развиваться в кислой среде.

Приведенные примеры показывают, что образование бактериями и плесневыми грибами органических кислот обеспечивает этим организмам преимущественные условия в острой конкурентной борьбе с другими микробами.

Борьба с конкурентной микрофлорой может также осуществляться путем резкого подщелачивания среды. Некоторые виды бактерий благодаря специфическому использованию отдельных компонентов субстрата так подщелачивают среду, в которой они

размножаются, что она становится неблагоприятной для развития других видов микробов.

Например, при развитии уробактерий на мясопептонном агаре (МПА), содержащем от 1 до 5% мочевины, происходит деминерализация последней. При этом выделяется аммиак в таком количестве, которого достаточно для того, чтобы затормозить развитие других микроорганизмов. Отсутствие роста других микробов объясняется тем, что выделенный аммиак сильно (до рН 9,3) подщелачивает субстрат. Уробактерии в этих условиях растут хорошо. При совместном культивировании уробактерий с *Sarcina aurantica* или *E. coli* на МПА или даже в почве сарцины и кишечная палочка полностью отмирают.

Таким образом, как при лабораторном культивировании, так и в естественных условиях развития уробактерий в присутствии мочевины среда значительно подщелачивается в результате образования аммиака. Это приводит к подавлению некоторых видов окружающей микрофлоры и вместе с тем не оказывает отрицательного влияния на развитие самих уробактерий.

Иногда наряду с кислыми продуктами обмена некоторые микроорганизмы (ацетонэтиловые, ацетонобутиловые бактерии, дрожжи и др.) образуют нейтральные продукты обмена, например спирты, которые также могут тормозить развитие некоторых видов микробов.

Итак, значительное снижение активной кислотности (рН) среды в результате образования органических кислот, или резкое подщелачивание субстрата при потреблении мочевины и других веществ, или, наконец, образование нейтральных продуктов обмена приводит к подавлению роста некоторых видов микроорганизмов и в определенных границах не препятствует развитию тех организмов, которые образуют эти вещества.

2. Антагонизм, обусловленный образованием антибиотических веществ. Наиболее существенной и наиболее яркой формой антагонизма, широко распространенной в мире микроорганизмов, является образование специфических продуктов обмена, угнетающих или полностью подавляющих развитие других видов. Такие вещества получили название **антибиотиков**.

Явление антагонизма в мире микроорганизмов может быть широко использовано в практике здравоохранения и сельского хозяйства. Живые микробы-антагонисты находят применение в медицинской практике для борьбы с дисбактериозами и кандидомикозами, возникающими иногда при применении антибиотиков широкого спектра действия, для терапии и профилактики различных инфекционных заболеваний.

Нормальная микрофлора человека оказывает существенное влияние на процессы борьбы с патогенной микрофлорой, повышая

защитные реакции организма против инфекционных кишечных заболеваний и дисбактериозов.

В связи с поддержанием необходимой нормальной микрофлоры в полости рта и кишечнике человека введено понятие «пробиотик». Под этим понятием имеют в виду препараты, содержащие живые клетки микроорганизмов, или их структурные компоненты и продукты их жизнедеятельности, или комплекс того и другого, стимулирующие рост нормальной микрофлоры либо оказывающие иммуностимулирующее воздействие. Последнее имеет большое значение, так как, по мнению ряда ученых, в ближайшие десятилетия будет возрастать число больных с ослабленным иммунным статусом.

Применение биопрепаратов из живых клеток бактерий оказывает положительное влияние при лечении острых кишечных инфекций и дисбактериозов.

В нашей стране наиболее популярными и изученными пробиотиками являются препараты, изготовленные на основе бифидобактерий и лактобактерий (бифидумбактерин, лактобактерин, бифилонг, ацилакт), и в меньшей степени препараты, полученные на основе других микроорганизмов (бифакол, колибактерин).

Экспериментальные результаты изучения физиологического состояния молочнокислых бактерий (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*), используемых в качестве пробиотиков, показали, что, попадая в кишечный тракт, эти бактерии сохраняют свою метаболическую активность на протяжении всего транзита в кишечнике, поддерживают новый синтез белка, что позволяет им адаптироваться в окружающей среде (Corthier et al., 2001).

Развитие молочнокислых бактерий может приводить к образованию молочной кислоты и, следовательно, понижать рН в кишечнике.

Все эти факторы (рост бактерий, подкисление окружающей среды) способствуют ингибированию токсинообразующих бактерий, снижению нагрузки генотоксичных агентов в кишечнике и, таким образом, могут инактивировать карциногенные факторы в толстой кишке (Pool-Zobel, 2001).

Антагонизм между микроорганизмами привлекает внимание ученых и практиков сельского хозяйства для использования его в борьбе с фитопатогенными организмами, причиняющими немалый вред сельскохозяйственному производству.

Вопросы для самоконтроля

1. Определите формы микробного антагонизма.
2. Каковы объективные причины поиска и изучения новых антибиотиков?
3. Дайте определение понятия «пробиотик».

ПОНЯТИЕ ОБ АНТИБИОТИКАХ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

Что такое антибиотики

После открытия в 1940 г. ценного лекарственного препарата пенициллина в науку и в повседневную жизнь людей прочно вошло понятие «антибиотик», или «антибиотическое вещество». Впервые термин «антибиотик» ввел в 1942 г. З. Ваксман. Несмотря на несовершенство этого термина («антибиотик» в переводе означает «против жизни»), в настоящее время его невозможно оппорить или заменить другим.

Вместе с тем за сравнительно небольшую историю существования понятия «антибиотик» оно трактовалось разными авторами по-разному. Так, З. Ваксман в 40-х и 60-х гг. писал, что антибиотики — это химические вещества, образуемые микроорганизмами, обладающие способностью подавлять рост или даже разрушать бактерии и другие микроорганизмы. Анализируя это определение понятия «антибиотик», можно заметить, что, с одной стороны, оно не показывает различий между антибиотическими веществами и другими продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, которые также обладают антимикробными свойствами, но не относятся к антибиотикам. Никто, например, не относит к антибиотикам молочную и лимонную кислоты, образуемые в процессе жизнедеятельности соответственно лактобактериями и *Aspergillus niger* и подавляющие развитие других микроорганизмов. К числу антибиотических веществ не может быть отнесен также аммиак, выделяемый уробактериями при развитии их на мочеви-не и препятствующий росту ряда других бактерий.

С другой стороны, вышеприведенное определение понятия «антибиотики» включает в число продуцентов этих веществ только микроорганизмы, хотя хорошо известно, что к антибиотическим веществам относятся продукты жизнедеятельности высших растений (аллицин, выделенный из чеснока; берберин — из люти-ковых и барбарисовых растений; госсипол — из семян хлопчат-ника мохнатого, и др.) и животных (экмолин, полученный из рыб; эритрин — из эритроцитов крови, печени и плаценты; сква-ламин — из акулы катран, и другие вещества). Таким образом, определение понятия «антибиотик», данное З. Ваксманом, не

удовлетворяет современному представлению об этих биологически активных веществах.

М.М. Шемякин, А.С. Хохлов и др. (1961) дают следующее определение понятия «антибиотик»: «Антибиотическими веществами (антибиотиками) следует называть все продукты обмена любых организмов, способные избирательно подавлять или убивать микроорганизмы (бактерии, грибы, вирусы и др.)». Приведенное определение отличается от определения, данного З. Ваксманом, тем, что здесь указаны «продукты обмена любых организмов». Это, конечно, большое отличие. Однако по другим позициям оно совпадает с ваксмановским определением.

Близкое к этому определение понятия «антибиотик» было сделано З.В. Ермольевой в 1968 г.: «Антибиотики — вещества природного происхождения, обладающие выраженной биологической активностью. Они могут быть получены из микробов, растений, животных тканей и синтетическим путем».

Другие авторы дают слишком расширенное толкование этого понятия, рассматривая антибиотик как частный случай выделения фитонцидов в растительном мире или включая в число антибиотиков вещества, синтезируемые химическим путем и обладающие антимикробными свойствами. Таких соединений синтезируется очень много, однако причислять их к антибиотикам совершенно неправильно.

В конце 70-х — начале 80-х гг. XX столетия были открыты и внедрены в медицинскую практику фторхинолоны, синтезированные химическим методом и обладающие широким спектром антибактериального действия. Фторхинолоны представляют собой фторсодержащие производные хинолонкарбоновых кислот. Эту группу соединений, играющих большую роль в медицинской практике, а также недавно полученный новый класс оксазолидинонов, активных в отношении грамположительных и анаэробных бактерий, некоторые авторы причисляют к антибиотикам, с чем решительно нельзя согласиться.

К антибактериальным веществам относят и сульфаниламиды, нитрофураны, различные антисептики (препараты, используемые для уничтожения микроорганизмов в (на) живых тканях), дезинфицирующие вещества, применяемые для подавления микроорганизмов вне живого организма (обработка инструментов, оборудования и др.). Однако имеется принципиальное различие между антибиотиками, подавляющими развитие бактерий, и другими вышеназванными антибактериальными соединениями. Оно состоит в том, что первые — это специфические продукты биосинтеза организмов, а вторые образуются в результате химического

синтеза. Поэтому относить последние к антибиотикам также нелогично и неверно.

Третьи авторы значительно сужают это понятие, относя к антибиотикам лишь химиотерапевтические вещества, полученные из микроорганизмов или иных природных источников, а также их синтетические аналоги и производные, способные избирательно подавлять *в организме больного* (выделено нами. — Н.Е.) возбудителей заболеваний и (или) задерживать развитие злокачественных новообразований.

Следуя этому определению, к антибиотикам можно отнести лишь около 200 соединений. С таким представлением об антибиотиках тоже нельзя согласиться.

Итак, что же такое антибиотики? Мы предлагаем следующее определение. *Антибиотики — специфические продукты жизнедеятельности или их модификации, обладающие высокой физиологической активностью по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, водорослям, протозоа) или к злокачественным опухолям, избирательно задерживающие их рост либо полностью подавляющие развитие.* По сравнению с некоторыми другими продуктами жизнедеятельности специфичность антибиотиков характеризуется тремя основными признаками.

Во-первых, антибиотики в отличие от органических кислот, спиртов и им подобных соединений, способных также подавлять рост микроорганизмов, обладают высокой биологической активностью в отношении чувствительных к ним организмов. Это означает, что антибиотические вещества даже в очень низких концентрациях проявляют высокий физиологический эффект. Например, пенициллин в концентрации 0,000001 г/мл оказывает четко выраженное бактерицидное действие по отношению к чувствительным к нему бактериям.

Во-вторых, характерная особенность антибиотических веществ — избирательность их действия. Это означает, что каждый антибиотик проявляет свое биологическое действие лишь по отношению к отдельным, вполне определенным организмам или группам организмов, не оказывая при этом заметного эффекта на другие формы живых существ. Так, бензилпенициллин задерживает развитие представителей только некоторых грамположительных бактерий (кокков, стрептококков и др.) и не оказывает действия на грамотрицательные бактерии, грибы или другие группы организмов. Он практически нетоксичен для человека и животных.

В-третьих, некоторые антибиотики наряду с антибактериальными свойствами могут проявлять иммуномодуляторное действие

или выступать в качестве ингибиторов ферментов, инактивирующих практически значимые антибиотические вещества.

Антибиотические вещества в процессе развития их продуцентов могут выделяться в окружающую организм среду и накапливаться в ней, могут образовываться и накапливаться внутри клеток организма и освобождаться от них в результате экстракции или при разрушении клеток.

В соответствии с нашим определением понятия «антибиотик» к этим веществам относятся также химические или биологические модификации молекул природных соединений антибиотиков, полученные путем замены в них тех или иных свободных группировок (радикалов). В результате химической модификации молекул пенициллина, цефалоспорины, тетрациклина и многих других природных антибиотиков получено большое число новых соединений с более ценными свойствами.

Образование антибиотиков — это наследственно закрепленная особенность метаболизма организмов. Так, продуцент новобиоцина *Streptomyces spheroides* может синтезировать новобиоцин или (и) биологически неактивные его аналоги (изоновобиоцин и дескарбамилновобиоцин) и ничего другого, какие бы условия для развития стрептомицета ни создавались. *Brevi bacillus* может образовывать грамицидин и некоторые другие полипептидные антибиотики, но ни при каких условиях не будет синтезировать пенициллин, актиномицин или другой антибиотик.

Некоторые авторы рассматривают антибиотики как микробные метаболиты, вторичные метаболиты. Если под метаболитами понимать все продукты обмена веществ (метаболизма), то, конечно, и антибиотики можно считать метаболитами. Исходя из подобного представления, метаболитами будут и органические кислоты, и аминокислоты, и белки, и жиры, и полисахариды. Одним словом, при таком подходе метаболитами можно назвать все вещества, создаваемые организмом. Но эти вещества нельзя признать метаболитами, если придерживаться общепринятого в науке понимания данного термина.

Что же такое метаболиты? М е т а б о л и т ы — это естественно возникающие при разнообразных химических реакциях промежуточные продукты обмена веществ клетки организма (аминокислоты, жирные кислоты, витамины, пурины, пиримидины и др.), которые постоянно вовлекаются в реакции метаболизма, участвуя в синтезе белков, нуклеиновых кислот, антибиотиков и других соединений, или превращаются в иные необходимые для организма продукты.

Следует отметить, что в цепи превращений веществ или в процессе их синтеза не существует ни «первичных», ни «вторичных»

метаболитов. Ни в одной из относительно полных схем метаболических циклов, например циклов превращения углеводов, нельзя найти какой-либо антибиотик, образование которого связано с углеводным или иным обменом в качестве участника цикла.

Наряду с метаболитами существуют вещества, обладающие антиметаболитными свойствами (антиметаболиты), препятствующие вовлечению метаболитов в нормальный обмен клетки. Антибиотики — конечные продукты обмена и поэтому никак не могут быть метаболитами. Скорее, наоборот, многие антибиотики — это своеобразные антиметаболиты.

Определение «вторичный метаболизм» ввел в 1965 г. английский биохимик Бу Лук. Позднее сам автор понял искусственность предложенного им термина. Он, по свидетельству Дорена (1986), разъяснял, что феномен вторичного метаболизма представляет собой в основном регуляторную проблему. Когда мы поймем природу регуляторного механизма, то термин «вторичный метаболизм» больше не понадобится, поскольку будет известно, что имеется в виду. Несмотря на это, термин «вторичный метаболизм» в научной литературе продолжает активно эксплуатироваться.

Итак, антибиотики — не промежуточные продукты обмена веществ организмов (метаболиты), а конечные продукты обмена, накапливающиеся внутри клетки или выделяющиеся в окружающую среду.

Образование антибиотических веществ микроорганизмами — лишь одна из форм микробного антагонизма. Этот важный биологический процесс — не случайное явление, наблюдаемое только при лабораторном культивировании организмов. Биосинтез антибиотических веществ — специфическая особенность вида или даже штамма микроорганизмов, возникшая в результате их эволюционного развития как одна из приспособительных особенностей.

О том, что антибиотики — не случайные продукты обмена для их продуцентов, свидетельствует и тот факт, что эти мощные биологически активные соединения не убивают и не подавляют рост собственных продуцентов в тех концентрациях, в которых они образуются. Даже в промышленных условиях развитие продуцента с образованием больших количеств антибиотика заметно не подавляет жизнедеятельность собственного продуцента. Это обусловлено тем, что в ходе эволюции наряду с возникновением процесса образования антибиотика организмы, их продуцирующие, выработали и соответствующие механизмы защиты от действия собственных антибиотиков (см. с. 103). Такие приспособления появились в процессе эволюции и у других организмов, которые эти антибиотики не образуют.

С общебиологической точки зрения биосинтез антибиотиков принципиально не отличается от образования других конечных продуктов обмена, таких, как жиры, белки, пептиды, полисахариды и тому подобные вещества. Они также синтезируются из небольших структур, возникающих в процессе метаболизма организмов (органических кислот, аминокислот и др.), и не могут образовываться из крупных фрагментов биомолекул. Однако пути биосинтеза антибиотиков, продуцируемых микроорганизмами, могут отличаться от путей образования других конечных продуктов метаболизма.

Известно, например, что антибиотические вещества, как правило, не являются прямыми и главными продуктами метаболизма углеводов, а также продуктами непосредственного восстановления или окисления веществ, в значительном количестве накапливающихся в период первой фазы развития, как это наблюдается у многих организмов, способных к брожению. В ряде случаев антибиотики могут быть продуктами побочных звеньев сложнейшей цепи обмена углеродных, азотных и фосфорных соединений.

Биосинтез антибиотиков в процессе метаболизма организмов контролируется соответствующими генами.

Несмотря на то что антибиотики образуются в малых количествах по сравнению с такими продуктами жизнедеятельности, как органические кислоты или спирты, они являются наиболее физиологически активными продуктами метаболизма. Все эти особенности антибиотиков позволяют выделить их в самостоятельную группу соединений.

Единицы биологической активности антибиотиков

Величины биологической активности антибиотиков (противобактериальной, антифунгальной и др.) обычно выражают в условных единицах, содержащихся в 1 мл раствора (ед./мл) или в 1 мг препарата (ед./мг). За единицу антибиотической активности принимают минимальное количество антибиотика, способное подавить развитие или задержать рост определенного числа клеток стандартного штамма тест-микроба в единице объема питательной среды.

За единицу антибиотической активности бензилпенициллина принято минимальное количество препарата, способное задерживать рост золотистого стафилококка (штамм 209) в 50 мл питательного бульона. Для стрептомицина единица активности будет иной: минимальное количество антибиотика, задерживающее рост *E. coli* в 1 мл питательного бульона.

После того как многие антибиотики были получены в химически чистом виде, появилась возможность для ряда из них выразить условные единицы биологической активности в единицах массы. Установлено, например, что 1 мг чистого основания стрептомицина эквивалентен 1000 ед. биологической активности. Следовательно, 1 ед. активности стрептомицина эквивалентна 1 мкг чистого основания данного антибиотика. В связи с этим в настоящее время в большинстве случаев количество стрептомицина выражают в мкг/мг или в мкг/мл. Чем ближе число мкг/мг в препаратах стрептомицина к 1000, тем, следовательно, чище данный препарат, т.е. меньше содержит балластных веществ.

У таких антибиотиков, как карбомицин, эритромицин, новобиоцин, нистатин, трихотецин и некоторые другие, 1 ед. активности эквивалентна или приблизительно эквивалентна 1 мкг вещества. Однако у ряда антибиотиков единица биологической активности значительно отличается от 1 мкг вещества (табл. 2). Например, 1 мг чистого основания неомицина содержит 300 ед. активности, поэтому 1 ед. активности данного антибиотика эквивалентна 3,3 мкг. Для бензилпенициллина (пенициллин G) 1 ед. активности эквивалентна примерно 0,59 мкг, так как 1 мг антибиотика содержит 1667 ед. (оксфордских). Для фумагиллина за единицу фагоцидного действия принято брать 0,1 мкг чистого вещества. 1 ед. бацитрацина эквивалентна 20 мкг вещества.

Таблица 2

Соотношение единиц биологического действия
и единиц массы некоторых антибиотиков

Антибиотик-стандарт	Ед./мг	Единица массы
Альбომицин (стандарт)	700 000	нет
Бацитрацин	52	»
Эритромицин (основание)	1000	1 мкг основания
Хлортетрациклин (хлоргидрат)	1000	1 мкг чистого хлоргидрата
Карбомицин (основание)	1000	1 мкг основания
Окситетрациклин (дигидрат)	925	1 мкг чистой безводной амфотерной формы
Пенициллин (натриевая соль)	1667	0,587 мкг чистой кристаллической натриевой соли
Оксациллин	1000	1 мкг оксациллина-кислоты
Метициллин	1000	1 мкг метициллина-кислоты
Ампициллин	1000	1 мкг ампициллина-кислоты
Полимиксин В (сульфат)	7200	0,1 мкг сульфата полимиксина
Саркомицин	12	0,1 мкг саркомицина
Тетрациклин (тригидрат)	890	1 мкг чистой безводной амфотерной формы
Стрептомицин (сульфат)	800	1 мкг чистого основания
Новобиоцин	1000	1 мкг новобиоцина

Антибиотическая продуктивность организмов

При изучении условий образования антибиотиков и исследовании влияния различных факторов среды на биосинтез антибиотиков важным критерием оценки их активности служит характеристика антибиотической продуктивности организма.

Иногда изменение одного или нескольких факторов среды приводит к значительному повышению процесса биосинтеза антибиотика, но существенно не влияет на увеличение биомассы организма. В других случаях, наоборот, при изменении условий культивирования резко увеличивается накопление биомассы организма, не сопровождающееся заметным повышением выхода антибиотика. Наконец, наблюдаются случаи, когда увеличение выхода антибиотика связано с увеличением количества образовавшейся биомассы. Поэтому для определения фактора, повышающего биосинтез антибиотика в культуре, необходимо в ходе развития организма выяснить его антибиотическую продуктивность.

Антибиотической продуктивностью организма называется количество антибиотика (в мкг или единицах), образованное 1 мг сухих клеток (или мицелия) изучаемого организма за определенный промежуток времени (1 ч). Антибиотическая продуктивность организма выражается в мкг/(мг·ч) или в ед./(мг·ч).

Продуктивность (мкг/(мг·ч)) организмов нетрудно определить по формуле

$$\frac{A_{t_2} - A_{t_1}}{M_{t_1} + M_{t_2} / 2 (t_2 - t_1)},$$

где A_{t_1} и A_{t_2} — количество антибиотика, определенное ко времени t_1 и t_2 , мкг/мл или ед./мл; M_{t_1} и M_{t_2} — количество биомассы, образовавшейся в результате развития организма ко времени t_1 и t_2 , мг; t_1 и t_2 — время взятия проб, ч.

В табл. 3 приведены данные по накоплению биомассы и антибиотика одним штаммом стрептомицета.

Пользуясь приведенной формулой, получаем антибиотическую продуктивность мицелия *S. rimosus* в условиях данного опыта:

Время, ч	0–16	16–20	20–24	24–28	28–32
Продуктивность, мкг/(мг·ч)	0	0,3	1,3	5,6	6,3
Время, ч	32–36	36–48	48–72	72–96	96–120
Продуктивность, мкг/(мг·ч)	6,2	6,3	4,2	1,25	1,1

Сравнивая три характеристики (накопление биомассы, биосинтез антибиотика и продуктивность мицелия стрептомицета), можно сделать вывод о том, на какой стадии развития стрептомицет обладает максимальной биосинтетической активностью (образование антибиотика).

Образование окситетрациклина в процессе развития стрептомицета
Streptomyces rimosus ЛС-Т-118 на синтетической среде
 (по Зайцевой, 1959)

Показатель	Образование антибиотика биомассой						
	0	4	8	12	16	20	24
Время развития стрептомицета, ч							
Масса мицелия, мг%	50	53	52	139	262	369	374
Антибиотик, мкг/мл	30	32	31	30	32	32	53
Время развития стрептомицета, ч	28	32	36	48	72	96	120
Масса мицелия, мг%	402	552	590	620	757	760	741
Антибиотик, мкг/мл	140	260	430	750	1480	1700	1890

Классификация антибиотиков

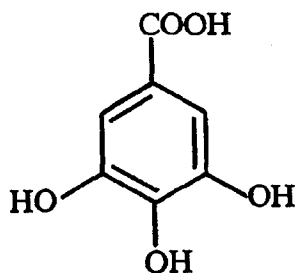
Большое число (порядка 16 тыс.) описанных в литературе разнообразных по свойствам и химическому строению антибиотиков требует определенной и хорошо продуманной их классификации.

Сложилось несколько подходов к классификации антибиотиков, причем они определяются главным образом профессиональными интересами ученых. Так, для биологов, изучающих организмы — продуценты антибиотических веществ, условия образования этих соединений и другие интересующие их проблемы, наиболее приемлема классификация антибиотиков по принципу их биологического происхождения. Для специалистов, изучающих механизм физиологического действия антибиотиков, наиболее удобен принцип классификации антибиотических веществ по их биологическому действию. Для химиков, детально исследующих строение молекул антибиотиков и разрабатывающих пути их синтеза и химической модификации, приемлема классификация, основанная на химическом строении антибиотиков. Практические работники здравоохранения (врачи) предпочитают классифицировать антибиотики по принципу спектра их биологического действия.

Оценивая приведенные принципы классификации, в каждом из них можно найти и положительные стороны, и недостатки. Например, с точки зрения химиков классификация антибиотиков по биологическому происхождению имеет недочеты, связанные с тем, что иногда близкие по строению и биологическому действию вещества могут продуцироваться организмами, принадлежащими

к разным группам. Так, антибиотик цитринин образуется некоторыми видами пенициллов и аспергиллов. Кроме того, он найден в австралийском растении *Crotolaria crispata*.

Галловая кислота обнаружена у многих высших растений, а также образуется грибом *Phycomyces*. Она имеет следующее строение:



Нередко организмы, принадлежащие к одной группе (например, актиномицеты), вырабатывают самые разнообразные по химическому строению антибиотики.

Таким образом, при классификации антибиотиков по признаку их биологического происхождения, с одной стороны, близкие или даже идентичные вещества могут быть отнесены к разным группам, с другой — совершенно не сходные по химическому строению и биологическому действию соединения должны объединяться в одну группу веществ. Все это, безусловно, затрудняет их рассмотрение с точки зрения химического строения и биологического действия.

С позиции биологов классификация антибиотиков по признаку химического строения также имеет недостатки: в одну группу антибиотиков, отнесенных к одному классу химических соединений, входят вещества, образуемые разными группами организмов.

Среди основных принципов классификации антибиотиков рассмотрим следующие.

I. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО БИОЛОГИЧЕСКОМУ ПРОИСХОЖДЕНИЮ

1. Антибиотики, вырабатываемые микроорганизмами, относящимися к эубактериям.

1) Образуемые представителями рода *Pseudomonas*:
пиоцианин — *Ps. aeruginosa*,
вискозин — *Ps. viscosa*.

2) Образуемые представителями родов *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Proteus*, *Lactobacillus*:
стрептококцин А — *Streptococcus pyogenes*,
эпидермин — *Staphylococcus epidermidis*,

- низин — *Lactococcus lactis*,
продигиозин — *Chromobacterium prodigiosum* (*Serratia marcescens*),
колиформин — *E. coli*,
колицин — *E. coli*,
протаптины — *P. vulgaris*,
лактоцин-S — *Lactobacillus sake*.
- 3) Образуемые бактериями родов *Brevi* и *Bacillus*:
граммицидины — *Brevi bacillus*,
субтилин — *Bacillus subtilis*,
полимиксины — *B. polymyxa*.
- 4) Образуемые микроорганизмами, принадлежащими к порядку *Actinomycetales*:
- а) образуемые представителями рода *Streptomyces*:
стрептомицин — *S. griseus*,
канамицин — *S. kanamyceticus*,
тетрациклины — *S. aureofaciens*, *S. rimosus*,
новобиоцин — *S. spheroides*,
актиномицины — *S. antibioticus*,
цефамицины — *S. lipmani*, *S. clavuligerus*,
карбапенемы — *S. cattleya*, *S. olivaceus*,
клавулановая кислота — *S. clavuligerus* и др.;
- б) вырабатываемые микроорганизмами рода *Saccharopolyspora*:
эритромицин — *Saccharopolyspora erythrae* и др.;
- в) образуемые представителями рода *Nocardia*:
рифамицины — *N. mediterranei*,
ристомицин — *N. fructiferi*,
нокардицины — *N. sp.*;
- г) образуемые родом *Actinomadura*:
карминомицин — *A. catminata* и др.;
- д) продуцируемые родом *Micromonospora*:
фортимицины — *M. olivoasterospora*,
гентамицины — *M. purpurea*,
сизомицин — *M. inyoensis*,
розамицин — *M. rosaria*.
- 5) Образуемые цианобактериями:
малинголид — *Lyngbya majuscula*.
2. Антибиотики, образуемые несовершенными грибами:
пенициллины — *Penicillium chrysogenum*,
цефалоспорины — *Acremonium chrysogenum*,
гризеофульвин — *P. griseofulvum*,
трихоцетин — *Trichotecium roseum*,
фузидиевая кислота — *Fusarium coccineum*,
циклоспорины — *Beauveria nivea*, *Trichoderma polyspora*.

3. Антибиотики, образуемые грибами, относящимися к классам базидиомицетов и аскомицетов:

термофиллин — *Lenzites thermophila* (базидиомицет),

лензитин — *Lenzites sepiaria*,

хетомин — *Chaetomium cochloides* (аскомицет).

4. Антибиотики, образуемые лишайниками, водорослями и низшими растениями:

усниновая кислота (бинан) — *Usnea florida* (лишайник),

хлореллин — *Chlorella vulgaris* (водоросль).

5. Антибиотики, образуемые высшими растениями:

аллицин — *Allium sativum*,

госсипол — *Gossypium hisutum*,

фитоалексины: пизатин — *Pisum sativum* (горох),

фазеолин — *Phaseolus vulgaris* (фасоль).

6. Антибиотики животного происхождения:

дефензины, скваламин, экмоллин, круцин (*Schizotrypanum cruzi*), интерферон.

II. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО МЕХАНИЗМУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

1. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки (пенициллины, цефалоспорины, бацитрацин, ванкомицин, D-циклосерин).

2. Антибиотики, нарушающие функции мембран (альбомицин, аскозин, грамицидины, кандицидины, нистатин, трихомицин, эндомицин и др.).

3. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот:

1) РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин, оливомидин и др.);

2) ДНК (актидион, брунеомицин, митомицины, новобиоцин, саркомицин, эдеин и др.).

4. Антибиотики — ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, декоинин, саркомицин и др.).

5. Антибиотики, подавляющие синтез белка (бацитрицин, виомицин, аминогликозиды, метимицин, эритромицин, тетрациклины, хлорамфеникол и др.).

6. Антибиотики — ингибиторы дыхания (антимидины, олигомицины, патулин, пиоцианин, усниновая кислота и др.).

7. Антибиотики — ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины, колицины, олигомицин, тироцидин и др.).

8. Антибиотики, обладающие антиметаболитными свойствами (пуромицин, хадацидин, D-циклосерин, ацидомицин и др.).

9. Антибиотики-иммуномодуляторы (циклоспорины, актиномицины С и D, оливомин, брунеомицин, рубомицин, спергуалин и др.).

III. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО СПЕКТРУ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Условно все важнейшие в практическом отношении антибиотики можно разделить на несколько групп.

1. Противобактериальные антибиотики узкого спектра действия, активные преимущественно в отношении грамположительных организмов.

Группа пенициллина и цефалоспорины.

Биосинтетические пенициллины: бензилпенициллин и его соли (калиевая, натриевая, новокаиновая), бициллин, феноксиметилпенициллин.

Полусинтетические пенициллины.

Кислотоустойчивые, неактивные в отношении бета-лактамазообразующих стафилококков: пропициллин, фенетициллин.

Кислотоустойчивые, активные в отношении бета-лактамазообразующих стафилококков: оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин.

Полусинтетические цефалоспорины: цефалоридин, цефалотин, цефалоглицин, цефалексин.

Бацитрацин.

Ванкомицин, ристомицин.

Линкомицин.

Новобиоцин.

Макролиды: эритромицин, олеандомицин, карбомицин, спирамицин, лейкомицин, тилозин.

Фузидин.

2. Противобактериальные антибиотики широкого спектра действия.

Тетрациклины биосинтетические: хлортетрациклин, окситетрациклин, тетрациклин, деметилхлортетрациклин, деметилтетрациклин.

Полусинтетические тетрациклины: метациклин, доксициклин, моноциклин.

Хлорамфеникол (левомицетин).

Аминогликозиды: стрептомицин, неомицины, канамицин, гентамицин, фортимицины, тобрамицин.

Полимиксины, колистин.

Грамицидин С.

Полусинтетические пенициллины: ампициллин, карбенициллин.

3. Противотуберкулезные антибиотики.

Стрептомицин, канамицин, виомицин, циклосерин.

4. Противогрибные антибиотики.
Нистатин.
Гризеофульвин.
Амфотерицин В.
Леворин.
Кандицин.
Трихотецин.
5. Противоопухолевые антибиотики.
Актиномицин С.
Митомицин С.
Оливомицин.
Брунеомицин.
Реумицин.
Адриамицин (доксорубицин).
Дауномицин, рубомицины.
6. Противоамебные и противомаларийные антибиотики.
Фумагиллин.
Радицикол.

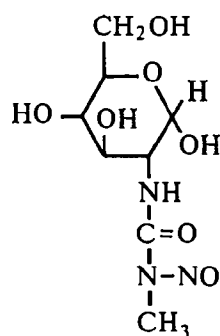
IV. КЛАССИФИКАЦИЯ АНТИБИОТИКОВ ПО ИХ ХИМИЧЕСКОМУ СТРОЕНИЮ

В основу этой классификации положена классификация антибиотиков, предложенная Берди (1974). По указанной системе известные антибиотики подразделяются на следующие основные семейства.

1. Углеводные антибиотики.

Большинство антибиотиков названного семейства продуцируются стрептомицетами. Семейство включает следующие подсемейства.

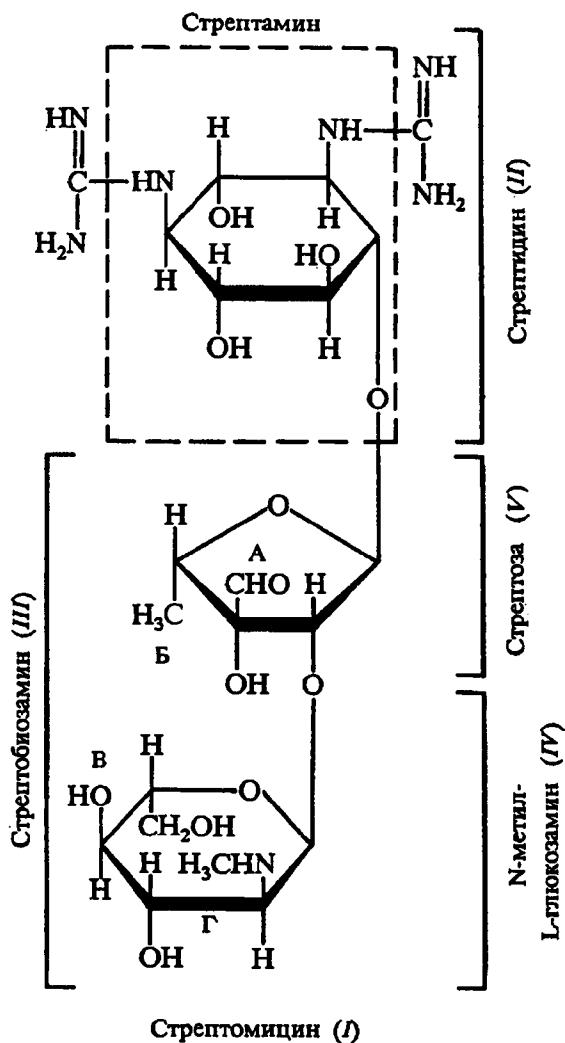
1) Чистые сахара. В качестве примера можно назвать стрептозотоцин:



2) Аминогликозиды, или аминоциклитолы. Это подсемейство антибиотиков образуется стрептомицетами, и многие из них широко используются в медицинской практике. К этим антибиотикам относятся соединения, содержащие гликозидные связи.

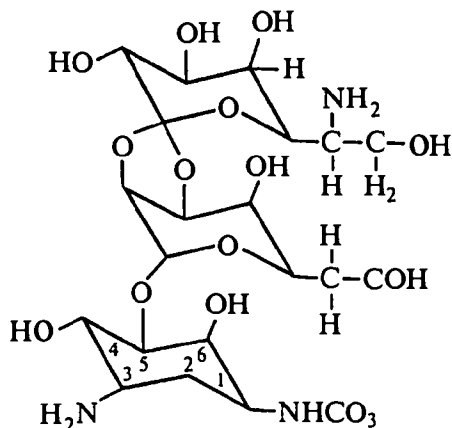
По химическому строению аминогликозиды можно разделить на четыре группы.

а) Антибиотики, родственные стрептомицину. Сюда включаются стрептомицин, дигидрострептомицин, маннозидострептомицин и др.:



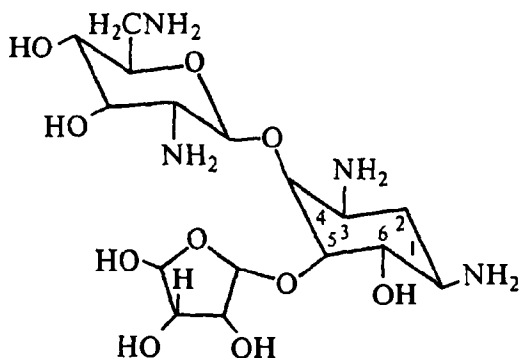
- А: CHO → CH₂OH в дигидрострептомицине
- Б: CH₃ → CH₂OH в гидроксистрептомицине
- В: Н → манноза в маннозидострептомицине
- Г: CH₃ → Н в N-деметилстрептомицине

б) Монозамещенные дезоксистрептаминовые антибиотики, представителем которых является гигромицин В, имеющий следующее строение:

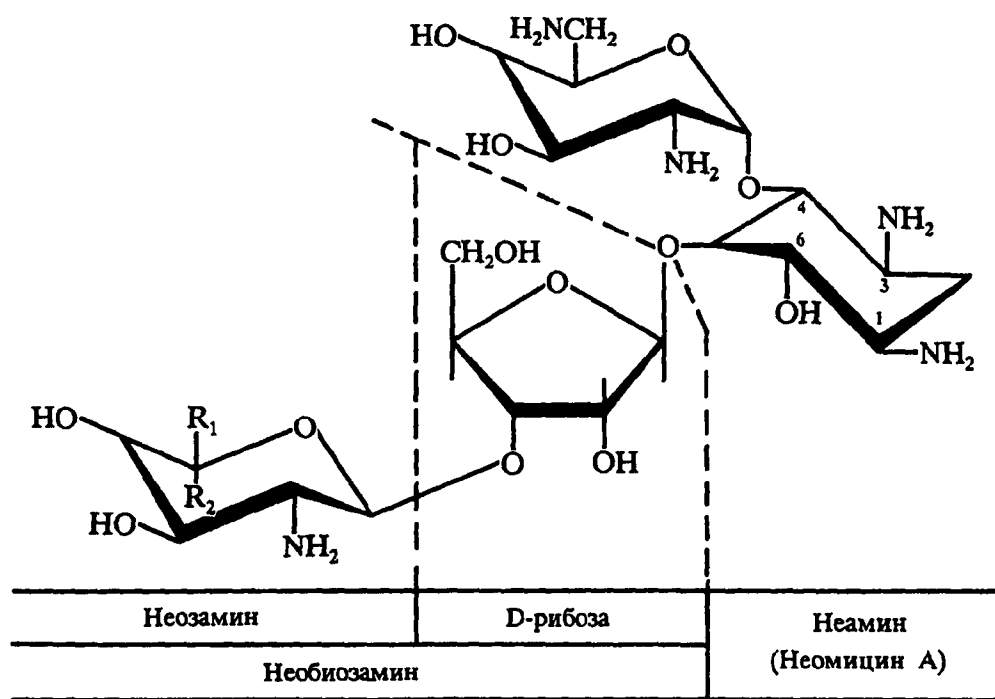


В эту группу входят также дестомицины А, В и С;

- в) 4,5-Дизамещенные дезоксистрептаминовые антибиотики. Эта группа аминогликозидов может быть подразделена на две подгруппы. В первую входят рибостамицин, ксилостазин и бутирозин. Примером их структуры может служить строение рибостамицина:



Во вторую подгруппу входят неомицины и паромомицины. В частности, неомицины имеют следующее строение:

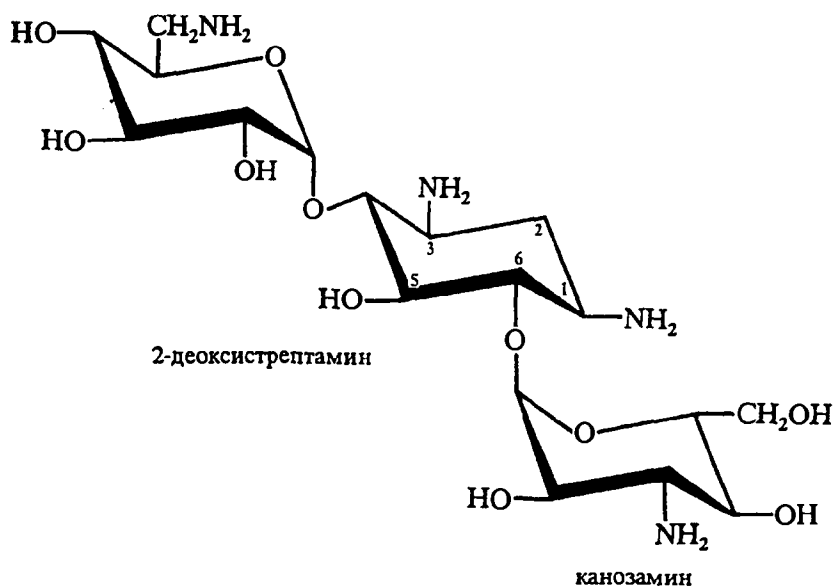


Неомицин В: R₁ = H; R₂ = CH₂NH₂

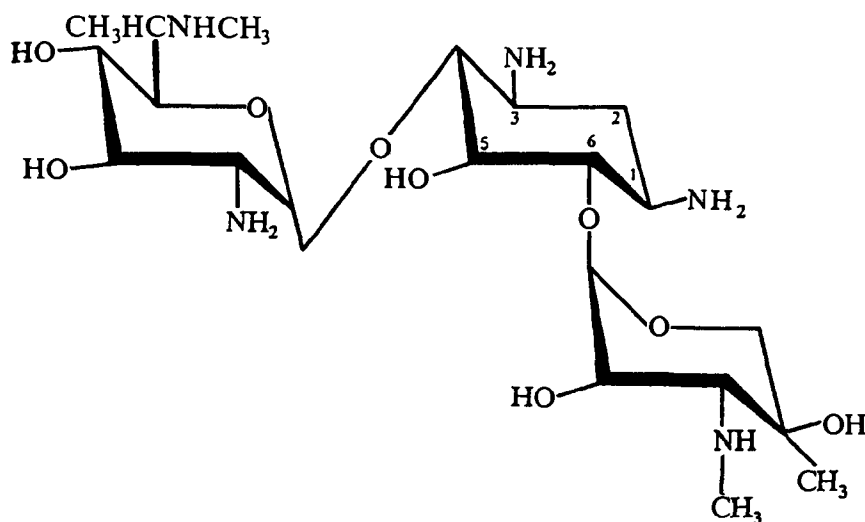
Неомицин С: R₁ = CH₂NH₂; R₂ = H

- г) 4-6-Дизамещенные дезоксистрептаминовые антибиотики. Представители этой группы могут быть разделены на подгруппы.

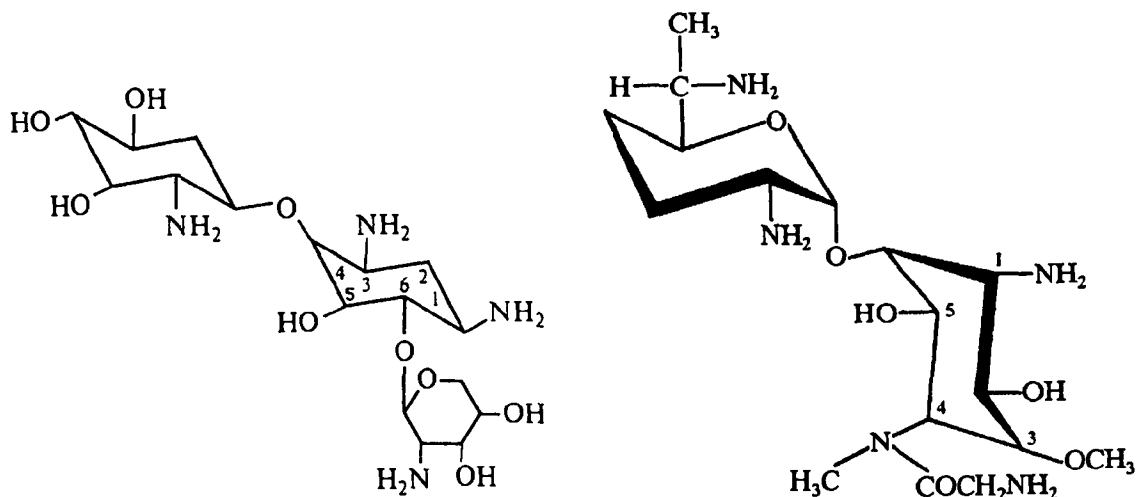
К первой подгруппе относятся антибиотики, близкие к канамицину: канамицин А, В и С, тобрамицин, небрамицин. Ниже приведено строение канамицина А:



Вторая подгруппа включает гентамицины, сизомицин, вердамицин и др. Типичной для этой подгруппы антибиотиков является структура гентамицина C_1 :



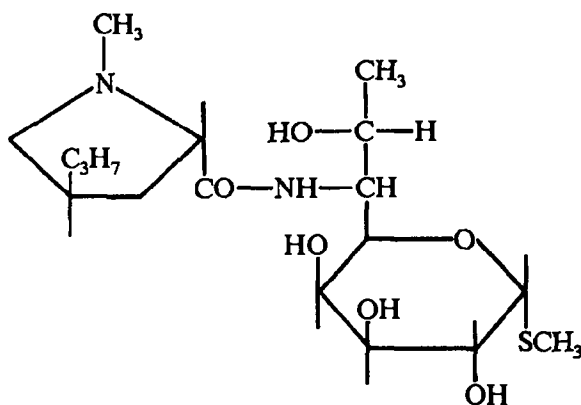
К третьей подгруппе относится комплекс селдомицинов (факторы 1, 2, 3 и 5), фортимицины. В качестве примера приведем структуру селдомицина (фактор 1) и фортимицина:



Фактор 1

Фортимицин

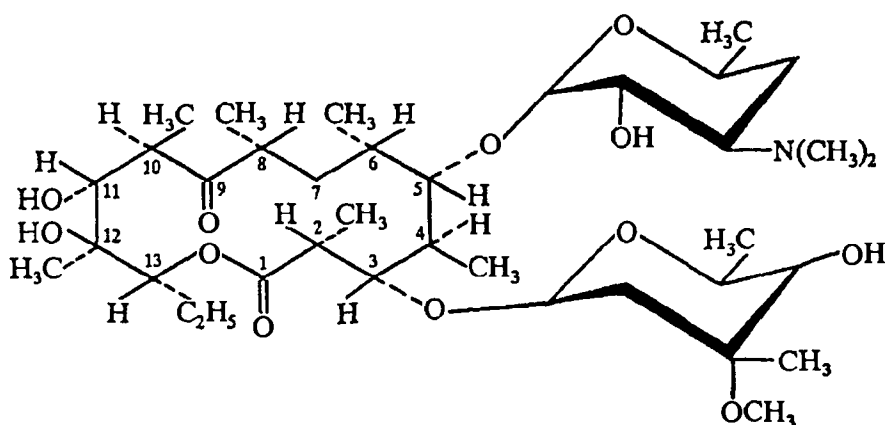
3) Другие (N и C) глюкозиды, например линкомицин:



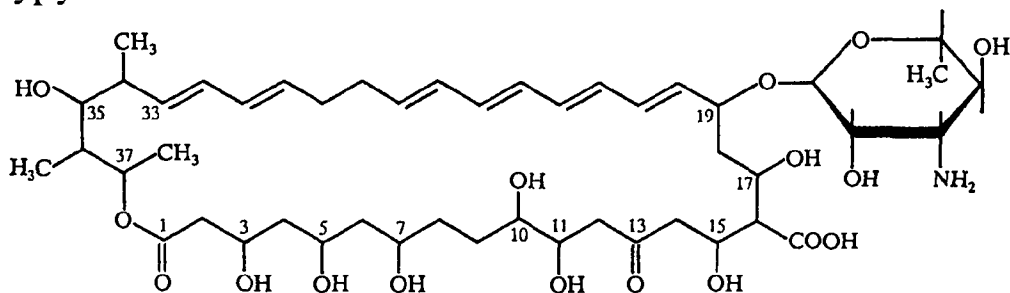
2. Макроциклические лактоны (лактамы).

В названное семейство включаются 4 основные группы антибиотиков.

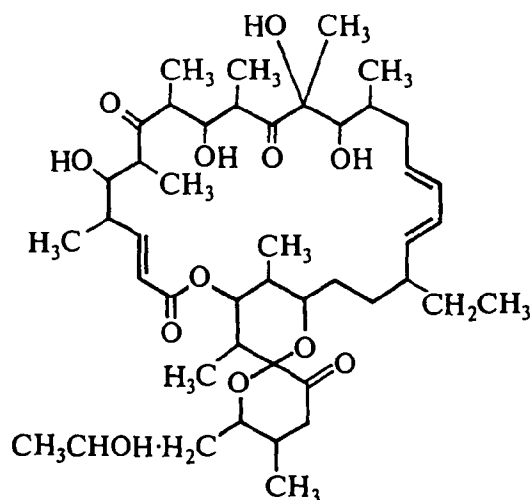
1) Макролидные антибиотики: эритромицин, метимицин и др. Ниже показано строение эритромицина А:



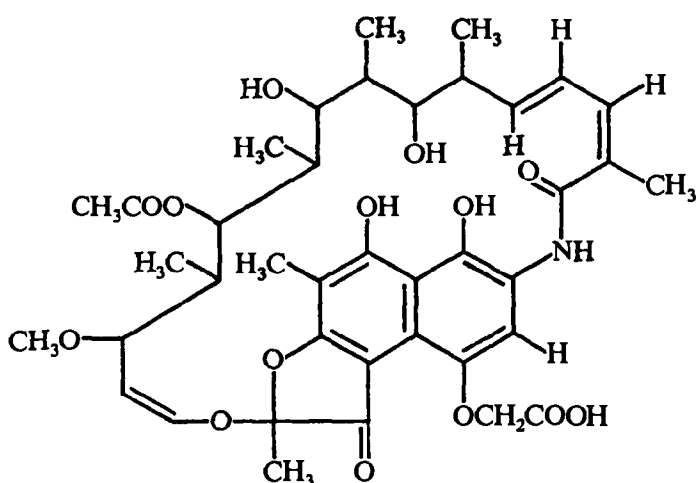
2) Полиеновые антибиотики, характерная особенность строения которых — наличие системы, содержащей от трех до восьми сопряженных двойных связей $-(CH=CH)-$ (нистатин, микогепаин, амфотерицин В и др.). Так, нистатин А₁ имеет следующую структуру:



3) Другие макроциклические лактоны: макролактоны (олигомицин), макротетралиды (нактины). В качестве примера приведем структуру олигомицина В:



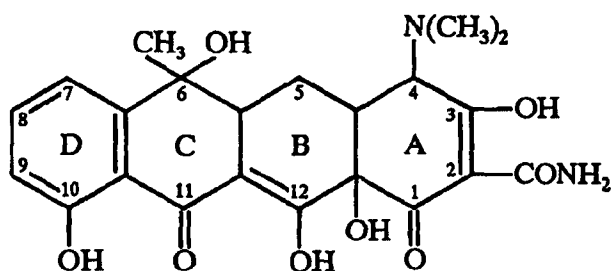
4) Макролактамы антибиотики: рифамицины, в частности рифамицин В:



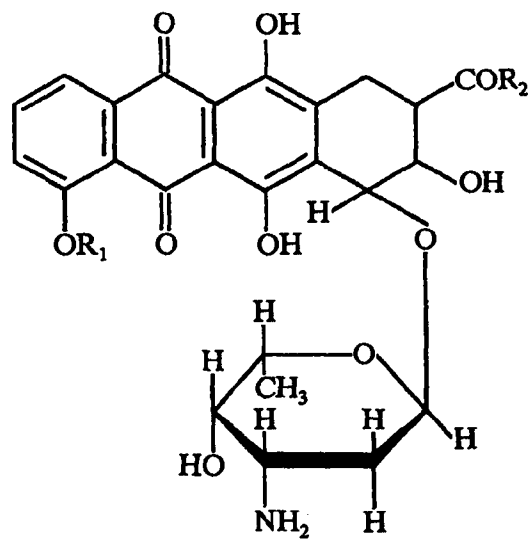
3. Антибиотики хиноны и подобные им соединения.

В названное семейство включаются следующие группы антибиотиков.

1) Линейные конденсированные полициклические соединения, куда входит группа тетрациклинов. Приведем строение тетрациклина:

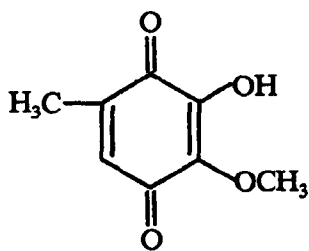


2) Производные нафтохинонов. В эту группу входит большое число (около 70) антибиотиков, названных антрациклинами. В качестве примера можно отметить такие антибиотики, как дауномицин, адриамицин, карминомицин:

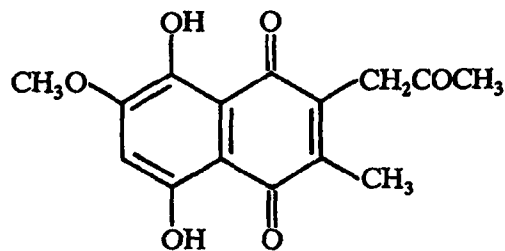


Дауномицин: $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$
 Адриамицин: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$
 Карминомицин: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

3) Антибиотики, являющиеся производными бензохинона (фумигатин, яваницин, митомицин и др.):



Фумигатин



Яваницин

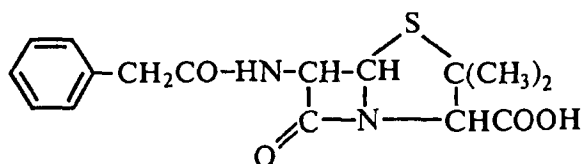
Фумигатин продуцируется культурой *Aspergillus fumigatus*, подавляет рост преимущественно грамположительных бактерий.

Яваницин вырабатывается культурой *Fusarium javanicum*, активен в отношении грамположительных бактерий.

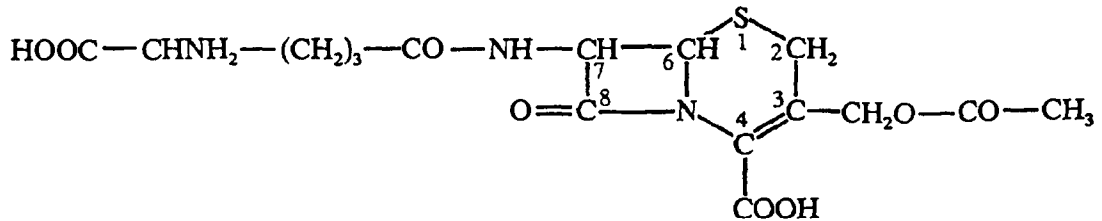
4. Антибиотики аминокислоты, пептиды и пептолиды.

Это большое семейство антибиотиков, образуемых мицелиальными грибами и бактериями, включая стрептомицеты, и имеющих большое практическое и научное значение. В семейство входит пять групп.

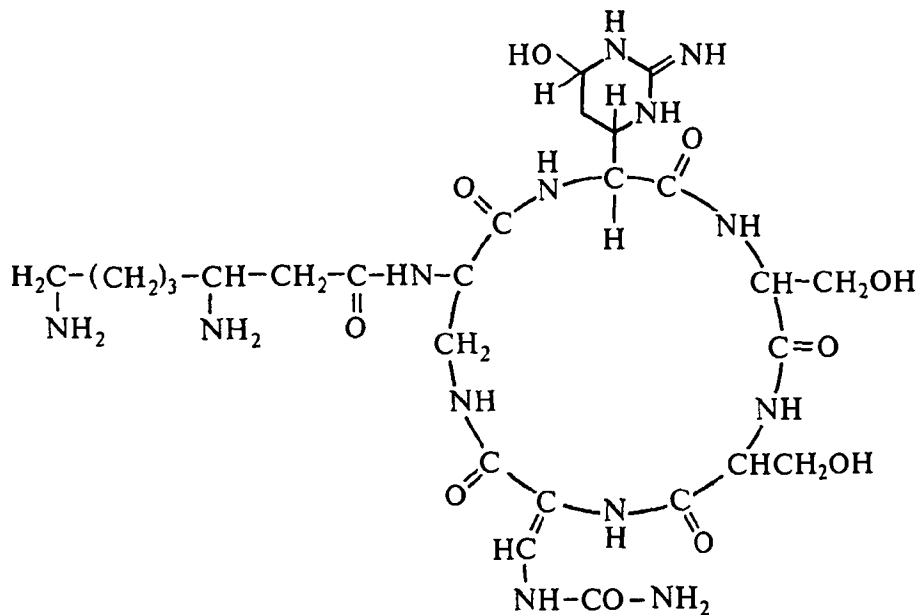
1) Антибиотики — производные аминокислот, включая бета-лактамы. Среди бета-лактамных антибиотиков отметим пенициллины, цефалоспорины, цефамицины, оксоцефемы, сульбактамы и др., в частности бензилпенициллин:



и цефалоспорин С:

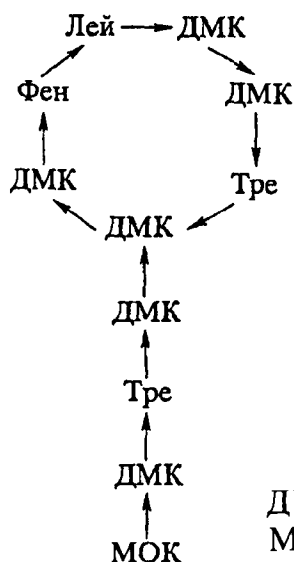


2) Антибиотики-гомопептиды: грамицидин А, тироцидин, бацитрацин, грамицидин С, виомицин. Приведем структуру виомицина:



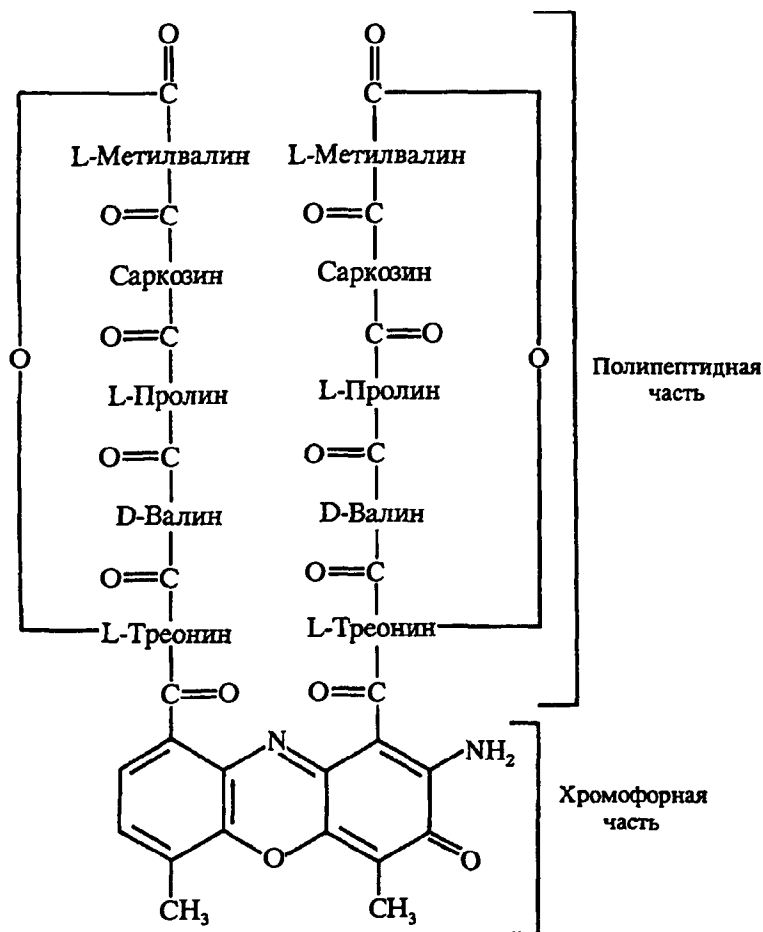
Виомицин — циклический полипептид, продуцируемый *Streptomyces vinaceus*.

3) Гетеромерные пептиды: полимиксины, в частности полимиксин В₁:



ДМК — остаток диаминомасляной кислоты
МОК — остаток метилоктановой кислоты

4) Антибиотики-пептолиды, включающие большую группу актиномицинов, в том числе актиномицин D:

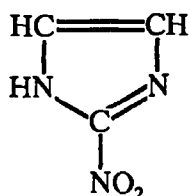


5) Высокомолекулярные: циклоспорины, лантибиотики (строение см. на с. 204, 207).

5. Азотсодержащие гетероциклические соединения.

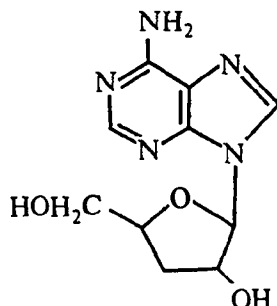
Названное семейство антибиотиков включает три основные группы соединений.

1) Антибиотики, структура которых представляет собой неконденсированные (единичные) гетероциклы. В качестве примера можно назвать азомицин:

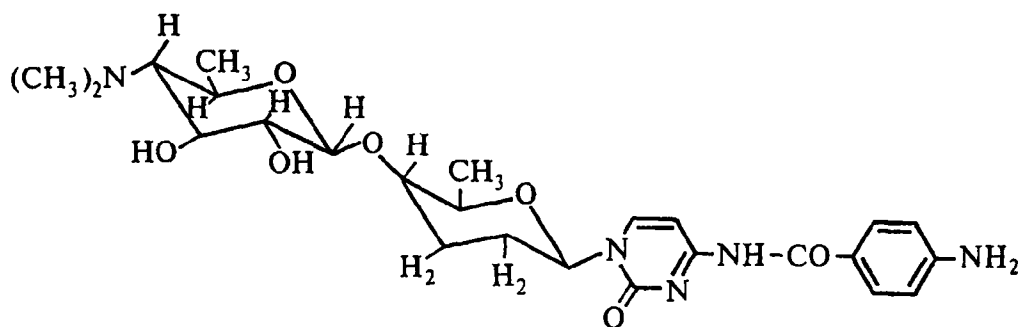


2) Конденсированные гетероциклы. Представителями этой группы являются нуклеозидные антибиотики: пуромицин, кордицепин и др.

В частности, кордицепин вырабатывается грибом *Cordyceps militaris* и имеет следующее строение:



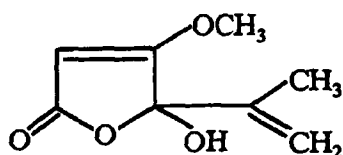
3) Антибиотики-алкалоиды, обладающие противоопухолевой активностью. В качестве примера такого соединения можно назвать пликацетин, который продуцируется культурой *Streptomyces plicatus*:



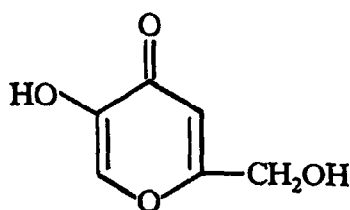
6. Кислородсодержащие гетероциклические антибиотики.

Это семейство антибиотиков, вырабатываемых различными организмами (грибами, бактериями семейства *Actinomycetales*), обладает высокой биологической активностью. К этому семейству относятся следующие группы.

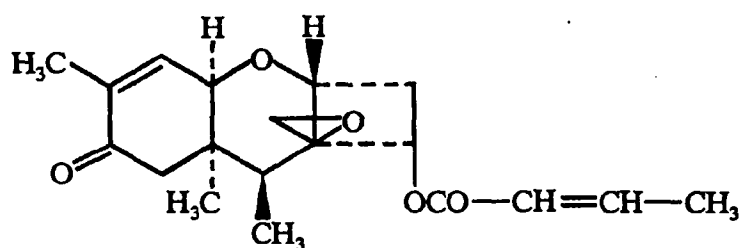
1) Соединения с одним 5-членным O-гетероциклом, например пеницилловая кислота:



2) Антибиотики с одним 6-членным O-гетероциклом, к которым относятся цитринин и койевая кислота, имеющая следующую структуру:

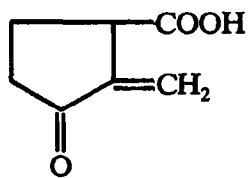


3) Антибиотики с несколькими O-гетероциклами, например трихоцетин:

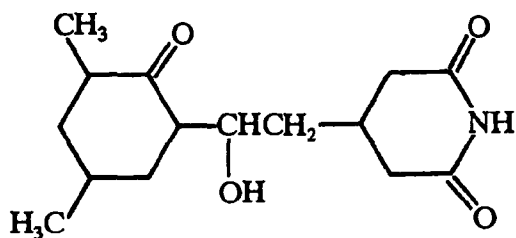


7. Алициклические антибиотики.

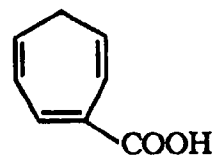
1) Названное семейство включает производные цикlopentана (саркомицин), циклогексана (актидион) и циклогептана (туевая кислота):



Саркомицин

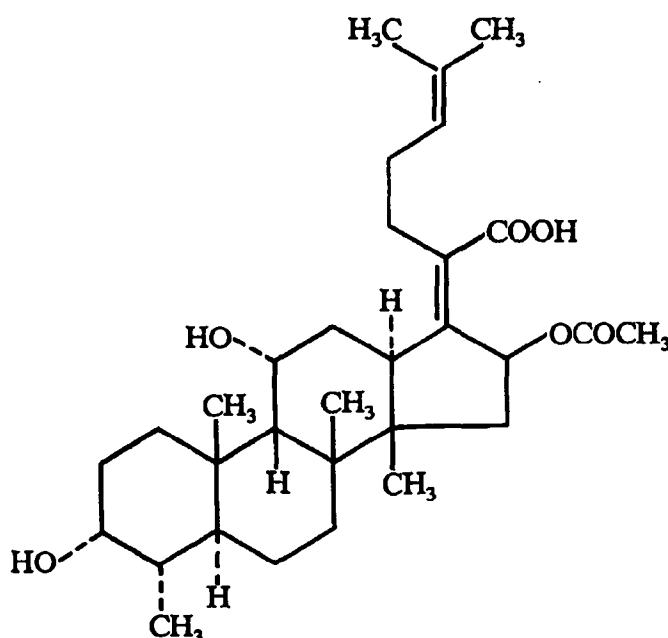


Актидион (циклогексамид)



Туевая кислота

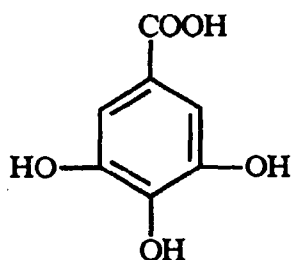
2) К алициклическим антибиотикам относятся также соединения, называемые олиготерпенами, которые имеют стероидные скелеты. В качестве примера такого типа антибиотика можно назвать фузидиевую кислоту (фузидин), образуемую культурой *Fusidium coccineum*:



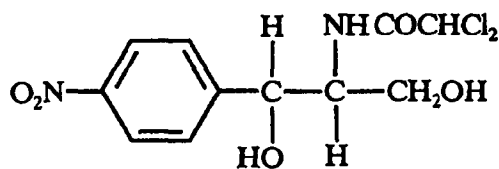
8. Ароматические антибиотики.

К этому семейству относятся четыре группы антибиотиков.

1) Соединения бензола, в частности галловая кислота и хлорамфеникол:

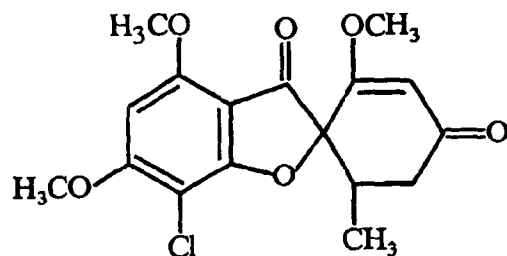


Галловая кислота

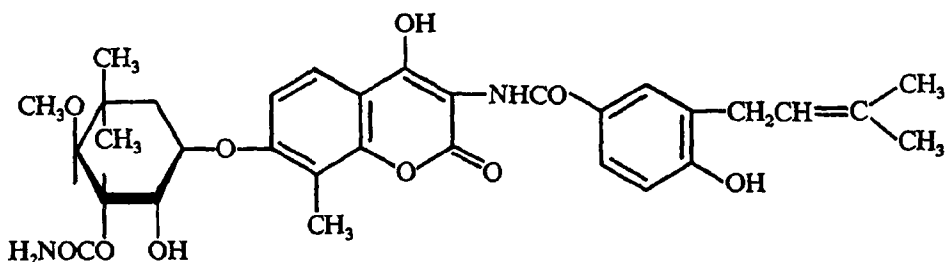


Хлорамфеникол

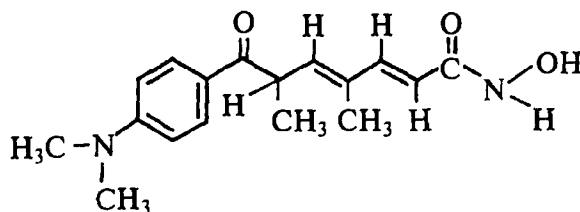
2) Антибиотики, структура которых имеет конденсированные ароматические соединения, например гризеофульвин:



3) Соединения, имеющие небензольные ароматические структуры, в частности новобиоцин:



4) Различные производные ароматических соединений. К ним относится трихостатин:



Этот антибиотик образуется *Streptomyces hydroscopicus*, подавляет развитие грибов родов *Trichophyton*, *Candida*.

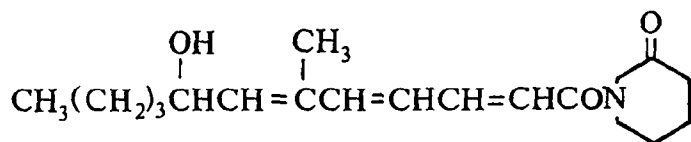
9. Алифатические антибиотики.

В указанное семейство антибиотиков входит несколько групп соединений.

1) Производные алканов, образуемые грибами базидиомицетами. В качестве примера можно назвать антибиотик, продуцируемый *Clitocybe diatreta* и получивший название «диатретин». Он имеет следующее строение:



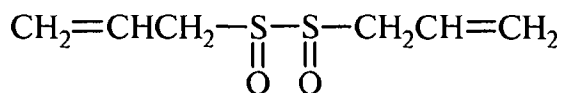
2) Производные алифатических карбоновых кислот, в том числе вариотин:



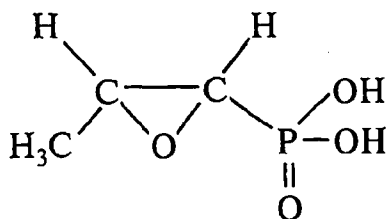
Этот антибиотик вырабатывается грибом *Paecilomyces varioti* и находит применение в медицине при лечении дерматомикозов.

3) Алифатические соединения, содержащие S (алицин) и P (фосфономицин).

Алицин относится к серосодержащим соединениям:



Фосфономицин — антибиотик, образуемый *Streptomyces fradiae*. Он содержит остаток фосфорной кислоты и имеет следующее строение:



10. Холестеринподобные антибиотики.

К этому типу соединений относится антибиотик скваламин, продуцируемый катрановой акулой семейства *Squalidae*.

11. Смешанные антибиотики с неизвестным строением скелета молекул.

* * *

Предложенная классификация антибиотиков по химическому строению имеет важное значение не только для изучения химии антибиотических веществ, но и для выявления механизма биологического действия. Структура антибиотика непосредственно связана с механизмом биологического действия препарата. Эта классификация более обоснована.

Приведенная классификация антибиотиков показывает, что эти физиологически активные продукты жизнедеятельности организмов представляют собой самые разнообразные по химической природе вещества: от простых соединений до очень сложных полипептидных структур типа полимиксинов, актиномицинов, циклоспоринов и лантибиотиков.

Существует классификация антибиотиков, в основу которой положены физико-химические свойства этих веществ. Подобно классификации по принципу антимикробного действия, она имеет преимущественно практическое значение. Этот принцип классификации антибиотиков не нашел распространения и, по существу, не используется.

Поскольку настоящий учебник рассчитан в первую очередь на биологов и в нем ставится задача ознакомить студентов не со всеми известными антибиотиками, а лишь с теми, которые имеют важное практическое или теоретическое значение, по-видимому, рационально рассматривать антибиотические вещества в связи с теми группами организмов, которые их образуют. Однако

учитывая несовершенство этой системы классификации, необходимо в группах организмов — продуцентов антибиотиков использовать и принцип химического строения антибиотических веществ. Так, антибиотики, вырабатываемые актиномицетами, рассматриваются по группам на основе их химического строения: углеводные антибиотики (аминогликозиды, линкомицин), макроциклические лактоны (лактамы), хиноны и т.д. При этом обнаруживается, что продуцентами аминогликозидов являются как стрептомицеты, так и микромонаспора. Аналогичное положение и с антибиотиками, полученными из грибов. Группа бета-лактамных антибиотиков рассматривается среди грибных продуцентов. Вместе с тем эти соединения образуются также стрептомицетами и нокардия.

Таким образом, в представленной читателю книге в основу рассмотрения антибиотиков положен смешанный принцип: по группам биологического происхождения, а внутри этих групп использован принцип объединения антибиотиков по их химическому строению.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте определение понятия «антибиотик».
2. Почему нельзя относить антибиотики к метаболитам микроорганизмов?
3. Каковы единицы биологической активности антибиотиков?
4. Что такое антибиотическая продуктивность микроорганизмов?
5. Изложите принципы классификации антибиотиков.

Глава 3

ОБРАЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ПРИРОДЕ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ

Образование антибиотических веществ в естественных условиях развития организмов

Антибиотические свойства, проявляющиеся у многих групп микроорганизмов, обитающих в различных экологических условиях, — широко распространенное явление. Микробы — продуценты этих биологически активных веществ встречаются среди морской микрофлоры, выделяются из рек и озер, из растительных и животных остатков, непосредственно из организмов животных

и растений и т.д. Однако наибольшее количество микроорганизмов, обладающих антибиотическими свойствами, обнаружено в различных почвах.

Способность микроорганизмов образовывать антибиотические вещества изучается, как правило, в условиях искусственного их культивирования, в лабораторных опытах. Однако возникает вопрос: проявляется ли антагонизм, и особенно антагонизм, связанный с образованием антибиотиков, у микроорганизмов в условиях их естественного местообитания? Фактический материал дает возможность ответить на этот вопрос положительно.

Установлено, что бактерии семейства *Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae* и др., попадая в свежую морскую воду, гибнут в ней через несколько дней. Количество гноеподобных стафилококков в свежей морской воде Черного моря через 10 дней уменьшается в 2–3 раза. В прокипяченной черноморской воде этот микроб заметно развивается. Аналогичные наблюдения получены и при изучении пресной воды.

Следовательно, в водоемах в результате жизнедеятельности различных организмов, характерных для этой среды, накапливаются вещества, препятствующие развитию многих видов микробов, попадающих в эти водоемы.

Наряду с биотическими факторами существенную роль в угнетении не свойственных этой среде микроорганизмов играют и абиотические факторы, такие, как концентрация солей и иных растворимых веществ, температура, отсутствие некоторых компонентов, необходимых для питания, и т.д.

Большое число исследований посвящено изучению возможностей образования антибиотических веществ в почвах — основном естественном местообитании большинства микроорганизмов.

Многие патогенные для человека и животных бактерии (кишечная, брюшнотифозная, дизентерийная палочки и др.), а также фитопатогенные грибы и бактерии, попадая в почву, быстро в ней погибают. Однако в стерильной почве те же самые организмы сохраняются в течение длительного времени. Иными словами, в почве наблюдаются те же явления, что и в водоемах. Различные патогенные бактерии, попадая в почву, сохраняются в ней неодинаковое время (табл. 4).

Возбудитель туберкулеза свеклы *Xanthomonos beticola*, попадая в почву, погибает в ней через 3–10 дней, а из стерильной почвы этот организм выделяется в течение 32–60 дней.

Таким образом, в почвах и водоемах, т.е. основных естественных местах обитания микрофлоры, создаются условия, препятствующие развитию некоторых посторонних для этих почв видов микробов.

Выживаемость патогенных бактерий в различных почвах
(по Красильникову, 1958)

Бактерии	Выживаемость, сут		Бактерии	Выживаемость, сут	
	минимум	максимум		минимум	максимум
<i>Salmonella typhi</i>	15–20	360	<i>Brucella melitensis</i>	3–10	90
<i>Shigella dysenteriae</i>	6–10	270	<i>Pasteurella pestis</i>	3	30
<i>Vibrio cholerae</i>	6–12	120	<i>Francisella tularencis</i>	—	75
<i>Mycob. tuberculosis</i>	60	210			

Связано это с тем, что, во-первых, в естественных условиях неблагоприятное влияние на постороннюю микрофлору оказывают физические и физико-химические (абиотические) факторы среды, в том числе температура, влажность, рН, осмотическое давление и др. Во-вторых, наиболее существенную роль, по-видимому, играют биотические факторы: мико- и микрофлора, бактерио- и актинофаги, почвенные (водные) животные и растения, а также разнообразные продукты их жизнедеятельности, в том числе и вещества типа антибиотиков.

О возможности образования в почвах антибиотиков и проявления ими антибиотических свойств непосредственно в этих условиях существует два противоположных мнения.

Одни авторы считают, что антибиотики могут вырабатываться при развитии микроорганизмов непосредственно в почвах, где они проявляют свою биологическую активность. Другие исследователи полагают, что антибиотики не образуются в почве, а если и образуются, то их биологическая роль, по существу, сводится к нулю в результате того, что в почве антибиотики подвергаются быстрой деградации, они адсорбируются почвенными частицами и вступают в реакции с органическим веществом почвы. Такой точки зрения придерживается, в частности, известный американский микробиолог Д. Готтлиб (1976).

Сторонники невозможности образования антибиотиков в почвах основывают свои выводы, в частности, и на том, что в почве якобы недостаточно питательных веществ, необходимых продуценту для активного развития и образования антибиотиков.

Изучение вопроса об образовании антибиотиков микроорганизмами в почве представляет ряд трудностей. Главные из них связаны с определением антибиотических веществ в почве: во-первых, антибиотики менее стабильны в почве, чем в других субстратах; во-вторых, многие из них, и в первую очередь антибиотики-

основания, легко адсорбируются коллоидами почвы и инактивируются почвенным комплексом.

Поскольку к настоящему времени еще нет надежных методов определения антибиотиков в почве, довольно трудно разобраться в вопросе о том, образует ли в ней изучаемый организм антибиотическое вещество или нет. Пытаясь решить эту проблему, ряд исследователей, изучавших возможность образования антибиотиков в почвах, использовали стерильную почву с добавлением к ней разнообразных питательных веществ (глюкоза, пептон, рыбный экстракт, сахарная свекла, солома и др.). В результате удалось установить, что некоторые микроскопические грибы и стрептомицеты в этих условиях могут образовывать антибиотические вещества (табл. 5).

Таблица 5

Образование антибиотиков грибами *Aspergillus clavatus* и *A. terreus* при росте в стерильной почве с добавлением различных субстратов
(Grossbard, 1955)

Субстрат, добавленный к стерильной почве	<i>A. clavatus</i>		<i>A. terreus</i>	
	Антибиотическая активность в отношении			
	<i>Bacillus mycolides</i>	<i>Bacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>)	<i>B. mycooides</i>	<i>Bacterium carotovorum</i> (<i>Erwinia carotovora</i>)
Свежая пшеничная солома	28	30	11	0
То же + глюкоза (3–5%)	110	117	38	6
Сахарная свекла	49	50	21	3
Тимофеевка	40	41	13	0
Люцерна	0	0	0	0
Конский навоз	0	0	0	0

Примечание. Антибиотическая активность выражена в единицах, эквивалентных единицам антибиотика экспансина, образуемого *A. clavatus*.

Данные табл. 5 показывают, что в стерильной почве при добавлении к ней пшеничной соломы и 3–5% глюкозы или некоторых растительных остатков (сахарная свекла, тимофеевка) грибы образуют антибиотики.

Однако ряд других экспериментов, проведенных с почвами без внесения в них дополнительных питательных веществ, также показали возможность накопления антибиотиков в этих условиях.

Так, *Streptomyces venezuelae*, развиваясь в стерильной почве, не содержащей дополнительных питательных веществ, образует хлорамфеникол. В автоклавированных почвах, как обогащенных, так и не обогащенных источниками азота и углерода, выращенный в этих условиях *S. griseus* продуцирует актидион.

В стерильной почве без внесения в нее дополнительных питательных веществ образуются также глиотоксин и актиномицин.

Однако при использовании стерильной почвы как субстрата с дополнительным внесением в нее разнообразных источников питания создаются совершенно иные условия, весьма далекие от естественных. Прежде всего при стерилизации почвы в ней убивается вся флора и фауна, в результате чего почва обогащается дополнительными веществами. Кроме того, в стерильной почве исключается всякая конкуренция за питательные вещества. Под действием высоких температур при стерилизации меняются коллоиды почвы. Одним словом, при стерилизации почва превращается в субстрат с новыми свойствами, только внешне похожий на почву. Поэтому опыты, в которых использовались простерилизованные почвы с добавлением к ним самых разнообразных питательных веществ, порой никогда не встречающихся в естественных условиях (например, рыбный экстракт, кукурузный экстракт и т.п.), не могут доказать способности или отсутствия таковой к образованию антибиотиков микроорганизмами в естественных почвах.

Ряд авторов показали возможность выработки антибиотиков в естественных почвах, но при условии внесения туда необходимых дополнительных питательных веществ. Например, крупный американский исследователь в области антибиотиков А. Демайн (1980) считает, что антибиотики могут образовываться в нестерильных почвах, обогащенных растительным материалом.

Действительно ли в естественной почве не хватает питательных веществ, необходимых для развития микроорганизмов и продуцирования антибиотиков?

Для ответа на этот вопрос были проведены специальные эксперименты (Егоров, 1960). Из трех образцов почв, взятых в Ботаническом саду и на Звенигородской биологической станции МГУ, были выделены стрептомицеты и обычным методом отобраны наиболее активные штаммы. Штаммы-антагонисты поддерживались на агаризованной синтетической среде. Следовало выяснить возможность развития выделенных штаммов стрептомицетов и образования ими антибиотиков при культивировании их только на веществах тех почв, из которых они были изолированы. С этой целью были проведены три серии опытов: 1) выращивание стрептомицетов на водных почвенных вытяжках, полученных по методу Виноградского; 2) культивирование изученных штаммов стрептомицетов на водной почвенной вытяжке с добавлением гуматов, выделенных из тех же почв; 3) культивирование стрептомицетов на поверхности агаровых блочков, приготовленных из выщелоченного агара и дистиллированной воды (агаровые блочки

помещались на поверхности почвы, покрытой холстиной). Почва находилась в чашках Коха. Предполагалось, что вещества почвы будут диффундировать в толщу агаровых блочков и использоваться стрептомицетами, находящимися на их поверхностях.

Антибиотические свойства в первых двух случаях определялись методом диффузии в агар с использованием металлических цилиндров, в третьем — методом наложения кусочков агарового блока на поверхность агаровой пластинки, предварительно засеянной тест-организмом.

Во всех случаях использовалась «оживленная» почва, т.е. почва, которая выдерживалась в течение 48 ч в термостате при 26 °С и при достаточной влажности.

Результаты опытов показали, что почти все изучаемые штаммы стрептомицетов могут расти (хотя и не так обильно) и образовывать при этом антибиотики только на веществах почвы, без добавления дополнительных компонентов.

Таким образом, только на веществах почвы, в которой непрерывно происходят разнообразные биологические процессы, стрептомицеты, выделенные из этой же почвы, могут развиваться и образовывать антибиотические вещества.

Можно привести много примеров, указывающих на возможность образования антибиотиков микроорганизмами в естественных местах обитания.

Б.В. Брайэн с сотрудниками в 1945 г. обратил внимание на очень плохой рост елей в одном из хвойных лесов. Исследования показали, что угнетение роста елей связано с образованием в почве этого участка веществ, оказывающих ядовитое действие на микоризу хвойных деревьев. В дальнейшем выяснилось, что такими ядовитыми для микоризных грибов веществами являются антибиотики, образуемые некоторыми грибами из рода *Penicillium*, характерными для этих почв. Позднее Брайэн из гриба *P. terlikowskii* выделил антибиотик глиотоксин, оказавшийся весьма токсичным для микоризных грибов хвойных растений.

Довольно быстрая гибель фитопатогенных микробов в естественной почве позволила Брайэну высказать предположение, что исчезновение возбудителей заболеваний растений связано с антагонистическим действием определенных сапрофитов.

Это предположение было подтверждено рядом экспериментов. Так, если в почву одновременно с фитопатогенным грибом *Ophiobolus graminis* вносили некоторые сапрофиты, то заражение пшеницы этим грибом резко снижалось или же совсем не наблюдалось, поскольку сапрофиты образуют антибиотическое вещество, подавляющее развитие гриба.

Известно, что гриб *Trichothecium roseum* проникает в плоды яблок лишь через повреждения эпидермы. Как правило, первичным паразитом плодов является гриб *Fusicladium dendriticum*, затем вытесняемый *T. roseum*. Установлено, что подавление развития *F. dendriticum* происходит в результате выделения *T. roseum* антибиотика трихотецина.

В яблоках, естественно зараженных *T. roseum*, был обнаружен трихотецин в высокой концентрации. В данном случае значение образования антибиотика, по-видимому, не ограничено только вытеснением первичного паразита, но служит также для защиты субстрата от захвата его другими грибами-конкурентами.

Выделенный из почвы стрептомицет *S. melanochromogenes* в естественных условиях задерживал разложение целлюлозы, интенсивно осуществляемое *Vibrio vulgaris*. Антибиотические свойства изученного в лабораторных условиях стрептомицета проявлялись как раз в отношении целлюлозоразрушающих микроорганизмов, в том числе и *V. vulgaris*.

Все эти примеры, а их можно привести очень много, показывают, что различные микроорганизмы (бактерии, мицелиальные грибы), проявляющие антибиотические свойства в лабораторных условиях, угнетают развитие некоторых микроорганизмов и в естественных субстратах.

Прямыми анализами показано, что антибиотик, продуцируемый *S. antibioticus*, может синтезироваться непосредственно в почве. Мицелиальные грибы рода *Penicillium* (*P. cyclopium*, *P. lapiaosum*, *P. citrinum*), образующие антибиотики — пеницилловую кислоту, патулин и цитринин, синтезируют эти вещества при развитии в почвах, куда внесено измельченное сено. В естественных почвах без внесения в них добавок названные антибиотики хотя и образуются, но в меньших количествах.

К.А. Виноградова (1975), используя метод люминесцентной микроскопии, разработала способ непосредственного наблюдения за развитием стрептомицета и синтезированием антибиотика в натуральной почве. В качестве объекта изучения был использован *Streptomyces olivocinereus* — продуцент антибиотика гелиомицина (резистомицина), который оказался хорошей моделью для этих целей: гелиомицин способен к яркой люминесценции при фотовозбуждении.

Метод прямого наблюдения за образованием гелиомицина и его состоянием в почве показал, что *S. olivocinereus* способен образовывать большое количество гелиомицина в каштановой почве и черноземе без внесения в них дополнительных питательных веществ. Установлено, что антибиотик первоначально продуцируется небольшими участками гиф, которые затем удлиняются.

Затем гифы распадаются и гелиомицин обнаруживается в виде светящихся «гранул» и их скоплений в почве. В виде этих «гранул» антибиотик может длительно сохраняться в активном состоянии (более двух месяцев).

Таким образом, антибиотические вещества как продукты жизнедеятельности организмов могут образовываться и накапливаться непосредственно в почвах.

Этот вывод подтверждают Хаддлестоун с соавторами (1993), подчеркивая, что антибиотики в заметных количествах могут накапливаться в почве и оказывать влияние на состав популяций различных видов микроорганизмов и распространение среди последних факторов устойчивости к антибиотическим веществам.

В некоторых регионах в грунтовых водах обнаружено высокое содержание резистентных к антибиотикам форм кишечной палочки, хотя применение антибиотиков в этой местности было незначительным. Одной из возможных причин такого феномена, как отмечают С.М. Навашин и Ю.О. Сазыкин (1998), может быть «слабое селективное давление в результате какого-то, пусть небольшого, количества антибиотика в природной среде». Такое объяснение не лишено оснований, если иметь в виду способность микроорганизмов продуцировать в природных условиях антибиотики.

Сохранность искусственно внесенных в почву антибиотиков зависит от характера антибиотического вещества и типа почвы (табл. 6).

Таблица 6

Длительность сохранения нативных антибиотических веществ
в натуральных почвах, сут
(по Коренько и др., 1955)

Вид стрептомицета	Подзол	Серозем	Чернозем	Краснозем
<i>Streptomyces vilaceus</i> 1806	4	3	3	2
<i>S. aurantiacus</i> 1149	6	5	5	5
<i>S. aurantiacus</i> 1306	8	8	8	8
<i>S. globisporus</i> sp. 2302	6	5	7	0
<i>S. globisporus</i> sp. 81	7	6	7	0
<i>S. sp.</i> 76	20	20	22	20
<i>S. griseus</i> 2535	1	1	1	1
<i>S. variabilis</i> 2343	12	12	12	11

Как следует из приведенных данных, длительность сохранения антибиотиков в почве зависит от типа почвы, ее свойств, а также от природы антибиотического вещества, образуемого тем или другим видом стрептомицета.

По-видимому, весьма быстрая инактивация некоторых антибиотиков в красноземе связана с его кислотностью (рН краснозема 4,39–4,84).

Инактивация антибиотических веществ в почве происходит под действием как биотических, так и абиотических факторов.

Антибиотики основной природы (стрептомицин, эритромицин и некоторые другие) необратимо адсорбируются коллоидами почвы, что иногда приводит к потере ими биологической активности.

В табл. 7 приведены данные о минимальном количестве антибиотиков различной химической природы, которые возможно определить в растворе (контроль) и глине.

Таблица 7

Влияние глины на минимально определяемую концентрацию антибиотиков
(no Williams, Khan, 1974)

Тип строения	Антибиотик	В растворе, мкг/мл	В глине, мкг/г
Основные	Стрептомицин	1,00	25,00
	Неомицин	2,50	800,00
	Канамицин	0,50	200,00
Полипептиды основные	Полимиксин	6,0	800,00
	Виомицин	7,5	2000,00
Амфотерные	Хлортетрациклин	0,02	0,05
	Окситетрациклин	0,10	0,40
Макролиды	Карбомицин	0,6	25,00
	Эритромицин	2,0	500,00

Из данных, приведенных в табл. 7, следует, что антибиотики — основания и макролиды — в большой степени адсорбируются глиной, в то время как амфотерные (тетрациклины) практически не связываются глиной.

Антибиотики, адсорбированные почвенными частицами, тем не менее биологически активны. Так, адсорбированные почвой стрептомицин и хлортетрациклин подавляют развитие и адсорбированных, и свободных клеток микроорганизмов. Связанный с почвенными частицами грамицидин оказывает антимикробное действие лишь на адсорбированные клетки микробов, не влияя на свободные.

Основной фактор инактивации антибиотиков в почве — ее микробиологический состав. Во-первых, микроорганизмы, синтезируя кислые или щелочные продукты, могут инактивировать отдельные антибиотические вещества, образующиеся в почве или попадающие туда извне. Во-вторых, почвенные микробы способны образовывать и выделять ферменты, инактивирующие антибиотики. Известно, что пенициллины, цефалоспорины, стрептомицин,

хлорамфеникол, актиномицины и др. легко разрушаются ферментами, образуемыми многими видами сапрофитных почвенных бактерий.

В-третьих, исчезновение антибиотиков в почве может, по-видимому, происходить и в результате использования этих соединений микроорганизмами в качестве источников азота и углерода. Такое предположение основано на том, что почвенные бактерии из рода *Pseudomonas* способны использовать стрептомицин в качестве единственного источника углерода и азота.

Имеются данные о том, что сильный антибиотик широкого спектра действия хлорамфеникол может использоваться некоторыми видами *Flavobacterium*, устойчивыми к его действию. Ферменты, участвующие в метаболизме фенилаланина, включаются в процесс дегградации хлорамфеникола.

Биологическая роль антибиотиков в природе

Результаты, получаемые в лабораторных условиях, нельзя непосредственно переносить на явления, происходящие в естественных местах обитания микроорганизмов.

Микробный антагонизм в почве протекает своеобразно, иногда значительно отличаясь от антагонизма тех же микробов при развитии на искусственных питательных средах. Это положение особенно важно при рассмотрении вопроса о биологической роли антибиотиков, т.е. о той роли, которую они играют в естественных местах нахождения микроорганизмов, их образующих.

Имеются две противоположные концепции о биологической роли антибиотиков. Первая исходит из того, что образование антибиотиков следует рассматривать как специфическую особенность обмена веществ организмов, возникшую и закрепленную у них в процессе эволюционного развития. Образование и выделение антибиотиков в окружающую среду при жизни организмов или после их отмирания — могущественный фактор в борьбе за существование видов.

Биосинтез антибиотиков — наследственная особенность организмов, проявляющаяся в том, что каждый вид (штамм) способен образовывать один или несколько определенных, строго специфических для него антибиотических веществ.

Вместе с тем известно, что одинаковые антибиотики могут образовываться различными видами организмов. И это нисколько не противоречит мысли о наследственно закрепленном свойстве микроорганизмов продуцировать определенные антибиотические вещества.

Выявление потенциальной возможности образовывать в процессе жизнедеятельности антибиотики связано прежде всего с условиями культивирования организмов: в одних условиях организм продуцирует антибиотик, в других — тот же организм при хорошем росте не способен синтезировать антибиотическое вещество. Однако такие явления наблюдаются при лабораторном культивировании изучаемого организма, при ограниченном или слишком богатом выборе источников питания, измененных условиях выращивания.

Вторая концепция состоит в том, что антибиотические вещества, образуемые микроорганизмами, носят случайный характер, зависящий лишь от условий культивирования. По мнению З. Ваксмана и некоторых других авторов, образование антибиотиков — это незакрепленное свойство организма, проявляющееся только при развитии организма в специфической среде и при наличии особых внешних условий. Поэтому антибиотики не имеют для продуцентов приспособительного значения, их образование не связано с эволюцией микроорганизмов. Эта точка зрения основывается на двух положениях.

1. Не все микроорганизмы образуют антибиотические вещества, что, однако, не мешает их широкому распространению в природе.

2. Антибиотические вещества, даже самые устойчивые, довольно быстро инактивируются в почве, в этом естественном местобитании большинства микроорганизмов. Только при максимальном насыщении почвы антибиотиками можно получить соответствующий биологический эффект.

Как пишут З. Ваксман и Х. Лешевалье (1962), антибиотики являются «лабораторными продуктами, образуемыми растущими чистыми (выделено нами. — *Н. Е.*) культурами микроорганизмов в условиях богатой питательными веществами среды при хорошей аэрации, но они не обнаруживаются в почве».

Итак, по мнению названных авторов, образование антибиотиков микроорганизмами носит случайный характер, зависящий только от условий культивирования. Если бы это было действительно так, то уместно ожидать, что при изменении условий культивирования, например, для продуцента стрептомицина можно получить хлортетрациклин или пенициллин. Но ведь этого никогда не бывает, как бы ни менялись условия культивирования.

Путем изменения условий культивирования экспериментатору удастся получить больший или меньший выход антибиотика или создать условия, при которых антибиотик вообще не синтезируется. Можно также путем изменения условий культивирования продуцента добиться преимущественного биосинтеза одного из антибиотиков при образовании изучаемым организмом нескольких антибиотических веществ или же получить новые формы антибиотиков, но только в пределах тех соединений, которые способны синтезироваться

этим организмом. Но экспериментатору, по-видимому, никогда не удастся достичь того, чтобы продуцент стрептомицина *S. griseus* при изменении условий культивирования начал образовывать хлортетрациклин или пенициллин. Наследственная особенность продуцента стрептомицина состоит в том, что он может образовывать только стрептомицин, гризеин или другие антибиотики, свойственные данному виду, но не пенициллин, не антибиотики тетрациклиновой группы, не актиномицины и никакие другие.

Образование антибиотиков обусловлено определенным характером обмена веществ, контролируемого соответствующими генами, возникшим и закрепленным в процессе эволюции организма. Однако нельзя отрицать тот факт, что в отдельных случаях проявление антагонизма у микроорганизмов связано с образованием продуктов обмена, не являющихся специфическими веществами их метаболизма. Подобный характер имеет антагонизм уробактерий, обусловленный выделением аммиака при использовании мочевины, или антагонизм некоторых лактобактерий, связанный с выделением ими пероксида водорода, и т.д. Но такие продукты жизнедеятельности микроорганизмов не называются антибиотиками.

Мнение о том, что антибиотики образуются только чистыми культурами, несостоятельно. Многие виды микроорганизмов (в частности, стрептомицеты) способны продуцировать антибиотические вещества только в присутствии других организмов (табл. 8).

Таблица 8

**Влияние почвенной микрофлоры (при совместном выращивании)
на антагонистические свойства стрептомицетов**
(по Макаровской, 1956)

№ штамма	Стрептомицет	Антагонистические свойства стрептомицетов				
		при изолированном росте	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Micrococcus gammousus</i>	<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Bacillus tuberculosis</i>
275	<i>Streptomyces griseus</i>	—	10	—	—	—
255	<i>S. albus</i>	—	8	—	—	—
555	<i>S. globisporus</i>	—	—	—	12	—
285	<i>S. coelicolor</i>	—	—	2	6	—
39	<i>S. griseus</i>	—	9	6	5	—
152	<i>S. violaceus</i>	—	4	6	4	5
195	<i>S. violaceus</i>	—	7	5	4	5

Примечание. Цифры означают размер зоны просветления в мм, минус — отсутствие зоны.

При описании явления антагонизма (см. с. 15–21) отмечалось, что образование антибиотиков — лишь одна из форм антагонистических взаимоотношений, существующих в мире микроорганизмов. В борьбе за распространение в природе микроорганизмы «используют» не только фактор антибиотикообразования, но и многие другие эволюционно закрепленные особенности, дающие им преимущество в конкуренции с другими видами.

По мнению многих исследователей, образование антибиотиков микроорганизмами при культивировании их в условиях лаборатории проявляется далеко не у всех организмов. Так, в ряде работ отмечается, что всего лишь 40–70% штаммов стрептомицетов обладают антибиотической активностью, а остальные неактивны. Однако при соответствующих условиях культивирования все так называемые неактивные штаммы стрептомицетов способны в той или иной степени образовывать антибиотические вещества и в лабораторных условиях.

Продукты жизнедеятельности ряда микроорганизмов способствуют проявлению антибиотических свойств у неактивных штаммов стрептомицетов и усиливают уже ранее определенные антагонистические свойства стрептомицетов (табл. 8, 9).

Данные табл. 8 и 9 показывают, что число антагонистов, встречаемых среди стрептомицетов, которое определяется обычными методами, следует признать заниженным. Этот вывод подтверждается результатами более поздних исследований. Применяя при поиске продуцентов антибиотических веществ новые тест-организмы (например, штаммы микробов с дефектом окисления, стрептомицеты), а также используя метод выращивания актиномицетов на средах, содержащих некоторые антибиотики, получили ранее неизвестные антибиотические вещества с ценными свойствами (например, со свойствами антиметаболитов и др.).

Н.А. Красильников еще в 1958 г. писал, что «среди бактерий, актиномицетов и грибов, вероятно, нет видов, которые не проявляли бы антагонистических свойств к тем или иным микробам при тех или иных условиях роста». Это положение подтверждается многочисленными данными.

Наконец, сторонники второй концепции основываются на том, что антибиотические вещества в почве быстро инактивируются, а поэтому не могут играть какой-либо биологической роли. Действительно, многие антибиотики, искусственно внесенные в почву, довольно быстро в ней исчезают. Известно также, что многие антибиотики при тех же условиях могут сохраняться в почве довольно длительное время (до нескольких недель).

При рассмотрении вопроса о биологической роли антибиотиков, образуемых в почве, следует иметь в виду, что здесь микро-

**Влияние продуктов жизнедеятельности различных видов бактерий на антиопиотическую активность
Streptomyces coelicolor (штамм 31), обладающего слабыми антагонистическими свойствами
 (по Егорову и др., 1960)**

Вариант опыта	Время куль- тивирования бактерий, сут	Время культивирования стрептомицета, сут											
		4				8				12			
		Количество внесенного фильтрата, %											
		0	1	5	10	0	1	5	10	0	1	5	10
МПБ (контроль)*	—	0—6	18	18	0	0—6	18	0	0	0—6	6	0	0
<i>Bacillus rusticus</i>	1		162	54	0		54	18	0		54	0	0
	2		162	18	0		54	18	0		54	0	0
	3		54	18	0		54	0	0		18	0	0
<i>Bacterium liquefaciens</i>	1		54	18	0		18	0	0		0	0	0
	2		18	0	0		18	0	0		0	0	0
	3		18	0	0		0	0	0		0	0	0
<i>B. nitrificans</i>	1		162	54	0		54	54	0		54	18	0
	2		162	54	0		54	18	0		54	18	0
	3		54	18	0		54	18	0		18	18	0
<i>Achromobacter agile</i>	1		162	54	0		162	54	0		18	18	0
	2		162	162	0		54	54	0		18	18	0
	3		54	54	0		54	18	0		6	6	0

* В качестве контроля использовалась та же синтетическая среда, что и для опытных вариантов, но бактериальные фильтраты заменены тем же количеством МПБ.

организмы расселяются не диффузно, а живут отдельными очагами-колониями.

Микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности, в том числе и антибиотики, адсорбируются на частицах почвы. В естественных местообитаниях (почва) микроорганизмов происходит своеобразная иммобилизация клеток и образующихся продуктов метаболизма (антибиотиков, ферментов, токсинов и др.) твердыми частицами и коллоидами почвы, что играет огромную роль в проявлении биологической активности у микроорганизмов. В тех местах, где больше органических остатков, микробы развиваются обильнее и образуемые ими очаги имеют большие размеры.

При развитии микробного очага, который может состоять из представителей одного или нескольких (не антагонистичных) видов, образуются продукты жизнедеятельности, в том числе антибиотические вещества, которые, диффундируя в соседние поры, могут играть там важную биологическую роль.

Итак, приведенный выше фактический материал, и в первую очередь результаты исследований советских авторов, показывает, что антибиотики могут образовываться и образуются при развитии микроорганизмов в естественных местах их обитания (почва) без внесения туда дополнительных питательных веществ.

В зависимости от химического строения образовавшиеся в почве антибиотики способны сохраняться там определенное время и проявлять свое биологическое действие.

Разумеется, биологическую роль антибиотиков подробно можно выяснить лишь при детальном изучении отдельных веществ.

Вопросы для самоконтроля

1. Могут ли образовываться антибиотики в естественных местах обитания микроорганизмов? Приведите различные точки зрения на эту проблему.
2. Охарактеризуйте биологическую роль антибиотиков в природных условиях.

Глава 4

УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ И ИХ АНТИБИОТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

На проявление антибиотических свойств микроорганизмов оказывают влияние многие факторы. Поэтому необходимо, хотя бы в общих чертах, рассмотреть те из них, которые наиболее существенно влияют на образование антибиотиков микроорганизмами при культивировании их в лабораторных условиях.

Условия, необходимые для проявления микроорганизмами антибиотических свойств при лабораторном культивировании

Микроорганизмы, выделенные из естественных мест обитания и культивируемые затем в лабораториях, попадают, как правило, в не свойственные им условия существования. В лабораториях большинство микроорганизмов поддерживается и изучается в виде чистых культур. В таком состоянии микробы в природе никогда не встречаются. Например, в почве микроорганизмы развиваются зонами, микроколониями, в окружении организмов других видов. Многие клетки микробов адсорбируются почвенными частицами, находятся в иммобилизованном состоянии, приобретая при этом свойства, отличные от свободноживущих клеток.

Отличие состоит и в том, что при культивировании организмов в виде чистых культур исключается возможность влияния на них других организмов, не проявляется благоприятное или, наоборот, вредное действие продуктов жизнедеятельности других организмов, продуктов распада отмерших клеток других видов и т.п. При лабораторном культивировании микроорганизмов создаются исключительно благоприятные условия: оптимальные температура развития, влажность, кислотность среды и другие условия, которых в естественных местах обитания организм обычно не имеет.

Организмы, выделенные из природы и перенесенные в лабораторные условия, — это, по выражению С.Н. Виноградского, «одомашненные, тепличные организмы».

При культивировании микроорганизмов в лабораториях обычно имеет место массовое развитие их в ограниченном пространстве. Все это способствует тому, что физиологическая деятельность микроорганизмов, находящихся в таких условиях, значительно отличается от их деятельности при развитии, например, в почве.

Приведенные примеры показывают, что при лабораторном культивировании микроорганизмов на проявление их антибиотических свойств могут влиять совершенно иные факторы, другие закономерности по сравнению с теми, которые имеют место в природе. Условия, искусственно создаваемые для развития организмов, можно легко контролировать, что позволяет определять роль и влияние отдельных факторов на рост и развитие изучаемого микроба и проявление им различных биохимических, в том числе и антибиотических, свойств.

К числу наиболее существенных факторов, оказывающих влияние на проявление антибиотических свойств микроорганизмов, выделенных из природных источников, относятся состав среды, ее активная кислотность, окислительно-восстановительные условия, температура культивирования, методы совместного выращивания двух или большего числа видов микроорганизмов и т.д., иными словами, весь сложный комплекс условий культивирования микроорганизмов.

Антибиотическая активность у штаммов стрептомицетов, не проявивших ее в обычных условиях лабораторного культивирования, может быть обнаружена в результате активации так называемых «молчащих» генов в процессе обработки указанных штаммов мутагенами. При этой обработке возникают мутанты, у которых может происходить экспрессия молчащих генов, ответственных за биосинтез антибиотика, и такие мутанты начинают синтезировать антибиотические вещества.

СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

Выяснение характера определенного физиолого-биохимического процесса, осуществляемого микроорганизмом, возможно только при тщательном подборе соответствующих питательных сред. При этом нельзя иметь какие-то универсальные среды, пригодные для изучения любого явления или всех закономерностей, связанных с развитием микроорганизма.

При выявлении потенциальных возможностей микроорганизмов образовывать антибиотические вещества подбору сред необходимо уделять самое серьезное внимание.

Понятие «среда для культивирования» включает не только определенный качественный и количественный состав компонентов или отдельных элементов, необходимых для конструктивного и энергетического обмена организма (источники азота, углерода, фосфора, ряда микроэлементов, витамины и ростовые вещества), но и физико-химические и физические факторы (активная кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, температура, аэрация и др.). Все эти факторы, взятые вместе и каждый в отдельности, играют существенную роль в развитии микроорганизма и в проявлении им отдельных физиологических и биохимических функций. Обычно изменение одного из факторов среды влечет за собой изменение другого. Например, внесение в среду в качестве источника азота такого соединения, как $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, в процессе развития организма может привести к резкому изменению рН субстрата, что, в свою очередь, будет сказываться на окислительно-восстановительном потенциале, и т.д. В

итоге резко изменится процесс развития микроорганизма, а также характер реакций обмена веществ.

Все это ставит перед исследователями проблему самого внимательного и серьезного отношения к выбору сред для культивирования изучаемых микроорганизмов.

По характеристике состава все среды для культивирования микроорганизмов, используемые в микробиологической практике, можно разделить на две основные группы: *натуральные среды неопределенного состава* и *синтетические среды**, а по физическому состоянию — на три группы: *твердые* (приготовленные с агаром, желатиной или на кремниевых пластинках), *жидкие* и *сыпучие* (увлажненные отруби, зерно).

Натуральные среды неопределенного состава. Натуральными обычно называют среды, состоящие из природных соединений, продуктов животного или растительного происхождения, имеющих сложный неопределенный химический состав. В качестве природных соединений или продуктов, издавна используемых в микробиологии, применяют различные части зеленых растений, животные ткани, солод, дрожжи, фрукты и овощи, а также навоз, почву и т.д. Большинство из них используется в виде экстрактов или настоек.

Преимущество натуральных сред неопределенного состава заключается в том, что на них хорошо развиваются микроорганизмы большинства видов, поскольку в составе таких сред, как правило, имеются все компоненты, необходимые для роста и развития. Эти среды обычно содержат ряд аминокислот, некоторые витамины и другие ценные для роста микроорганизмов вещества, а также комплексообразующие соединения, способствующие связыванию микроэлементов и таким образом препятствующие их осаждению. Кроме того, эти среды легко приготовить, материал для них дешев и доступен.

Однако не всякая натуральная среда неопределенного состава пригодна для выявления антибиотических свойств микроорганизмов. Например, некоторые стрептомицеты хорошо развиваются на разных по составу натуральных средах, но не образуют в этих условиях антибиотических веществ. Кроме того, среды с неопределенным составом малоприспособны или почти не пригодны для изучения обмена веществ микробов: они не позволяют учесть потребление многих основных компонентов среды и выяснить, какие вещества образуются в ходе развития организма,

* Впервые такая классификация сред дана мною в первом издании настоящего учебника (М., 1964, с. 73). Точно такое же деление питательных сред дают Дж. и И. Мейнелль (*Meynell G., Meynell E. Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge, 1965*).

и т.д. Такие среды используются для поддержания организмов, для накопления биомассы или для диагностических целей.

К числу натуральных сред с неопределенным составом следует отнести и те среды, в состав которых наряду с соединениями известной химической природы входят вещества неопределенного состава. Такие среды широко применяют в микробиологической практике, некоторые из них часто используются в промышленной микробиологии для получения антибиотиков, аминокислот, витаминов и других ценных продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. В качестве примера приведем несколько типов сред.

Мясопептонная среда, в состав которой одновременно с мясным экстрактом и пептоном, имеющим сложный, до конца не определенный химический состав, входят поваренная соль, фосфорнокислый калий, иногда глюкоза или сахароза.

Картофельные среды с глюкозой и пептоном, часто используемые для культивирования многих видов стрептомицетов и бактерий.

Мясопептонные и картофельные среды используются преимущественно в лабораторной практике.

Среды с кукурузным экстрактом, соевой мукой, бардой и другими веществами, в состав которых наряду с названными продуктами неопределенного состава входят $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, CaCO_3 , фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза или иной углевод и ряд других соединений. Эти среды успешно применяются в промышленных условиях, так как они дешевы и обеспечивают хорошее развитие многих видов микроорганизмов с высоким выходом ценных продуктов жизнедеятельности, в том числе и антибиотиков.

Все среды, приготовленные на агаре или желатине, строго говоря, следует отнести к натуральным средам неопределенного состава. Агар, получаемый из разных видов морских водорослей, по химическому составу является сложным эфирным комплексом полисахарида с серной кислотой с включением разнообразных элементов. По составу агар близок к пектину, содержит некоторые жирные кислоты, определенные количества биотина и тиамин и другие компоненты. Все это свидетельствует о неопределенном составе агара как компонента субстрата. Поэтому добавление агара или желатина к любым средам, в том числе к синтетическим, позволяет отнести их к натуральным средам неопределенного состава.

Композиция натуральных сред неопределенного состава не является постоянной и потому, что входящие в них растительные или животные продукты не имеют строго определенного состава, что связано с различными причинами. Так, в картофельных средах с химически чистой глюкозой и пептоном из одной и

той же партии состав картофельного экстракта будет зависеть не только от сорта картофеля, но и от времени уборки, от места, где он вырос, от срока и режима его хранения и других причин. Следовательно, даже при наличии картофеля одного сорта нельзя приготовить совершенно одинаковые среды для повторных опытов. Тем более невозможно получить одинаковые результаты от опытов, проводимых в различных лабораториях при использовании натуральных сред. Поэтому для получения сопоставимых результатов и особенно для изучения физиологических и биохимических особенностей организма применяют синтетические среды.

Синтетические среды. Синтетическими называют такие среды для культивирования микроорганизмов, в состав которых входят определенные химически чистые соединения, взятые в точно указанных концентрациях. Готовить синтетические среды следует только на дистиллированной воде.

По своей композиции синтетические среды бывают довольно простыми, т.е. состоят из небольшого числа веществ. Вместе с тем их можно составить из большого числа компонентов сложного состава, и тогда они называются комплексными. Однако если в состав таких комплексных (сложных) сред входят компоненты известного химического состава и в учитываемом количестве, то от этого они не перестают быть синтетическими.

Синтетические среды очень удобны для изучения обмена веществ микроорганизмов. Если известен точный состав входящих в среду компонентов и их количество, можно, наблюдая за динамикой развития культуры, изучить их потребление и различные превращения в соответствующие продукты обмена.

При правильном подборе необходимых веществ многие организмы способны развиваться на относительно простых по составу средах. Способность расти на простых средах не следует объяснять примитивной организацией микроорганизмов. Наоборот, это, скорее, свидетельство чрезвычайно сложной ферментативной организации микроба, характеризующей его способность синтезировать из элементарных соединений субстрата все в высшей степени сложнейшие белки, витамины и другие компоненты, необходимые для жизнедеятельности организма.

Следует подчеркнуть, что разработать хорошую синтетическую среду, обеспечивающую нормальный рост изучаемого организма и достаточный уровень биосинтеза антибиотика или другого продукта жизнедеятельности, — дело весьма нелегкое, требующее от исследователя много времени и умения для правильной оценки роли и значения того или иного компонента субстрата.

При изучении условий образования антибиотиков и других биологически активных соединений все чаще применяются методы

математического планирования эксперимента, и в частности методы математического расчета соотношения компонентов субстрата и их состава. Это обеспечивает значительное повышение выхода нужного продукта, образуемого микроорганизмом. С помощью вычислительной техники можно моделировать опыты, выбирать наиболее рациональное соотношение разнообразных условий культивирования продуцента антибиотика.

Несмотря на ряд трудностей, связанных с разработкой синтетических сред, в распоряжении микробиологов и микологов имеется достаточное количество таких сред, которые по качеству не уступают сложным натуральным средам неизвестного состава.

Для изучения процесса обмена веществ микроорганизмов наиболее всего подходят жидкие среды. Твердые (агаризованные) среды успешно используются для изучения цикла развития микроорганизма, архитектоники микробных колоний, диссоциации культур, для очистки культур от сопутствующих организмов и проверки чистоты популяции. Агаризованные среды можно широко применять во многих предварительных исследованиях. Такие среды часто употребляют для выделения микробов-антагонистов из почвы и других естественных субстратов.

Сыпучие среды применяются для сохранения и поддержания многих микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, в частности актиномицетов и плесневых грибов.

Качественная характеристика компонентов среды

При культивировании организмов в целях выяснения их антибиотических свойств важное значение имеет качественная характеристика отдельных компонентов среды. Под этой характеристикой имеют в виду форму основных соединений, в которой они используются. Например, азот может применяться в среде в окисленной (NO_2^- , NO_3^-) или в восстановленной (NH_4^+ , $-\text{NH}_2$) формах.

Источники углерода также могут быть различными: органические кислоты, спирты, сахара и полисахариды, сочетания различных углеродсодержащих соединений и особенно сахаров, спиртов с органическими кислотами (молочной, пропионовой, пировиноградной и др.).

Присутствие в среде той или иной формы источника азота, источника углерода и их соотношений либо другого компонента провоцирует организм по-разному на них реагировать в зависимости от наличия у микроба тех или иных ферментативных систем и их активности, деблокировать молчащие гены, ответственные за биосинтез антибиотика, и, как результат, определенно

направлять реакции обмена веществ. Это может способствовать выявлению потенциальных антибиотических свойств микроорганизмов или, наоборот, тормозить образование антибиотика.

Подбирая среды нужного состава, следует учитывать специфику культивируемого организма. Это необходимо для создания оптимальных условий (с учетом специфики организма), которые бы способствовали наилучшему росту микроба и биосинтезу необходимых продуктов жизнедеятельности. Например, если организм не может синтезировать некоторые существенные для его жизнедеятельности соединения (например, аминокислоты или витамины) из простых веществ субстрата, то для его развития в состав среды следует ввести готовые аминокислоты или витамины. К таким требовательным организмам относятся некоторые виды бактерий (лактобактерии и др.). Актиномицеты и преимущественно почвенные плесневые грибы, как правило, строят вещества своего тела и довольно сложные по химическому составу конечные продукты обмена из соединений, образуемых из простых компонентов субстрата.

Источники азота

Источники азота оказывают важное влияние на образование антибиотических веществ микроорганизмами. На средах с одними источниками азота организмы могут хорошо развиваться, но в данных условиях не синтезируют антибиотик. Например, продуцент антиопухолевого антибиотика аурантина *S. chrysomallus* хорошо развивается на среде, содержащей в качестве единственного источника азота пептон, но при этом не образует антибиотика. Биосинтез аурантина идет на среде с нитратом. Обычно в средах для культивирования микроорганизмов источником азота служат соли азотной (HNO_3), реже азотистой (HNO_2) кислоты, аммонийные соли органических или неорганических кислот ($-\text{NH}_4$) либо аминокислоты ($-\text{NH}_2$), белки и продукты их гидролиза (пептоны, гидролизаты). В этих источниках азот находится или в окисленной ($-\text{NO}_3$, $-\text{NO}_2$), или в восстановленной форме (NH_4^+ , $-\text{NH}_2$).

В натуральных средах неопределенного состава, включающих соевую муку, кукурузный экстракт и тому подобные компоненты, азот содержится главным образом в форме белков, питательная ценность которых зависит от наличия у микроорганизмов соответствующих протеиназ, расщепляющих эти белки, и определяется тем, насколько легко в процессе ферментативного гидролиза из белков освобождается азот в виде аминокислот и несложных полипептидов, а в конечном счете — в форме $-\text{NH}_2$.

Для многих организмов наиболее легкоусвояемыми формами азота являются аммонийные соли и аминокислоты, в которых азот находится в восстановленной форме. Так, *S. griseus* хорошо развивается на средах, содержащих аммонийные источники азота, но не может использовать нитраты в качестве единственного источника азота.

Аминокислоты играют существенную роль в метаболизме микроорганизмов. Это объясняется тем, что, во-первых, аминокислоты непосредственно участвуют в синтезе белка (структурного и ферментов) и различных полипептидов; во-вторых, они могут принимать участие в образовании антибиотиков, в том числе и небелковой природы.

Заметное влияние оказывают аминокислоты на активность ферментов (индуцируют или репрессируют их образование, подавляют активность). Присутствие в среде одних аминокислот может приводить к образованию других.

Однако многие микроорганизмы успешно могут использовать и окисленные формы азота, некоторые из них для биосинтеза антибиотика нуждаются именно в нитратном источнике азота (*Streptomyces chrysomallus*, *S. subtropicus* и некоторые другие).

Доступность того или иного источника азота в основном зависит от химической природы используемого углерода. Так, при развитии *S. coelicolor* на среде с глюкозой образуются органические кислоты, в силу чего нитрит, появляющийся при восстановлении нитрата, оказывается особенно ядовитым. Если же в среде присутствует аспарагиновая кислота, то ее аминогруппа связывает нитриты и они не оказывают токсического действия.

Использование аммония и некоторых органических источников азота плесневыми грибами в большой степени зависит от присутствия в среде органических кислот. Небольшие количества (0,1–0,2%) дикарбоновых кислот с четырьмя углеродными атомами (например, янтарная, фумаровая) способствуют лучшему усвоению азота. Это, по всей вероятности, связано с тем, что в данном случае легче образуются кетокислоты, которые, в свою очередь, связывают аммиак. В этом виде включение аммиака в метаболизм грибов значительно упрощается.

Источники углерода

Источники углерода благодаря различной химической природе и неодинаковой степени окисленности оказывают существенное, но не равнозначное влияние на развитие продуцента и образование им антибиотика. Иногда на одних источниках углерода развитие организма и биосинтез антибиотика происходят хорошо, на

других микроорганизм плохо развивается или нормально растет, но не образует антибиотическое вещество.

Обычно в качестве источников углерода используют углеродсодержащие соединения, которые способны обеспечить хороший рост микроорганизма и высокий уровень биосинтеза антибиотика. Наиболее часто в состав сред входят сахара (глюкоза, сахароза, мальтоза, галактоза и т.д.), соли органических кислот (уксусной, пропионовой, молочной, пировиноградной и др.), аминокислоты, используемые организмом в качестве источников азота и углерода, спирты (глицерин, маннит), крахмал и крахмалсодержащие субстраты (кукурузная мука, соевая мука и др.).

Многие микроорганизмы, продуцирующие антибиотические вещества, легко потребляют глюкозу, способствуя быстрому накоплению биомассы и образованию антибиотика. Однако следует иметь в виду, что этот сахар не только обеспечивает хороший рост микроорганизма, но и может выступать в роли катаболитного репрессора, значительно снижая при этом выработку антибиотика.

Высокие результаты, связанные с образованием микроорганизмами антибиотических веществ, удается получить при использовании в среде комбинаций источников углерода, например сахара и органической кислоты.

Не все микроорганизмы — продуценты антибиотиков обладают достаточно активными амилазами, способными осуществлять гидролиз крахмалсодержащих природных субстратов. Поэтому целесообразно предварительно обрабатывать такое сырье ферментами (амилосубтилином, амилоризином, глюкоамилазами), способствующими быстрому осахариванию растительного материала и таким образом значительно облегчающими его использование микроорганизмами.

Конкретные примеры влияния источников углерода на образование антибиотиков различными микроорганизмами приведены при рассмотрении условий культивирования различных продуцентов антибиотиков (см. гл. 7–9).

Количественное соотношение источников углерода и азота в среде

Важное значение для развития организмов и образования ими антибиотиков имеет количественное соотношение источников углерода и азота, содержащихся в среде.

Установлено, что для наиболее благоприятного развития микроорганизма в среде соотношение между углеродом и азотом должно быть примерно 20 : 1 ($C : N = 20$). Однако такое соотношение углерода и азота не всегда благоприятно для образования антибиотика. Далеко не во всех случаях биосинтез антибиотика происходит

пропорционально накоплению биомассы микроба. Иногда при хорошем росте организма антибиотик не продуцируется или синтезируется в небольшом количестве. Поэтому для стимуляции образования организмом антибиотических веществ необходимо в каждом конкретном случае подбирать соответствующие соотношения углерода и азота в среде.

Ряд примеров показывает, что при изменении в среде определенного соотношения отдельных компонентов изменяется биосинтетическая активность организма. Так, для продуцента тетрациклина *S. aureofaciens* концентрация глюкозы в среде, равная 50 мг/мл (при содержании 2,4 мг/мл аммонийного азота), способствует максимальному росту стрептомицета (около 20 мг/мл) и образованию антибиотика. Увеличение концентрации глюкозы до 80–85 мг/мл тормозит рост стрептомицета, а количество сахара ниже 26 мг/мл не обеспечивает нормального роста микроорганизма.

Для продуцента антибиотика альбомицина *S. subtropicus* установлено, что при создании в среде избытка углерода и недостатка азота (KNO_3) значительно изменяется характер процесса. Уменьшение количества азота не сказывается на росте стрептомицета отрицательно. Однако при этом очень быстро используется азот нитрата, а время полного потребления углевода значительно растягивается, причем существенно ослабляется протеолитический процесс. В таких условиях образование антибиотика снижается.

Совсем иная картина наблюдается при изменении соотношения источника углерода и азота в среде в сторону значительного снижения концентрации углерода. При недостатке углерода в среде он быстро потребляется, в то время как нитрат расходуется гораздо медленнее. Эти условия благоприятно действуют на биосинтез альбомицина.

Источники минерального питания и их роль в развитии микроорганизмов

Жизнь микроорганизмов и их биохимическая активность во многом зависят от наличия в цитоплазме клеток и в окружающей среде неорганических соединений, содержащих такие элементы, как фосфор, калий, кальций, магний, сера, железо, марганец, цинк, медь, молибден и др.

Макро- и микроэлементы играют важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Многие из них входят в состав цитоплазмы микробной клетки в качестве составных частей некоторых ферментов, другие элементы выступают как компоненты, регулирующие осмотическое давление или изменяющие гидрофильность цитоплазмы клеток.

В золе микроорганизмов обнаружены фосфор, калий, магний, кальций, натрий, сера, железо, марганец, медь, цинк, бор, висмут и некоторые другие элементы. В расчете на массу сухого вещества фосфор составляет до 4,5%, калий — до 1,3, магний — до 0,5, кальций — до 0,8, натрий — до 1,0, сера — до 1,0, железо — до 0,2% и т.д. Однако присутствие того или иного элемента в золе микроба еще не указывает на то, что этот элемент действительно необходим ему. В золе могут обнаруживаться элементы, которые в процессе жизнедеятельности микроба адсорбировались на его поверхности. Вместе с тем точно установлено, что большинству указанных элементов принадлежит активная роль в биохимической деятельности микроорганизма.

Макроэлементы и их значение в жизнедеятельности микроорганизмов

Макроэлементы (фосфор, сера, калий, кальций и магний) входят в состав клетки как структурные элементы или же являются частью ферментных систем. В том и другом случае они выполняют важнейшие физиологические функции клетки, регулируют проницаемость клеточной мембраны, участвуют в переносе энергии, выполняют роль активаторов ряда ферментов и т.д.

Фосфор. Фосфор необходим для жизнедеятельности всех организмов, так как входит в состав важнейших соединений клетки, нуклеопротеидов, нуклеиновых кислот, полифосфатов, фосфолипидов, а также обнаруживается в некоторых промежуточных продуктах обмена.

Помимо этого фосфор играет большую роль во многих энзиматических реакциях обмена веществ микроорганизмов, особенно в углеводном обмене, в переносе энергии, дыхании клеток, а также в процессах синтеза белка и нуклеиновых кислот.

Большинство микроорганизмов легко использует в качестве источников фосфора неорганические ортофосфаты. Отдельные виды наряду с этим потребляют и фитаты (соли инозитфосфорной кислоты). К числу таких организмов относятся некоторые грибы, например *Penicillium chrysogenum*.

У актиномицетов недостаток фосфора в среде приводит к резкому изменению обмена веществ, связанному с нарушением потребления и усвоения углеводов и азота. В свою очередь, избыток фосфора в среде также резко влияет на метаболизм организмов.

При избытке минерального источника фосфора в среде происходит изменение в биохимическом составе цитоплазмы мицелия актиномицетов, нарушаются физиологические функции клетки; иногда это резко сказывается на процессе образования антибиотиков.

Продуцент стрептомицина *S. griseus* весьма чутко реагирует на концентрацию фосфора в среде: изменяется содержание РНК в цитоплазме и ДНК в ядре, что приводит к смещениям в жизненном цикле стрептомицета.

Оптимальное содержание фосфора в среде в зависимости от ее состава (от 14 до 140 мкг/мл) обеспечивает хорошее развитие стрептомицета и образование стрептомицина. При повышении концентрации фосфора выход антибиотика резко снижается.

Увеличение содержания фосфора в среде отрицательно сказывается на биосинтезе и других аминогликозидных антибиотиков (неомицинов, фортимицинов, гентамицинов и др.).

Механизм действия избытка фосфора в среде на биосинтез аминогликозидных антибиотиков связан с подавлением щелочных фосфатаз, которые осуществляют реакции отщепления остатка фосфорной кислоты от фосфорилированных предшественников молекулы антибиотика.

У некоторых продуцентов аминогликозидов, например у продуцента гентамицина *Micromonospora purpurea*, при повышении концентрации фосфора в среде рост микроорганизма подавляется.

Аналогичные закономерности наблюдаются у продуцентов антибиотиков тетрациклиновой природы (*Streptomyces aureofaciens*, *S. rimosus*), у продуцента аурантина (*S. chrysomallus*) и ряда других организмов. Однако продуцент грамицидина *C. Brevi bacillus* не реагирует заметно на изменения концентрации фосфора в среде в пределах от 0,2 до 1% двузамещенного фосфата калия. То же самое можно сказать и о продуценте новобиоцина.

Все это дало основание М.М. Левитову и С.Л. Бринберг (1967) условно разделить продуценты антибиотиков по отношению к концентрации фосфора в среде на три группы.

1. Высокочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора в среде составляет менее 10 мг% (продуценты нистатина, тетрациклинов, флоримицина, ванкомицина).

2. Продуценты средней чувствительности, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 10–15 мг% (продуценты стрептомицина, эритромицина, циклосерина, неомицина).

3. Малочувствительные продуценты, для которых оптимальная концентрация фосфора составляет 18–20 мг% (продуценты новобиоцина, грамицидина, олеандомицина).

Содержание фосфора в среде оказывает большое влияние на развитие мицелиальных грибов. Повышение концентрации этого элемента способствует преимущественному развитию мицелия *Penicillium chrysogenum*, соответствующего I–III возрастным фазам. Уменьшение концентрации фосфора в среде приводит к образованию мицелия IV–VI возрастных фаз (табл. 10).

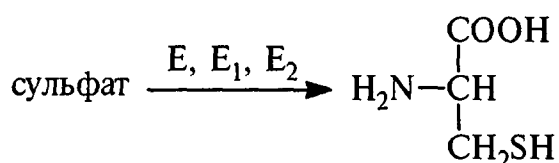
Влияние концентрации фосфора в среде на изменение мицелия *P. chrysogenum* штамма 369 (% к общему объему биомассы) и образование пенициллина
(по Дмитриевой, 1966)

Концентрация фосфора, мг%	Общий объем биомассы, г%, за 144 ч	Фаза мицелия		Антибиотическая активность, ед./мл
		I—III	IV—VI	
365	2,7	64	36	2000
90	2,2	40	60	1400
23	1,0	39	61	600

Примерно 30–50% фосфора среды потребляется мицелиальными грибами за первые 24 ч роста.

Сера. Белок и простетические группы (–SH) некоторых ферментов и коэнзима А содержат серу; без нее в среде не происходит полноценного синтеза белка, нарушаются процессы обмена. Обычно источниками серы в среде служат неорганические сульфаты, поэтому для включения серы в органическую молекулу, входящую в состав белка или витаминов, сульфат должен быть восстановлен.

Наиболее важным серосодержащим компонентом клетки является аминокислота цистеин, присутствующая в белках главным образом в виде аминокислотного остатка. Восстановление сульфата в цистеин в микробной клетке идет с участием ряда ферментов (сульфурилазы, пирофосфатазы, сульфитредуктазы) через образование сложных серосодержащих фосфорных соединений по схеме



Соединения серы участвуют в энергетических процессах микроорганизмов, входят в состав многих физиологически активных соединений.

Сера присутствует в некоторых антибиотиках, образуемых грибами (например, пенициллины, цефалоспорины, глиотоксин), бактериями (бацитрацины, субтилины, низины), стрептомицетами (эхиномицины, группа тиострептона), и в таких компонентах, как тиомочевина, метилмеркаптан и др.

В молекулах антибиотиков, относящихся к группе тиострептона (объединяет более 25 названий, в том числе тиострептон, сиомицин, тиопептин, актинотиоцин и др.), содержится до 16%

серы. Сера входит в состав тиазольного цикла, образующегося путем конденсации и последующих превращений цистеиновых остатков.

Сера стимулирует образование протеолитических ферментов у *Penicillium chrysogenum*, что сопровождается параллельным биосинтезом пенициллина. При биосинтезе пенициллина лучшим источником серы для продуцента антибиотика служит тиосульфат натрия.

Изменение концентрации серы в среде приводит к изменению физиологического состояния мицелия *P. chrysogenum* и уровня биосинтеза пенициллина. При этом сера выступает в качестве своеобразного конкурента фосфора при воздействии их на мицелий гриба. Как отмечалось, при повышении концентрации фосфора наблюдается развитие не продуцирующего антибиотик мицелия гриба I–III возрастных фаз. Увеличение же концентрации серы, наоборот, способствует тому, что наибольшее количество биомассы гриба составляет продуктивный мицелий IV–VI возрастных фаз.

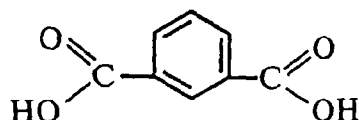
Калий. В организме калий выполняет прежде всего каталитическую функцию. К сожалению, точная роль калия пока еще не вполне выяснена. Известно, например, что недостаток калия способствует накоплению щавелевой кислоты у *Aspergillus niger*. Очень низкая концентрация калия в среде вызывает снижение потребления сахара этим грибом.

Калий выступает в качестве активатора некоторых ферментов (амилазы, инвертазы) и способствует увеличению гидратации цитоплазмы клетки.

Кальций. Ионы кальция регулируют активную кислотность (pH) среды, а также являются фактором, связывающим остатки фосфорной кислоты. Вместе с тем, не входя в состав простетической группы ферментов, ионы Са активируют некоторые из них (липазы, аденозинтрифосфатазы и др.). Кальций может выступать в качестве ингибитора некоторых ферментов, активируемых магнием. Он является кофактором α -амилазы.

При наличии в среде ионов Са снижается лизис некоторых бактериальных клеток.

Термоустойчивость бактериальных спор обусловлена дипиколиновой (пиридин-2,5-дикарбоновой) кислотой



которая в процессе прорастания спор полностью из них исчезает.

Ионы Са выполняют каталитическую функцию в синтезе дипиколиновой кислоты и таким образом определяют термостабильность спор.

Несмотря на ограниченные сведения о роли кальция в жизнедеятельности микробной клетки, известно, что он существенно влияет на азотный, углеводный и фосфорный обмен микроорганизмов.

Магний. Основная функция магния — активация ферментов, необходимых для нормального обмена веществ и роста микроорганизмов. Значение Mg^{2+} связано с гликолитическим циклом, где важная роль отводится переносу фосфатов. Довольно часто Mg^{2+} выступает как связующее звено между ферментом и субстратом. Он принимает участие в стабилизации двойной спирали ДНК, в активации аминокислот при биосинтезе белка.

Ионы магния активно участвуют в фосфорилировании.

При переносе ионов магния из окружающей среды на мембраны клеток грамположительных бактерий определенное значение имеют тейхоевые кислоты.

Оптимальный эффект действия магния зависит от концентрации источников углерода, от образования организмом оксикислот, от концентрации других ионов, в отношении которых магний является антагонистом.

Магний — физиологически активный металл, участвующий в процессе биосинтеза ряда антибиотических веществ (грамидин С и др.).

Микроэлементы и их физиологическая роль

Микроэлементы (Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, Co и др.) также играют существенную роль в жизнедеятельности микроорганизмов. Они входят в состав ряда ферментов, участвующих в процессах метаболизма.

Названные элементы обладают высокой каталитической активностью в процессах внутриклеточного обмена, которая возрастает в тысячи и миллионы раз в тех случаях, когда ионы металлов соединяются с молекулами органических веществ и образуют так называемые органоминеральные комплексы. Эти внутрикомплексные металлорганические соединения (хелаты) участвуют в реакциях фермент—субстрат.

У микроорганизмов в образовании хелатов активное участие принимают дикарбоновые аминокислоты и белки.

Железо. Ионы железа в жизнедеятельности микроорганизмов выполняют главным образом каталитическую функцию. Железо входит в состав ферментов — активаторов кислорода, среди которых первое место занимает система цитохромов. Недостаток или избыток железа в среде приводит к нарушению тех или иных сторон метаболизма.

Между железом и марганцем существует конкуренция за положение в геме железосодержащих ферментов.

Наряду с другими металлами железа, входя в состав окислительно-восстановительных ферментов, играет большую роль в окислительно-восстановительных процессах.

Ионы железа имеются в некоторых антибиотических веществах. Так, продуцент альбомуцина *S. subtropicus* образует антибиотик при значительной концентрации железа в среде, железо также включено в молекулу этого антибиотика.

Железо необходимо для образования хлорамфеникола и других антибиотиков, кроме того, оно участвует в биосинтезе стрептомицина. Наряду с ионами никеля и цинка ионы железа подавляют активность фермента маннозидострептомициназы, способствующего в процессе развития стрептомицета превращению малоактивного маннозидострептомицина в стрептомицин.

Однако ионы железа угнетающе действуют на биосинтез хлортетрациклина вследствие образования комплекса (Fe-антибиотик), который вступает в связь с клетками мицелия стрептомицета.

Влияние железа на биосинтез тетрациклина культурой *S. aureofaciens* зависит как от концентрации этого элемента в среде и ее состава, так и от особенностей штамма. Концентрация железа, равная 25–35 мкг/мл, в течение всего процесса развития стрептомицета не меняется. Добавление к среде магния стимулирует образование тетрациклина, а микроэлементы бор, кобальт, литий, цинк, молибден, вольфрам, алюминий, олово угнетают биосинтез этого антибиотика.

Есть данные о том, что железо и медь подавляют процесс спорообразования у бактерий.

Медь. Наряду с железом существенную роль в метаболизме микроорганизмов играет медь. В сочетании со специфическими белками она образует ряд ферментных систем. Представителями этой группы ферментов являются полифенолоксидазы и аскарбиноксидазы, нитратредуктаза, альдегидоксидаза и др. Недостаток меди резко снижает активность названных ферментов.

Установлено, что в процессе биосинтеза некоторых антибиотиков ионы железа и меди иногда выступают как антагонисты. Известно, что ионы железа необходимы для биосинтеза пенициллина. Однако добавление меди (CuSO_4) к среде тормозит процесс образования антибиотика, но не оказывает влияния на рост гриба.

Внесение в среду железа [$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$] снимает вредное для биосинтеза пенициллина действие меди.

Цинк. Как и другие элементы минерального питания, цинк играет важную роль в биохимической деятельности микроорганизмов. Он участвует в построении некоторых ферментных систем

(фосфатаз, энлаз, полипептидаз). Известно, что ионы цинка оказывают влияние на углеводный, азотный и фосфорный обмен ряда организмов и участвуют в окислительно-восстановительных процессах.

Ионы цинка играют каталитическую роль в РНК-полимеразах микроорганизмов. Поэтому при недостатке ионов цинка в среде может нарушаться функция иРНК при синтезе белков, в том числе ферментных систем. А это, в свою очередь, приводит к изменению синтеза антибиотиков.

Цинк влияет на процесс накопления грибами органических кислот, в частности лимонной кислоты. Этот элемент способствует биосинтезу ряда антибиотических веществ (хлорамфеникола, стрептомицина, пенициллина и др.). Например, недостаток цинка в среде для развития продуцента стрептомицина приводит к значительному замедлению роста стрептомицета. Отсутствие в среде ионов цинка резко снижает образование неомицина.

Марганец. Этот элемент — составная часть многих ферментных систем, и в первую очередь карбоксилаз. По-видимому, он принимает участие в синтезе протеиназ. Марганец входит также в состав фосфорилаз, которые участвуют в переносе фосфорной кислоты от аденозинтрифосфата.

Установлено, что марганец способствует сохранению внутриклеточных энзимов, участвующих в образовании спор некоторыми аэробными бактериями, т.е. стимулирует спорообразование у бактерий.

Кобальт. Определенное влияние на различные стороны метаболизма микроорганизмов, в том числе на процессы биосинтеза некоторых антибиотиков, оказывает кобальт. Установлено, например, что ионы кобальта повышают биосинтез гентамицина, курамицина А (антибиотик вырабатывается культурой *Streptomyces curacoii*, активен в отношении грамположительных бактерий), фосфономицина.

Ионы кобальта у продуцента гентамицина активируют Со-зависимые метилазы, участвующие в биогенезе молекулы антибиотика.

Минимальная концентрация $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, обеспечивающая максимальное образование гентамицина культурой *Micromonospora purpurea* var. *violacea*, равна 0,8 мкг/мл. Недостаток кобальта в среде снижает процесс образования антибиотика, а его избыток подавляет биосинтез гентамицина.

Роль галогенов в образовании антибиотиков

Хлор, бром. Ионы хлора и брома принимают непосредственное участие в образовании ряда антибиотиков. Они, и прежде всего хлор, входят в состав многих антибиотических веществ,

образуемых стрептомицетами и грибами. К числу хлорсодержащих антибиотиков относятся хлортетрациклин, хлорамфеникол, хлоркарцин (выделен из *Streptomyces lavendulae*), хлорбиоцин (продуцируется *S. hydroscopicus*, по химическому строению близок новобиоцину), хлортрицин (продуцентом которого является *S. antibioticus*), аскохлорин (изолирован из паразитарного гриба *Ascochyta viciae*), хлормикоризин (образуемый микоризным грибом, развивающимся на корнях подъельника *Monotropa hypopithys*) и др.

Ионы брома, присутствующие в среде, могут ингибировать биологическое хлорирование молекул антибиотиков при биосинтезе хлортетрациклина и наряду с этим соединением образовывать тетрациклин, не содержащий иона хлора. А при повышенной концентрации ионов брома последний занимает место хлора, образуя антибиотик бромтетрациклин. Аналогичный процесс происходит при развитии продуцента хлортрицина в среде, содержащей бромиды. В этом случае происходит формирование бромтрицина.

* * *

Приведенные данные показывают, что специфика отдельных компонентов субстрата и их количественные соотношения имеют существенное значение для развития микроорганизмов и биосинтеза ими антибиотических веществ. Но наряду с качественной и количественной характеристиками отдельных компонентов среды важную роль в жизнедеятельности микроорганизмов играют активная кислотность (рН) среды, окислительно-восстановительный потенциал, температура и аэрация субстрата.

ВЛИЯНИЕ рН СРЕДЫ

Активная кислотность (рН) среды существенно влияет на развитие микроорганизмов, на характер их обмена и, следовательно, на процесс образования антибиотиков. Это может быть как непосредственное влияние ионов водорода или гидроксильных ионов на клетку, так и косвенное воздействие через изменение степени диссоциации веществ субстрата. Изменения рН среды заметно сказываются на активности ферментов микроорганизмов, состоянии промежуточных продуктов, их диссоциации, растворимости и т.д. Таким образом, изменение активной кислотности среды значительно воздействует на выход конечных продуктов метаболизма микроорганизмов.

Перед посевом микроорганизма необходимо в первую очередь проверить значение рН среды.

Многие бактериальные организмы, образующие антибиотики, лучше развиваются при нейтральном значении исходной активной кислотности среды, т.е. при рН около 7,0, а некоторые бактерии, например молочнокислые лактококки, синтезирующие низин, — при рН 5,5–6,0.

Большинство стрептомицетов-антагонистов хорошо развивается при начальных значениях рН среды в пределах от 6,7 до 7,8. В подавляющем большинстве случаев жизнеспособность стрептомицетов при рН ниже 4,5–4 подавлена.

В последние годы выделены ацидофильные стрептомицеты, оптимум развития которых лежит в пределах рН 3,5–6,5. Грибы, как правило, могут развиваться при слабокислой начальной реакции среды (рН 4,5–5).

В ходе развития организмов рН среды не остается постоянным, а зависит как от состава субстрата, так и от физиологических особенностей самого организма. Иногда можно заранее сказать, в какую сторону будет изменяться рН субстрата при развитии на нем того или иного микроорганизма. Так, если в среде в качестве единственного источника азота присутствует сернокислый аммоний и отсутствуют в достаточном количестве ионы кальция, то при развитии любых организмов, использующих азот аммония, будет идти довольно сильное подкисление субстрата. И наоборот, если в среде в качестве единственного источника азота имеется, например, KNO_3 , то при использовании азота этого соединения субстрат будет подщелачиваться. Среда, как правило, будет подщелачиваться и в том случае, если организм в качестве источников углерода активно использует соли органических кислот.

Необходимо подчеркнуть, что и сильное подкисление, и значительное подщелачивание субстрата могут приостановить развитие организма, прекратить процесс образования антибиотика. Следовательно, составлять среды надо с таким расчетом, чтобы при развитии организмов в них рН среды по возможности остался в пределах нормы, необходимой для развития микроба и биосинтеза антибиотического вещества.

ТЕМПЕРАТУРА

Нормальное развитие микроорганизмов и образование ими антибиотических веществ происходит при определенной температуре.

Для разных групп микроорганизмов оптимальные температуры неодинаковы. Температурный оптимум развития большинства бактерий лежит в границах 30–37 °С. Продуцент грамицидина *S. B. bacillus* лучше растет и образует антибиотик при 40 °С. Хотя

тот же организм нормально развивается и синтезирует антибиотик и при температуре 28 °С, максимум накопления грамицидина при этом запаздывает примерно на 24 ч. Стрептомицеты — продуценты антибиотиков, как правило, культивируются при температуре 26–30 °С, хотя некоторые виды стрептомицетов могут развиваться как при пониженных температурах (от 0 до 18 °С), так и при повышенных (55–60 °С). Для большинства мицелиальных грибов оптимальная температура составляет 25–28 °С. У термофильных микроорганизмов температурный оптимум лежит в пределах 50–65 °С.

Отклонение температуры развития в ту или другую сторону обычно вызывает замедление роста микроорганизма и снижение выхода антибиотика. Обусловлено это тем, что температура существенно влияет на активность ферментов продуцентов антибиотиков, активность транспортных систем и на другие важные физиолого-биохимические функции микробной клетки.

Изменение температуры культивирования бактерий приводит либо к нарушению включения жирных кислот в мембрану, либо к отклонению соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. В конечном счете все это приводит к сдвигам в регуляции ферментативной активности.

Под влиянием температуры может изменяться и состав клеточных стенок, связанный с отклонением в структуре миколовых кислот.

Так, транспорт нейтральных аминокислот в клетки стрептомицетов осуществляется стереоспецифической транспортной системой, единой для всех этих аминокислот. Поступление в клетки стрептомицета L-валина — основного компонента биосинтеза остатков N-метил-L-валина и D-валина в полипептидных цепях актиномицинов — происходит с помощью системы активного транспорта. Активность этой системы заметно зависит от температуры: максимум ее проявляется в пределах 18–23 °С.

АЭРАЦИЯ

Аэрация — один из существенных факторов культивирования, определяющих характер развития микроорганизмов и их биосинтетическую активность.

Большинство продуцентов антибиотиков — аэробы, а поэтому для их оптимального развития необходима аэрация среды. Изменение степени аэрации влияет на окислительно-восстановительные условия, которые заметно воздействуют на процессы обмена веществ у микроорганизмов, в том числе и процессы, связанные с образованием антибиотиков. Известны антибиотики (бактериоцины), вырабатываемые отдельными видами анаэробных бактерий.

Аэрирование культур осуществляется в основном тремя способами: 1) продуванием определенного объема воздуха через культуральную жидкость с одновременным ее перемешиванием или без него; 2) встряхиванием культуральной жидкости, находящейся в колбах, на специальных аппаратах (качалки, шюттель-аппараты) и 3) выращиванием микроорганизмов в виде пленки на поверхности питательной среды. Наиболее совершенным методом аэрации следует признать первый способ, при котором уровень аэрации культуры можно учитывать количественно.

Существует два понятия, связанные с уровнем аэрации культуры: *степень аэрации* и *интенсивность аэрации*.

Степенью аэрации культуры, равной единице, является такая аэрация, при которой через определенный объем среды за 1 мин продувается такой же объем воздуха. Иными словами, степень аэрации равна единице, если через 100 л культуральной среды пропускается за 1 мин 100 л воздуха. Если степень аэрации равна 0,5, то это означает, что через 100 л культуральной жидкости пропускается в 1 мин 50 л воздуха:

$$\text{степень аэрации} = \frac{\text{объем воздуха, л}}{\text{объем среды, л}} \text{ в 1 мин.}$$

Установлено, что если степень аэрации близка к единице, то происходит максимальное накопление ряда антибиотиков (пенициллин, стрептомицин и др.). Уменьшение степени аэрации среды или ее чрезмерное увеличение приводит к уменьшению выхода антибиотика.

Степень аэрации существенно влияет на биосинтез грамицидина С культурой *B. bacillus* subsp. G. В. при глубинном культивировании (табл. 11).

Следовательно, наилучшей в данных условиях опыта будет степень аэрации, равная 0,8. При этом отмечаются хороший

Таблица 11

Влияние аэрации на биосинтез грамицидина С при продувании стерильного атмосферного воздуха через среду для культивирования и перемешивании магнитной мешалкой

(по Коршунову, 1962)

Степень аэрации среды	Концентрация антибиотика, мкг/мл			Сухая биомасса, мг на 100 мл среды			рН среды		
	Время культивирования, ч								
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
0,8	1600	1600	1500	650	600	550	6,0	5,8	5,6
1,0	500	500	450	300	300	250	6,0	5,5	6,9
1,5	250	200	200	200	200	180	7,1	6,0	5,8

рост бактерий и высокий уровень образования грамицидина (до 1600 мкг/мл). С увеличением степени аэрации до 1,0 и 1,5 наблюдается значительное снижение роста бактерий и уменьшение биосинтеза антибиотика.

Интенсивность аэрации определяется скоростью вступления в реакцию кислорода, растворенного в единице объема среды. Для количественных результатов определения растворенного в среде кислорода часто используют специальные датчики. Наиболее удобны платиновые электроды, защищенные от окружающей среды газопроницаемой пленкой.

Применение сульфитного метода для определения интенсивности аэрации позволяет получить лишь сравнительную оценку, но не дает данных по количественному содержанию кислорода в субстрате.

Насыщение культуральной среды кислородом зависит не только от количества воздуха, пропускаемого через единицу объема среды, но и от способа перемешивания, скорости работы мешалок, состава среды и концентрации растворенных в ней веществ (табл. 12), а также от температуры культивирования.

Таблица 12

Влияние концентрации растворенных в среде веществ на скорость растворения кислорода

(по Гринюк, Бинбернз, 1960)

Растворенное вещество	Концентрация растворенных веществ, %	Максимальная скорость растворения кислорода, мг/(л · мин)
Вода	—	13,5
Глюкоза	2,00	10,0
»	20,00	6,3
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,35	10,3
»	0,50	8,3
NaCl	0,20	11,0
»	2,00	10,1

Для большего насыщения жидкости кислородом воздуха используются барботеры и различные типы мешалок. Через барботеры воздух проходит одной или несколькими тонкими струями и под действием мешалки (обычно скорость вращения мешалки 200–400 об/мин) распыляется, что создает условия для большего насыщения среды кислородом. Чем выше скорость вращения мешалки, тем значительнее насыщение культуральной жидкости кислородом воздуха.

Перемешивание культуральной жидкости способствует равномерному распределению питательных веществ и перемещению

их к клеткам микроорганизма. Перемешивание обеспечивает также удаление с поверхности клеток продуктов обмена и лизиса клеток, более равномерное распределение кислорода в культуральной жидкости. Все это улучшает условия развития микроорганизмов и повышает их активность, связанную с биосинтезом антибиотиков.

При культивировании микроорганизмов в колбах на качалках аэрация среды зависит от числа оборотов качалки в минуту и объема культуральной жидкости: чем меньше объем среды в колбе, тем выше ее аэрация. Поглощение кислорода средой увеличивается, если вместо обычных конических колб применяются колбы с отбойниками (табл. 13).

Таблица 13

Интенсивность аэрации в зависимости от объема среды и типа колб

Условия культивирования	Тип колб	Объем среды, мл	Поглощение O ₂ раствором сульфата, мг/(л·ч)
На качалках 190–200 об/мин	Обычные на 750 мл	200	340
		100	670
		50	1220
То же	С четырьмя отбойниками	150	1920
		100	2930
		50	4280
Стационарные	Обычные на 750 мл	100	90

Аэрацию микроорганизмов, выращиваемых в виде пленки на поверхности жидкой среды, можно регулировать изменением площади развития организма и толщины слоя жидкости. С увеличением площади развития и уменьшением слоя жидкости аэрация культуры будет большей.

Интенсивность аэрации зависит от объема среды, условий перемешивания культуральной жидкости и температуры. Данные табл. 14 показывают, что растворимость кислорода в среде зависит от температуры культивирования микроорганизмов: с повышением температуры растворимость кислорода уменьшается. Интенсивность аэрации существенно зависит от объема среды (с увеличением объема среды интенсивность аэрации уменьшается) и условий перемешивания (повышение числа оборотов качалки способствует увеличению интенсивности аэрации).

Так, при периодическом культивировании продуцента цефалоспоринов *Acetmonium chrysogenum* концентрация растворенного кислорода в культуральной жидкости падает от 100 до 40% к 30-му ч

Влияние температуры и степени перемешивания среды для культивирования на интенсивность аэрации
(по Егоровой, 1967)

Температура, °С	Условия культивирования	Количество растворенного кислорода, мг/л		Интенсивность аэрации, выраженная скоростью окисления раствора сульфита, мг O ₂ /(л·ч)	
		Объем среды, мл			
		20	45	20	45
30	Стационарные	8,82	8,66	500	400
	При качании, об/мин				
	160	8,82	8,82	920	700
	200	8,66	8,66	1300	1200
	280	8,82	8,82	2000	1400
35	Стационарные	7,02	6,86	690	580
	При качании 280 об/мин	7,02	7,02	2460	1800
40	Стационарные	6,04	6,04	900	800
	При качании 280 об/мин	6,04	6,20	2900	2100
55	Стационарные	5,22	5,06	1200	1100
	При качании 270 об/мин	5,22	5,22	3170	2400

инкубации. Путем изменения скорости перемешивания среды концентрацию растворенного кислорода можно поддерживать на уровне, равном 40%, обеспечивающем более высокую удельную скорость синтеза антибиотика. При высокой концентрации растворенного кислорода на синтез цефалоспоринона С эффективнее используется сахар.

Таким образом, с повышением температуры (при этом возрастает скорость вступления кислорода в реакцию) и усилением перемешивания среды в условиях глубинного культивирования микроорганизмов интенсивность аэрации среды резко возрастает.

Интенсивность аэрации культуры продуцента того или иного антибиотика должна коррелировать с составом среды. С увеличением концентрации компонентов среды для развития продуцентов ряда антибиотиков (пенициллина, стрептомицина, новобицина, хлортетрациклина, окситетрациклина и др.) интенсивность аэрации культуры необходимо повышать.

Условия аэрации приводят к изменению процесса обеспечения продуцента антибиотика кислородом, удалению из среды CO₂ и других летучих продуктов метаболизма, что влияет на характер обмена веществ организма. Так, в условиях ухудшения аэрации среды для развития *S. aureofaciens* в культуральной жидкости

повышается содержание летучих органических кислот и снижается биосинтез тетрациклина.

В процессе развития продуцента антибиотика в промышленных условиях потребность организма в кислороде меняется в зависимости от стадии развития, вязкости культуральной жидкости и других факторов. При периодическом способе культивирования в период первой фазы, когда интенсивно накапливается биомасса продуцента, и в результате недостаточной степени подачи воздуха, неоптимального перемешивания и других технологических ограничений могут возникнуть ситуации, связанные с кислородным голоданием продуцента антибиотика. В этих условиях необходимо принимать дополнительные, иногда нетрадиционные меры обеспечения культуры кислородом. К таким мерам можно отнести обогащение продуваемого воздуха кислородом, добавление определенных концентраций пероксида водорода (H_2O_2).

Вмешиваясь в процесс развития продуцентов антибиотиков путем изменения условий их культивирования, добиваются более высокого уровня биосинтеза этих биологически активных веществ.

При изменении условий культивирования происходит адаптивный ответ организма через процесс включения или выключения соответствующих генов. Если изменившиеся условия активируют включение генов, контролирующих биосинтез антибиотика, произойдет повышение его выхода.

Однако необходимо иметь в виду, что у высокопродуктивных штаммов микроорганизмов может иметь место ретроингибирование, или ингибирование биосинтеза антибиотика по принципу обратной связи. Это явление может быть связано с ингибированием одного из ферментов начальной стадии биосинтеза молекулы антибиотика или же с подавлением образования иРНК для вполне определенного фермента.

В процессе образования ряда антибиотиков (аминогликозидов, тетрациклинов, полипептидов, бета-лактамов и др.) может наблюдаться ингибирование их биосинтеза глюкозой, присутствующей в среде, в результате катаболитной репрессии одного или нескольких ферментов, участвующих в образовании антибиотика. Некоторые ферменты могут подвергаться катаболитной репрессии под влиянием ионов аммония или некоторых аминокислот. Такие процессы возможны при биосинтезе стрептомицина, рифамицина, эритромицина, клавулановой кислоты и некоторых других антибиотиков.

Вместе с тем антибиотическая активность у ряда штаммов микроорганизмов, не проявивших ее в обычных условиях культивирования,

может быть выявлена в результате активации так называемых молчащих генов при обработке штаммов соответствующими мутагенами. При обработке неактивных штаммов мутагенами возникают мутанты, у которых может происходить экспрессия молчащих генов, регулирующих биосинтез антибиотиков.

Указанные процессы следует иметь в виду при выделении активных штаммов микроорганизмов.

Таким образом, только при учете всех особенностей культивирования организма и при изучении влияния различных компонентов субстрата, физико-химических и физических факторов среды можно определить способность микроорганизма образовывать антибиотическое вещество. Создавая организму разнообразные условия культивирования, тем самым выясняют, какие из них наиболее благоприятны для выявления потенциальных возможностей биосинтеза антибиотиков.

Совместное культивирование микроорганизмов и его роль в биосинтезе антибиотиков

Со времени исследований Р. Коха (1843–1910) и до настоящих дней микробиология базируется на одном из основных принципов — работе с чистыми культурами микроорганизмов. Благодаря этому принципу решены многие крупные теоретические и практические проблемы. Вместе с тем современная микробиология, в первую очередь промышленная, накопила много примеров, показывающих, что процесс получения того или иного продукта жизнедеятельности или разложение ряда сложных веществ, в том числе и искусственно синтезированных полимеров, активнее идет в смешанных культурах, т.е. при совместном развитии нескольких (чаще двух) видов микроорганизмов.

Проявление антимикробных свойств у отдельных видов бактерий при их совместном культивировании с другими организмами было обнаружено в начале XX в. Так, В. Фрост еще в 1904 г. показал, что смешанные культуры *Pseud. fluorescens* проявляют наиболее заметное антагонистическое действие в отношении ряда тест-микробов по сравнению с чистыми культурами.

При изучении антагонистов сибиреязвенного микроба установлено, что смешанная культура стафилококка и стрептококка — антагонист изучаемого микроба. Некоторые актиномицеты способны проявлять антагонизм к грамположительным бактериям только в смешанных культурах.

Все больший интерес вызывает проблема совместного культивирования микроорганизмов в целях повышения продуцирования

ряда биологически активных веществ (витаминов, ферментов) и для более эффективной микробиологической трансформации некоторых органических соединений.

Интенсифицировать антибиотикообразование кроме известных приемов (получение мутантных штаммов с повышенным синтезом антибиотика, подбор соответствующих сред для культивирования, улучшение технологического процесса развития продуцента) можно путем совместного культивирования продуцента антибиотика с другими специально подобранными видами микроорганизмов. Смешанная культура термофильных *Lactococcus* и *Lactobacillus*, составляющих микрофлору йогурта (кислого молока), обладает бóльшим антибиотическим действием, чем каждый из этих микроорганизмов в отдельности.

Впервые метод совместного культивирования *Trichothecium roseum* и *Penicillium* для увеличения продуцирования трихотецина в промышленных условиях разработан и предложен в 1959 г. венгерскими учеными (В. Johan, А. Szabo, Е. Ketesztesy). Было замечено, что штаммы продуцента трихотецина наибольшую биологическую активность проявляют при совместном развитии с мицелиальными грибами рода *Penicillium*. Культивируя продуцент трихотецина *T. roseum* вместе с *P. sp.*, удается повысить выход антибиотика в несколько раз. Наибольший эффект наблюдается в том случае, если к 24-часовой культуре *T. roseum* добавить 2–10% односуточного мицелия *P. sp.*

Убитый мицелий пеницилла или его культуральная жидкость, отделенная от мицелия, не способны стимулировать образование трихотецина. Эффект стимуляции наблюдается только в условиях совместного выращивания грибов двух видов. Следовательно, продукция трихотецина в смешанной культуре увеличивается в результате определенных антагонистических взаимоотношений между продуцентом антибиотика и *P. sp.*

Аналогичные результаты были получены в лаборатории антибиотиков МГУ. Выделен штамм *P. chrysogenum*, стимулирующий образование трихотецина. При подсеве к 36–48-часовой культуре *T. roseum* 5–7,5% (по объему) *P. chrysogenum* в возрасте 48 ч образование трихотецина увеличивается на 170%.

Описан и запатентован способ получения антибиотического вещества, образуемого *Aspergillus flavus* при культивировании гриба совместно с *Mycobacterium tuberculosis*.

Значительно увеличивается антибиотическая активность *Streptomyces sp.* при выращивании его вместе с *Corynebacterium equi*. Увеличение образования бацитрацина наблюдается в том случае, если продуцент антибиотика *B. subtilis* культивируется совместно с *Pseudomonas sp.*

Повышение биосинтеза леворина культурой *S. levoris* наблюдается при совместном культивировании стрептомицета с дрожжеподобным грибом *Candida tropicalis*. При этом установлено, что стимулирующе действуют на биосинтез антибиотика органические кислоты, и в первую очередь янтарная кислота.

Совместное культивирование продуцента микогептина *S. muscohepticum* (штамм 44 в/1) с различными микроорганизмами (изучено 50 культур) показало, что характер взаимоотношений между ними может быть разным: 60% изученных микроорганизмов полностью подавляли развитие продуцента микогептина, 30% — резко снижали его антибиотическую активность и лишь 10% — стимулировали (на 15–20%) образование антибиотика. К числу последних относились *Schizosacchromyces romys*, *Rhodotorula muciliginosum*, *Candida tropicalis*, *Monilia nivea*.

Механизм биосинтеза микроорганизмами биологически активных соединений, в том числе антибиотиков, изучается разными методами. В последние годы нередко используют метод сравнительного анализа путей метаболизма продуцентов антибиотических веществ и соответствующих им мутантов. В качестве мутантов применяют штаммы, у которых биосинтез антибиотика нарушен в разных звеньях цепи реакций, связанных с образованием изучаемого соединения (такие мутанты часто синтезируют не полностью завершенные молекулы этих веществ), или мутанты, не способные вырабатывать соответствующие биологически активные вещества. Методом сравнительного анализа получены интересные результаты при изучении биосинтеза таких антибиотиков, как тетрациклин, новобиоцин, хлортетрациклин, нистатин, пенициллин, окситетрациклин, стрептомицин и др.

Использование метода совместного культивирования двух мутантных штаммов продуцента окситетрациклина *S. rimosus*, потерявших способность вырабатывать антибиотик, показало, что «белые» мутанты в процессе развития выделяют в среду какое-то вещество или вещества, позволяющие «черному» мутанту осуществлять биосинтез окситетрациклина. Таким образом, совместное культивирование этих мутантов стрептомицета или добавление культуральной жидкости, освобожденной от мицелия «белого» мутанта, к культуре «черного» способствует образованию последним окситетрациклина.

При совместном культивировании двух мутантных штаммов продуцента стрептомицина, один из которых не вырабатывал антибиотик, а другой синтезировал его в небольшом количестве (см. с. 237–238), происходит биосинтез стрептомицина в том же количестве, что и при развитии исходного высокопродуктивного штамма *S. griseus*.

Аналогичные результаты получены при совместном выращивании двух мутантов *S. noursei*, потерявших способность к биосинтезу нистатина (табл. 15).

Таблица 15

Образование нистатина при совместном выращивании двух неактивных штаммов *Streptomyces noursei* (4-е сут)
(по Тороповой, Побединскому, Егорову, 1976)

Штамм стрептомицета	Образование нистатина	
	в культуральной жидкости, ед./мл	в мицелии, ед./мг
№ 149	0	0
№ 368	0	0
№ 149 + № 368	310	100
Исходный штамм стрептомицета (контроль)	350	80

Совместное культивирование двух неактивных штаммов (№ 149 и 368) обеспечивает образование нистатина в том же количестве, что и при развитии исходного активного штамма *S. noursei*.

При лабораторном хранении стрептомицетов-антагонистов, выделенных из естественных субстратов, довольно часто наблюдается значительное снижение антибиотической активности или ее полная потеря. Совместное культивирование штаммов стрептомицетов, неактивных в обычных условиях культивирования, с некоторыми грибами из рода *Penicillium* либо с почвенными бактериями восстанавливает способность к продуцированию антибиотика или же стимулирует выделение антибиотика теми штаммами, которые его не образовывали. При выделении бактерий и стрептомицетов из почвенного образца и выяснении влияния этих бактерий на изученные штаммы стрептомицетов показано, что эти бактерии могут влиять на антибиотическую активность стрептомицетов. Некоторые штаммы бактерий значительно повышают ее или способствуют образованию антибиотического вещества у стрептомицетов, которые в обычных условиях культивирования его не обнаруживают.

Изучение причин стимуляции образования антибиотиков штаммом *S. coelicolor* под влиянием жизнедеятельности бактерий *B. rusticus* и фракций культуральной жидкости показало, что стимуляция связана с фракцией летучих кислот (табл. 16).

Таким образом, в этом исследовании установлено, что для биосинтеза антибиотического вещества, образуемого малоактивным штаммом *S. coelicolor*, необходимы некоторые летучие органические кислоты, которые вырабатываются в процессе развития

Влияние различных фракций культуральной жидкости *Bacillus rusticus* (штамм 22) на образование антибиотика культурой *Streptomyces coelicolor* (антибиотическая активность в единицах разведения) и рост продуцента (по Егорову и др., 1960)

Вариант опыта	Количество добавленного фильтрата, %					
	1	5	1	5	1	5
	Антибиотическая активность, ед. разв.				Рост стрептомицета	
	через 5 сут		через 8 сут			
Синтетическая среда	0	0	0	0	Хороший	Хороший
То же + МПБ	18	0	18	0	Очень хороший	Слабый
« + односуточный фильтрат	162	54	54	18	То же	Хороший
« + летучие вещества, отогнанные при рН 7,0	0	0	0	0	Слабый	Очень слабый
« + соли летучих кислот	162	162	54	162	Очень хороший	Очень хороший
« + остаток от отгона	0	0	0	0	Слабый	Слабый
« + соли летучих кислот + остаток от отгона	54	18	18	0	Хороший	Хороший

B. rusticus. Следовательно, штаммы микроорганизмов с различными типами обмена веществ в смешанной культуре влияют друг на друга.

Приведенные примеры показывают, что совместным культивированием специально подобранных организмов можно создать такие условия, при которых значительно увеличивается образование антибиотиков продуцирующими организмами или же антибиотическая активность проявляется у штаммов, не способных в обычных условиях вырабатывать эти вещества.

Активация ряда биохимических процессов, наблюдаемая в смешанных культурах микроорганизмов, может происходить в результате разных причин. Один из основных факторов влияния организмов друг на друга при совместном выращивании — образование и выделение в окружающую среду определенных продуктов жизнедеятельности. Эти продукты обмена (у разных организмов различные) образуются и выделяются в среду или в ходе развития микроорганизма, или на определенных этапах его жизнедеятельности.

Влияние одного микроорганизма на другой в смешанных культурах осуществляется по-разному. Во-первых, образовавшиеся

продукты обмена одного организма могут быть использованы другим организмом в качестве источника азота, углерода либо иного компонента или же в качестве предшественника биосинтеза какого-то соединения. Во-вторых, в смешанных культурах ферментативная реакция, осуществляемая одним из микроорганизмов, может служить естественным продолжением энзиматической реакции, свойственной другому компоненту смешанной культуры. В-третьих, в ассоциативной культуре один из организмов может образовывать стимуляторы роста для другого микроорганизма. В-четвертых, в смешанной культуре одним из компонентов ассоциации могут продуцироваться вещества (ферменты), изменяющие состав и свойства продукта (продуктов) обмена другого организма, т.е. осуществляющие биологическую трансформацию. В-пятых, образующиеся продукты жизнедеятельности одного из компонентов бинарной ассоциации (как правило, организма, не вырабатывающего нужный для практики продукт) несколько притормаживают развитие продуцента, который в ответ на это начинает активнее синтезировать и выделять в окружающую среду соответствующие ферменты.

Ответом на проявление определенных антагонистических взаимоотношений одним из компонентов смешанной культуры служит повышение биосинтеза антибиотического вещества (например, при совместном выращивании продуцента трихотецина *T. roseum* с определенными видами *Penicillium*).

В смешанной культуре один из компонентов может активировать молчащие гены, ответственные за биосинтез антибиотика, у другого организма и таким образом вызвать продуцирование антибиотика у неактивных штаммов микроорганизмов.

Наконец, при совместном культивировании различных микробов могут возникать своеобразные гибриды этих организмов, обладающие иными свойствами по сравнению с исходными чистыми культурами.

При смешанной культуре существенное значение имеет не только подбор партнеров, но и их количественное соотношение в среде. Так, при совместном культивировании *Aspergillus oryzae* и *B. subtilis* выход протеиназ наибольший в том случае, если количество спор *A. oryzae* в ассоциации в два раза меньше числа клеток *B. subtilis*. А в смешанной культуре *B. subtilis* и *Pseudomonas* sp. 162 для получения большего выхода бацитрацина следует сформировать ассоциацию в отношении 1 : 100. Иными словами, на одну клетку *B. subtilis* следует вносить сто клеток *Pseudomonas* sp. Повышение продуцирования леворина примерно на 40–50% наблюдается в том случае, если к продуценту антибиотика *S. levoris* добавляют 1–4% предварительно выращенных в течение 48 ч дрожжеподобных организмов (*Candida*).

Следует учесть, что указанные факторы не имеют универсального характера. В каждом конкретном случае необходимо подбирать соответствующие организмы, устанавливать их соотношение и находить наиболее благоприятные условия культивирования.

Таким образом, в ряде микробиологических процессов замена чистых культур смесью организмов определенных видов может обеспечить наибольший выход нужных продуктов.

Образование антибиотиков иммобилизованными клетками микроорганизмов

Последние десятилетия XX в. характеризовались широким размахом работ по иммобилизации ферментов и использованием их в таком состоянии в качестве стабильных биокатализаторов при получении ряда очень ценных веществ (аминокислот, органических кислот, полусинтетических антибиотиков и др.). Направление биотехнологии с применением иммобилизованных ферментов получило название и н ж е н е р н о й э н з и м о л о г и и.

Наряду с иммобилизацией отдельных ферментов оказалось возможным иммобилизовать и живые клетки микроорганизмов, которые в этом состоянии способны относительно долго осуществлять характерные для них биохимические процессы. Свойство микроорганизмов функционировать в иммобилизованном состоянии присуще многим видам, находящимся в естественных местах их обитания: в почве, илах, водоемах.

Иммобилизация клеток микроорганизмов в лабораторных и производственных условиях осуществляется в основном тремя методами.

1. Физические методы основаны на факторах, связанных с действием электростатических сил и силы поверхностного натяжения. Наиболее характерный способ закрепления клеток — адсорбция их на определенном носителе.

2. Химические методы иммобилизации клеток базируются на использовании бифункциональных реагентов для прикрепления клеток к носителю либо на смешивании клеток между собой, в результате чего образуются бактериальные пленки или определенные конгломераты. При иммобилизации химическими методами используется способ ковалентного связывания клеток с силикагелем, активированным хлоридом хрома или титана; применяется метод закрепления клеток на желатиноподобном матриксе гидроокисей титана и циркония.

3. Механические методы иммобилизации основаны на включении микробных клеток в различные гели, мембраны.

При выборе метода иммобилизации клеток необходимо учитывать характер влияния применяемого способа на жизнедеятельность микроорганизмов.

Иммобилизованными клетками микроорганизмов можно осуществлять процесс биосинтеза ряда антибиотиков. Следует, однако, подчеркнуть, что эти процессы пока носят поисковый характер и в промышленных условиях еще не применяются.

Так, клетки *Lactococcus lactis*, иммобилизованные в полиакриламидном геле, способны к биосинтезу низина. При этом количество полученного антибиотика составляет не более 30% от того количества, которое образуется в обычной культуре стрептококка. Однако при иммобилизации клеток продуцента низина их способность к биосинтезу антибиотика сохраняется в течение 15–20 дней.

Клетки *Bacillus* sp., иммобилизованные в полиакриламидном геле, способны синтезировать бацитрацин, но в этих условиях период полужизни клеток бактерий продолжается не более 10 сут. Иммобилизованные клетки *Acremonium chrysogenum* могут образовывать цефалоспорин, клетки *S. griseus* — кандицидин, мицелий *P. chrysogenum* синтезирует пенициллин. При этом иммобилизованные (на производных целлюлозы) клетки продуцента пенициллина нормально развиваются и образуют антибиотик в полунепрерывных условиях в количестве, сопоставимом с уровнем пенициллина, образуемого в обычных условиях культивирования гриба.

Получены хорошие результаты по синтезу беталактамов при использовании иммобилизованных протопластов *P. chrysogenum*.

Таким образом, приведенные примеры показывают, что иммобилизованные клетки бактерий, стрептомицетов и мицелиальных грибов способны синтезировать соответствующие антибиотики. Главная задача предстоящих в этом направлении исследований — подбор метода иммобилизации клеток продуцентов антибиотиков, который позволял бы сохранить способность клеток продуцента синтезировать большие количества того или иного антибиотика длительное время, а также разработка новых конструкций аппаратов для этих целей.

Двухфазный характер развития продуцентов ряда антибиотиков

Еще в 1929 г. В.Н. Шапошников на примере ацетонобутилового брожения впервые показал, что многие бродильные процессы, осуществляемые бактериями, протекают в две фазы. В первой фазе брожения в связи с интенсивным размножением бактерий и

преобладанием конструктивных процессов, сопровождаемых активными окислительными реакциями, в субстрате накапливаются относительно окисленные продукты (уксусная, масляная кислоты). Во второй фазе в культуре замедляются конструктивные процессы, а освобождающийся водород направляется на восстановление образовавшихся в первую фазу окисленных промежуточных продуктов с биосинтезом относительно восстановленных продуктов (ацетон, бутиловый спирт). При этом во второй фазе наблюдается потребление организмом ряда веществ, образовавшихся в первой фазе развития.

Открытие двухфазности в процессах брожения имеет важное теоретическое и практическое значение. Результаты, полученные при изучении различных типов брожения в динамике развития бактерий, показали, что продукты жизнедеятельности микроорганизмов по ходу их развития претерпевают изменения как в качественном, так и в количественном отношении. На разных этапах развития соотношение продуктов обмена неодинаковое. Знание закономерностей микробиологического процесса позволяет вмешиваться в него на определенных этапах развития микроорганизмов и изменять течение процесса в направлении, нужном для эксперимента или для практики.

Основные закономерности двух фаз процессов брожения, открытые В.Н. Шапошниковым, характерны и для многих микроорганизмов, образующих антибиотики. Однако необходимо сразу же отметить, что двухфазный характер процессов развития микроорганизмов и образования ими антибиотических веществ имеет свои особенности.

Биосинтез многих антибиотиков осуществляется микроорганизмами на определенном этапе их развития. Эта закономерность характерна для большинства стрептомицетов, образующих ценные антибиотики — стрептомицин, хлортетрациклин, окситетрациклин, новобиоцин, эритромицин и др., и мицелиальных грибов (*Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus fumigatus* и др.).

В условиях глубинной культуры процесс развития организма и биосинтеза антибиотика проходит в две фазы (рис. 1).

В первой фазе развития продуцента, или, как ее иногда называют, **тропофазе** (фаза сбалансированного роста микроорганизма), наблюдается интенсивное накопление биомассы (образование белков, нуклеиновых кислот, углеводов, биосинтез ферментов и других соединений, принимающих участие в росте микроорганизма), связанное с быстрым потреблением основных компонентов субстрата (источники углерода, азота, фосфора и др.) и с высоким уровнем поглощения кислорода. Одновременно с быстрым потреблением углеводов образуются некоторые органические кислоты,

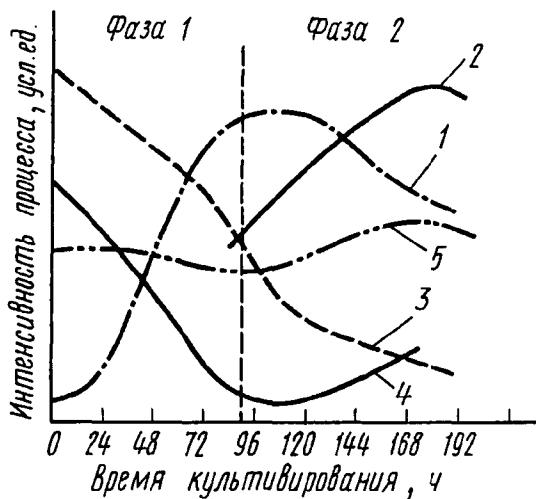


Рис. 1. Схема двухфазного процесса развития *Streptomyces griseus* и образования стрептомицина: 1 — образование биомассы стрептомицета, 2 — биосинтез стрептомицина, 3 — использование углеводов, 4 — потребление азота аммония, 5 — изменение рН среды

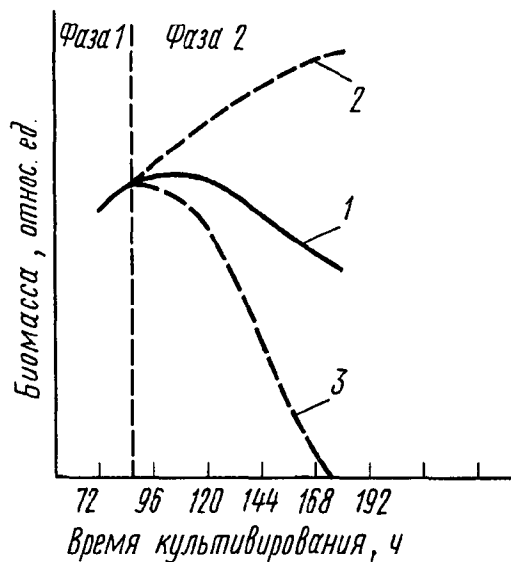


Рис. 2. Схема формирования биомассы стрептомицета во второй фазе развития: 1 — истинная биомасса стрептомицета, 2 — возможная биомасса стрептомицета при отсутствии автолиза мицелия, 3 — возможная биомасса стрептомицета при отсутствии роста стрептомицета

что иногда приводит к снижению рН субстрата. В этот период развития цитоплазма мицелия стрептомицетов содержит значительное количество рибонуклеиновой кислоты (РНК). Антибиотик, как правило, не образуется, а если антибиотическое вещество и обнаруживается, то в незначительном количестве. По-видимому, это связано с тем, что в фазе сбалансированного роста синтез ферментов и их функция, а также активность генов, кодирующих эти ферменты, участвующие в биосинтезе антибиотика, подавлены.

Во второй фазе развития, именуемой **идиофазой** (фаза несбалансированного роста микроорганизма), накопление биомассы замедлено или даже уменьшено. Это обусловлено тем, что основные компоненты среды использованы организмом, а среда обогатилась рядом продуктов жизнедеятельности. В культуре начинают преобладать протеолитические процессы, среда обогащается продуктами автолитического распада клеток, что приводит к ее подщелачиванию.

У стрептомицетов во второй фазе базифилия цитоплазмы отчетливо снижается, содержание РНК в мицелии падает. Базифилия ядерного вещества, наоборот, повышается, содержание ДНК в нем увеличивается.

Величина биомассы стрептомицета во второй фазе развития продуцента антибиотика представляет собой среднее арифметическое между теоретически возможной биомассой стрептомицета в случае отсутствия автолиза его мицелия и теоретически возможной биомассой при полном автолизе клеток микроорганизма (рис. 2).

Следовательно, в культуре наряду с автолизующимся мицелием развиваются гифы молодого мицелия стрептомицета. Эти развивающиеся клетки микроба находятся в совершенно иных условиях среды по сравнению с условиями, в которых они обитали в первой фазе. Отличие определяется тем, что в субстрате в этот период почти полностью отсутствуют многие исходные компоненты питания и среда во второй фазе сильно обогащена определенными продуктами жизнедеятельности организма и продуктами автолиза клеток. В идиофазе происходит дерепрессия ферментов, участвующих в процессе биосинтеза антибиотика.

Таким образом, в начале второй фазы (конец логарифмической фазы роста) наблюдается своеобразная биохимическая дифференциация обмена. В этот период, когда продукты метаболизма микроорганизма лишь частично используются на построение клеточного материала, они направляются на биосинтез антибиотика. Указанный процесс метаболизма начинает активироваться другими генами.

Все эти факторы, вместе взятые, и определяют условия, способствующие максимальному биосинтезу антибиотика.

У ряда стрептомицетов процесс образования антибиотика связан с развитием вторичного мицелия и его жизнедеятельностью в иных условиях среды, о которых говорилось выше.

Обычно максимум продукции антибиотика в среде наступает после максимума накопления биомассы. Этот максимум неодинаков у разных организмов и в разных условиях культивирования.

Отсутствие способности к синтезу пенициллина у молодого мицелия *P. chrysogenum* в первой фазе роста связано с разницей состава среды по сравнению со второй фазой, когда происходит биосинтез антибиотика. Отличие состоит в том, что в первой фазе развития гриба в среде присутствует легкоусвояемый источник углерода, вызывающий катаболитную репрессию ферментов, участвующих в биосинтезе антибиотика. К началу второй фазы развития эти источники углерода, как правило, полностью потребляются грибом.

Изучение закономерностей образования антибиотика культурой *S. violaceus* и возможностей регулирования процесса показали, что в этом случае антибиотик также продуцируется во второй фазе развития стрептомицета, т.е. в период исчерпания некоторых компонентов среды. Выяснение причин биосинтеза антибиотика во второй фазе в острых (краткосрочных) опытах показало, что образованию антибиотика способствует отсутствие азота в среде (табл. 17).

Способность разновозрастного мицелия образовывать антибиотическое вещество на средах с азотом и без азота в краткосрочных опытах

(по Шапошникову и др., 1959)

Возраст мицелия, ч	Продуктивность мицелия, ед./г·ч (условно)	
	на среде с азотом	на среде без азота
56	0	117
90	350	26 340
216	150	4025

Выяснение причин, способствующих выработке антибиотика во второй фазе развития микроба, позволило установить, что можно вмешиваться в эти процессы и направлять их в нужную сторону. Следовательно, можно сделать вывод, что биосинтез антибиотика культурой продуцента в большинстве случаев происходит в определенный период развития организма и при определенном состоянии субстрата, создаваемого самим микробом в первой фазе его развития. Этим определяется биологическая сущность двухфазного процесса развития микроорганизмов — продуцентов антибиотических веществ.

Необходимо подчеркнуть, что принцип двухфазности развития большинства микроорганизмов — продуцентов антибиотических веществ характерен для нормально развивающихся культур. Иными словами, эта закономерность имеет место при развитии микроорганизмов в условиях периодического культивирования в среде, которая в процессе роста продуцента антибиотика изменяется самим организмом, а не экспериментатором, и организм засеивается в субстрат не на стадии биосинтетической активности (40–96 ч), а спорами или молодыми (не более 20–24 ч) вегетативными клетками (мицелием). При засеиве среды большими объемами относительно старого по возрасту посевного материала (40 ч и более) эта двухфазность нарушается. При внесении больших объемов уже продуцирующего антибиотик мицелия и культуральной жидкости, обогащенной продуктами жизнедеятельности организма, естественно, трудно ожидать наступления первой фазы, так как она уже закончилась в процессе подготовки посевного материала.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие важнейшие условия необходимы для образования микроорганизмами антибиотических веществ?
2. Характеристика сред для культивирования микроорганизмов и их роль в образовании антибиотиков.

3. Роль источников углерода, азота и других компонентов сред в образовании антибиотиков.
4. Микроэлементы и их роль в образовании антибиотиков.
5. Влияние физических и физико-химических факторов на процесс образования антибиотиков.
6. Двухфазный характер развития микроорганизмов и процесс биосинтеза антибиотиков.
7. Какова роль совместного культивирования микроорганизмов в процессе биосинтеза антибиотиков? Приведите примеры.
8. Какова возможность образования антибиотиков иммобилизованными клетками?

Глава 5

ЗНАЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ОРГАНИЗМОВ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ЭТИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Общие положения

Изучение роли антибиотиков в жизнедеятельности организмов, их продуцирующих, имеет большое общебиологическое значение. Выяснение вопроса о взаимоотношении продуцента и образуемого им антибиотика может также помочь раскрыть некоторые стороны биосинтеза этих веществ и выяснить механизм их биологического действия.

Все чаще появляются сообщения, посвященные роли антибиотиков в жизнедеятельности организмов, образующих их. Это говорит о повышении интереса к названной проблеме.

При изучении процесса антибиотикообразования возникает ряд вопросов: оказывают ли антибиотики какое-либо влияние на собственные продуценты? выполняют ли эти вещества лишь защитные функции? и т.п.

Подход к оценке роли антибиотиков в жизнедеятельности организмов, их образующих, в первую очередь зависит от того, насколько правильно наше представление о самом явлении антибиотикообразования. Если придерживаться взгляда, что продуцирование антибиотиков есть удаление клеткой продуктов отхода (waste products), то представление о значении этих веществ для продуцентов будет иметь один аспект. Если же оценивать процесс образования антибиотиков как приспособительный, то их роль в жизнедеятельности организмов-продуцентов будет иметь другой смысл. Рассмотрим кратко обе точки зрения.

3. Ваксман и др. считают, что антибиотики образуются только при наличии в среде питательных веществ, благоприятных для данного процесса. Это положение само по себе совершенно правильно и подтверждается множеством фактов. Однако образование антибиотиков определяется этими авторами как побочный метаболизм, происходящий при патологических условиях, как прямой результат влияния ненормальных условий внешней среды. По их мнению, образование антибиотиков — не закрепленное эволюцией свойство организма, а фактор, проявляющийся только при развитии микроба в специфической среде. Исходя из этих положений, не подкрепленных экспериментально, Ваксман и его единомышленники отрицают всякую приспособительную или регуляторную роль антибиотиков для их продуцентов и не считают возможным признать, что антибиотики оказывают какое-либо влияние на организмы, их продуцирующие. Такой вывод о процессе антибиотикообразования нельзя признать правильным, он противоречит многим убедительным фактам.

Согласно другой теории, процесс биосинтеза антибиотиков является по своей сути фактором биологическим, имеющим определенное приспособительное значение. Способность к образованию антибиотиков появилась и закрепилась у организмов в результате их длительной эволюции. Биосинтез того или иного антибиотического вещества является наследственно закрепленной особенностью одного или нескольких видов (штаммов) организмов и регулируется особыми генами. Поэтому говорить о каких-то «патологических» условиях, при которых образуются антибиотики, совершенно безосновательно.

Исходя из второй, на наш взгляд единственно правильной, концепции о процессе образования антибиотиков, мы и рассмотрим более подробно их роль в жизнедеятельности организмов-продуцентов.

Большое разнообразие антибиотиков с точки зрения их химического строения и механизма биологического действия дает основание предполагать, что в числе приспособительных реакций у этих биологически активных веществ кроме защитной функции наблюдается влияние на отдельные звенья процесса метаболизма тех организмов, которые их синтезируют, через активацию или ингибирование ряда ферментных систем, выполняющих определенные регуляторные функции. При изучении названной проблемы обнаруживаются новые факторы взаимоотношения продуцента и вырабатываемого им вещества (антибиотика).

Известно, что в процессе жизнедеятельности организмов одни антибиотики (пенициллины, стрептомицин, тетрациклины и др.) в основном выделяются в среду, окружающую организм, другие

(например, кандицидин, ристомицин) выделяются в среду лишь частично, значительное же их количество находится в клетках продуцента; третья группа антибиотических веществ (грамидины, эндомицин, римоцидин и др.) почти целиком связана с клетками продуцентов и в окружающую среду при жизни организмов практически не выделяется. По-видимому, в указанных случаях роль антибиотика в жизнедеятельности организмов, их продуцирующих, неодинакова.

В процессе развития организмы приспособились к действию антибиотических веществ в тех концентрациях, в которых они их вырабатывают, но если концентрацию антибиотика в среде искусственно увеличить, то микроорганизм, образующий данный антибиотик, начинает реагировать на это. Так, некоторые стрептомицеты в присутствии определенных концентраций синтезируемых ими антибиотиков прекращают рост. По данным М. Дж. Тейлона (1953), стрептомицеты могут развиваться на средах, содержащих антибиотики, которые они образуют в концентрациях, не превышающих следующие значения (в мкг/мл):

<i>Streptomyces griseus</i>	5000	сернокислого стрептомицина
<i>S. lavendulae</i>	10 000	сернокислого стрептотрицина
<i>S. fradiae</i>	2500	сернокислого неомицина
<i>S. rimosus</i>	5000	солянокислого окситетрациклина
<i>S. aureofaciens</i>	2500	солянокислого хлортетрациклина
<i>S. venezuelae</i>	2500	солянокислого хлорамфеникола

Более высокие концентрации антибиотиков начинают угнетать развитие собственных продуцентов.

Существует определенная взаимосвязь между образованием антибиотика и устойчивостью к нему продуцента этого антибиотика. Высокопродуктивные штаммы аминогликозидов находят, как правило, среди стрептомицетов, проявивших более высокую устойчивость к этим антибиотикам.

Различные штаммы *S. griseus* отличаются друг от друга по чувствительности к стрептомицину. Штаммы, способные продуцировать более высокие концентрации антибиотика, выдерживают присутствие в среде больших количеств стрептомицина; менее активные штаммы при тех же концентрациях антибиотика в среде не будут расти, и совсем не развиваются штаммы, не образующие стрептомицин (табл. 18).

Это свойство стрептомицетов было использовано для селекции наиболее продуктивных по образованию антибиотика штаммов *S. griseus*, так как добавление к среде определенных концентраций стрептомицина способствует развитию наиболее активных штаммов стрептомицета.

Действие стрептомицина на активные и неактивные штаммы *Streptomyces griseus*
(по Гаузе, 1959)

Штамм стрептомицета	Образование стрептомицина	Рост в присутствии стрептомицина (50 мкг/мл) в среде*
3326	Не происходит	—
3378	»	—
3463	Происходит	+
3464	»	+

* Знак «—» — отсутствие роста, знак «+» — рост стрептомицета.

Организмы, продуцирующие антибиотики, устойчивы к их действию. Причем микроорганизмы, выделенные из природных источников («дикие» штаммы), имеющие невысокую биосинтетическую активность, резистентны к собственному антибиотику на уровне мембран. Высокопродуктивные мутанты микроорганизмов защищаются от антибиотиков, синтезируемых ими, в результате инактивации их ферментами или образования некоторых метаболитов (например, цистеина), инактивирующих собственные антибиотики, а также благодаря клеточным мембранам, препятствующим проникновению антибиотика в клетку, и генам устойчивости.

Итак, микроорганизмы — продуценты антибиотиков выработали определенные механизмы собственной защиты от этих мощных биологически активных соединений, которая у разных продуцентов осуществляется по-разному.

Основные механизмы защиты микроорганизмов от собственных антибиотиков

Во-первых, клетки микроорганизмов — продуцентов некоторых антибиотиков могут вырабатывать ферменты, инактивирующие собственные антибиотические вещества. Такой механизм имеется у продуцентов аминогликозидов, макролидов, грамицидина С, хлорамфеникола, полимиксинов и некоторых других.

Во-вторых, микроорганизмы могут защитить себя от собственных антибиотиков в результате образования определенных метаболитов, которые способны инактивировать синтезированные антибиотики. Так, выработка цистеина может выполнить эту функцию по отношению к стрептомицину, пенициллину, глиотоксину.

В-третьих, микроорганизмы активно выводят из клеток образуемый ими антибиотик, препятствуя его обратному проникновению

в клетки. Однако если часть антибиотика все же попадет в клетку, то он может там инактивироваться в результате, например, фосфорилирования. Такой процесс обнаружен у продуцента неомицина.

В-четвертых, микроорганизмы могут защитить себя от действия образуемого ими антибиотика в результате того, что в процессе биосинтеза антибиотик скапливается в особых клеточных образованиях («цистернах»), а затем выводится из клетки. Указанный путь характерен для продуцентов эритромицина, хлортетрациклина, виомицина, пенициллина и некоторых других.

В-пятых, продуценты антибиотиков могут быть резистентными по отношению к действию собственных антибиотических веществ в результате изменения мишени или инактивации антибиотика посредством модификации его молекулы. Такие механизмы обнаружены у стрептомицетов, вырабатывающих актиномицины, макролиды и некоторые другие антибиотики.

В-шестых, устойчивость многих продуцентов антибиотических веществ к образуемым ими антибиотикам связана с наличием у них генов устойчивости. Это имеет место у продуцентов аминогликозидных антибиотиков, актиномицинов, макролидов и др. У ряда стрептомицетов структурные гены биосинтеза антибиотиков (их число варьирует от 10 до 30) и гены устойчивости к ним в составе хромосомной ДНК, как правило, располагаются в одном кластере.

В-седьмых, устойчивость стрептомицетов, вырабатывающих, например, актиномицины, к собственным антибиотикам может проявляться также в результате изменения транскрипции под влиянием антибиотика и наличия в клетках продуцента актиномицинсвязывающих белков.

Таким образом, продуценты антибиотических веществ в процессе эволюции выработали механизмы защиты от действия образуемых ими мощных биологически активных продуктов жизнедеятельности. Вместе с тем антибиотики, находясь в клетках продуцента или вне их, могут оказывать определенное воздействие на процессы метаболизма собственного продуцента.

Роль отдельных антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов

На кафедре микробиологии МГУ в течение ряда лет исследовалась роль в жизнедеятельности собственных продуцентов таких антибиотиков, как грамицидин С, новобиоцин, ристомицин и нистатин. Для решения этой проблемы были использованы следующие подходы.

1. Изучение условий образования антибиотиков при культивировании микроорганизмов преимущественно на синтетических средах. При этом определялись место накопления антибиотика (в культуральной жидкости или внутриклеточно), период его максимального образования и другие факторы. Подбирались условия культивирования, при которых прекращается биосинтез антибиотика при нормальном росте продуцента (это обстоятельство имеет существенное значение для изучения организмов, образующих внутриклеточные антибиотические вещества). Сравнивались физиологические и биохимические свойства клеток, содержащих антибиотик и не имеющих его, что помогало выяснению влияния антибиотика на метаболизм изучаемого организма.

2. Получение мутантных форм микроорганизма, не образующих антибиотик, и сравнительное изучение характера обмена веществ этих штаммов и исходного организма (продуцента антибиотика).

3. Непосредственное изучение влияния исследуемых антибиотиков, вносимых в среду для культивирования перед засевом ее продуцентом, на различные стороны обмена веществ этого микроорганизма, а также штаммов того же организма, не синтезирующих антибиотик.

Получен большой экспериментальный материал, дающий основание несколько глубже оценить влияние изученных антибиотиков на продуцирующие их организмы и вплотную подойти к выяснению биологической роли антибиотиков.

Остановимся на рассмотрении результатов, полученных на кафедре микробиологии МГУ и в лабораториях других стран, по выяснению влияния антибиотиков на собственные продуценты применительно к отдельным организмам и антибиотическим веществам.

Стрептомицин. Мицелий 12- и 24-часовой культуры продуцента стрептомицина (антибиотик еще не синтезируется) поглощает кислород интенсивнее, чем мицелий 36-часовой и старших по возрасту культур, в которых уже начинает накапливаться стрептомицин. Антибиотик подавляет развитие собственного продуцента в зависимости от ряда факторов среды, концентрации стрептомицина, возраста спор стрептомицета и др. *S. griseus* чувствителен к стрептомицину в период экспоненциальной фазы роста. Однако стрептомицет устойчив к действию антибиотика в период, когда стрептомицин начинает синтезироваться. При использовании в экспериментах меченого стрептомицина показано, что антибиотик в меньшей степени проникает в клетки стрептомицета в период образования стрептомицина, чем в период экспоненциальной фазы роста. При интенсивном росте *S. griseus* наблюдается

некоторая инактивация стрептомицина. Эти примеры показывают, что стрептомицин определенным образом влияет на отдельные стороны метаболизма стрептомицета, синтезирующего этот антибиотик.

Хлорамфеникол. Добавление хлорамфеникола к среде, где развивается *S. venezuelae*, в количествах, не превышающих образование его данным микроорганизмом, препятствует биосинтезу антибиотика, но заметно не влияет на развитие стрептомицета. По-видимому, хлорамфеникол блокирует определенные энзиматические системы организма, принимающие участие в биосинтезе этого антибиотика, без влияния на функцию роста стрептомицета.

Хлорамфеникол в концентрации 100 мкг/мл, добавленный в среду перед началом ее засева продуцентом этого антибиотика, способствует удлинению лаг-фазы продуцента пропорционально количеству внесенного хлорамфеникола.

Тетрациклины. Хлортетрациклин подавляет аэробное и анаэробное дыхание *S. aureofaciens*. Образование антибиотика *S. aureofaciens* обратно пропорционально активности ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Снижение окислительной способности ферментов ЦТК связано, по-видимому, с использованием КоА для синтеза углеродной цепочки, из которой образуется молекула хлортетрациклина. Активность ферментов ЦТК у вырабатывающих антибиотик штаммов *S. aureofaciens* в 2–3 раза ниже, чем у штаммов, не образующих антибиотик. Хлортетрациклин подавляет активность ацетил-КоА-карбоксилазы у активного штамма *S. aureofaciens* почти на 70%, а у неактивного штамма — на 57%.

При добавлении тетрациклина к среде, в которой развивается продуцент этого антибиотика, синтез тетрациклина подавляется, но антибиотик не оказывает заметного влияния на рост стрептомицета.

При изучении влияния окситетрациклина на углеводный обмен вариантов *S. rimosus*, образующих и не образующих антибиотик, показано, что окситетрациклин подавляет потребление мальтозы и пировиноградной кислоты первым поколением клеток (мицелий этой генерации еще не продуцирует антибиотик, метаболизм мальтозы идет по пути синтеза мальтозофосфата) у обоих вариантов стрептомицетов (рис. 3). Повышение концентрации антибиотика усиливает его подавляющий эффект, что особенно заметно проявляется у стрептомицета, не образующего окситетрациклин (рис. 4)

Окситетрациклин подавляет окислительное фосфорилирование в первом поколении клеток в обоих вариантах, а в последующем поколении клеток — у варианта, не вырабатывающего антибиотик.

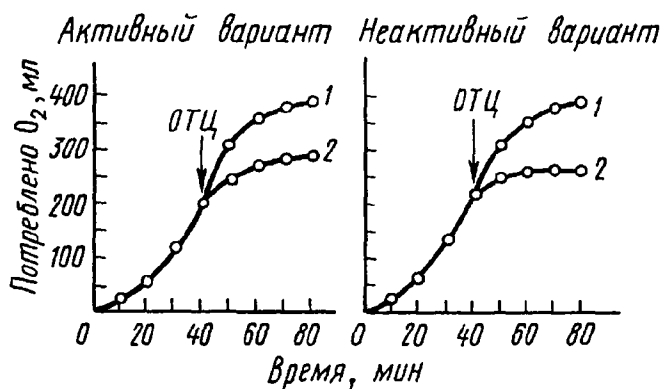


Рис. 3. Действие окситетрациклина на окисление мальтозы первой генерацией гиф *Streptomyces rimosus* активного и неактивного вариантов (по Nyiri, Lengvel, Erdelyi, 1963): 1 — контроль, 2 — добавлено 100 мкг/мл окситетрациклина (ОТЦ)

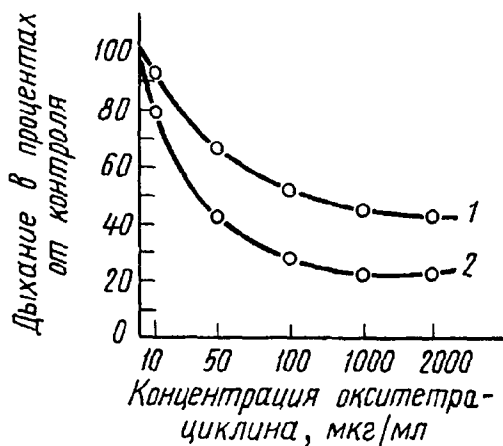


Рис. 4. Зависимость подавляющего эффекта окситетрациклина от его концентрации на первую генерацию *Streptomyces rimosus* (по Nyiri, Lengvel, Erdelyi, 1963): 1 — активный вариант, 2 — неактивный вариант

Многие антибиотики-полипептиды, синтезируемые бактериями, в том числе бацитрацин, грамицидин С, низин, накапливаются внутри клеток микробов. Надо полагать, что внутриклеточные антибиотики наиболее заметно влияют на организмы, продуцирующие их.

Бацитрацин. Процесс образования бацитрацина культурой *B. licheniformis* тесно связан со спорообразованием этих бактерий. Ингибирование процесса спорообразования тормозит биосинтез антибиотика. При внесении в среду для развития бактерий меченого бацитрацина последний обнаруживается (до 15% от внесенного антибиотика) в спорах бактерий. Бацитрацин образуется в конце цикла развития *B. licheniformis* как составная часть спор. Однако имеются мутанты *B. licheniformis*, не продуцирующие бацитрацин, но нормально образующие споры. Следовательно, не во всех случаях бацитрацин необходим для развития спор у клеток *B. licheniformis*.

Этот антибиотик в определенных условиях может подавлять рост *B. licheniformis*, вызывая лизис протопластов клеток бактерий, причем лизис зависит от концентрации бацитрацина и наличия в среде ионов Mn, Cd или Zn.

Надо полагать, что роль бацитрацина в жизнедеятельности образующих его бактерий связана с ионофорными свойствами антибиотика, принимающего участие в транспорте ионов Mn.

Бацитрацин синтезируется при участии фермента серинпротеиназы, который вырабатывается *B. licheniformis*. Высказана гипотеза о том, что бацитрацин может участвовать в регуляции синтеза самого антибиотика через ингибирование активности серинпротеиназы.

Исследования показывают, что бацитрацин играет определенную роль в процессе развития собственного продуцента и регуляции биосинтеза антибиотика.

Грамицидин. В процессе развития *B. bacillus* внутриклеточно образуется антибиотик грамицидин С, который заметно влияет на такие процессы, как спорообразование, биосинтез антибиотика собственным продуцентом.

Грамицидин С, добавленный к среде, стимулирует биосинтез этого антибиотика культурой *B. bacillus* P⁺. Даже в среде, содержащей ингибитор биосинтеза грамицидина С (β -фенил- β -аланин), антибиотик в концентрации 100 мкг/мл прекращает действие указанного вещества и культура начинает синтезировать грамицидин.

В процессе формирования спор резко уменьшается количество антибиотика, находящегося в культуральной жидкости. При формировании спор бактерий не образующим грамицидин С штаммом (P⁻-вариант) также наблюдается уменьшение внесенного в среду антибиотика. В этих условиях грамицидин С, добавленный к субстрату в концентрации 30 мкг/мл, уже через 23–24 ч культивирования бактерий в среде не обнаруживается. При спорообразовании *B. bacillus* до 50% грамицидина, содержащегося в вегетативных клетках бактерий, переходит в споры. Например, концентрация грамицидина С в вегетативных клетках перед спорообразованием равна 190 мкг, а в спорах — 95 мкг на 1 мг сухой биомассы.

Динамика изменения концентрации грамицидина С в спорах при прорастании их в синтетической среде, в среде с бульоном Хоттингера и в физиологическом растворе показана в табл. 19.

Данные табл. 19 убедительно показывают, что споры *B. bacillus*, помещенные в питательные среды, уже в первые 6–9 ч теряют практически весь антибиотик, в них содержащийся. На более богатой по составу среде (бульон Хоттингера) грамицидин в спорах не обнаруживается уже через 6 ч после начала их инкубации, при этом антибиотик отсутствует и в окружающей среде.

Затем количество антибиотика в вегетативных клетках вновь начинает накапливаться и уже к 21-му ч его содержится в 2 раза больше, чем в исходных спорах. На синтетической среде этот процесс несколько растянут, но имеет ту же тенденцию (рис. 5).

При помещении спор в физиологический раствор (0,8%-й раствор NaCl) они не прорастают, и количество антибиотика в этих условиях уменьшается всего лишь на 16%. При этом и масса спор снижается на 16,5%. В синхронно прорастающих спорах *B. bacillus* R-варианта через 4 ч инкубации грамицидин С обнаруживается в разрушенных ультразвуком проросших спорах. Это указывает на то, что при инкубации спор антибиотик разрушается, связывается с клеточной мембраной и не экстрагируется этиловым спиртом.

Изменение биомассы клеток в мг/100 мл культуральной жидкости (I) и концентрации грамицидина С в мкг/мг биомассы (II) в процессе прорастания спор *B. bacillus* на разных средах (по Егорову, Коршунову, 1963)

Время культивирования, ч	Синтетическая среда		Бульон Хоттингера		Физиологический раствор	
	I	II	I	II	I	II
0	12	95	12	95	12	95
6	4	60	13	0	12	93
8	—	—	45	6	—	—
9	8	8	113	16	—	—
10	—	—	172	24	—	—
12	108	19	260	60	—	—
15	255	50	362	102	—	—
18	383	95	450	144	10	80
21	493	137	550	192	—	—
24	584	183	532	185	—	—

Грамицидин С, добавленный к среде для культивирования *B. bacillus* в концентрации от 30 до 100 мкг/мл, тормозит или, наоборот, ускоряет процесс спорообразования клеток этого организма. Например, при внесении антибиотика в концентрации 30 мкг/мл в среду, в которой происходит нормальный синтез грамицидина С культурой *B. bacillus* P⁺-варианта, или при ингибировании процесса биосинтеза (среда с β-фенил-β-аланином) через 13 ч развития бактерий наблюдается заметная стимуляция спорообразования изучаемой культурой.

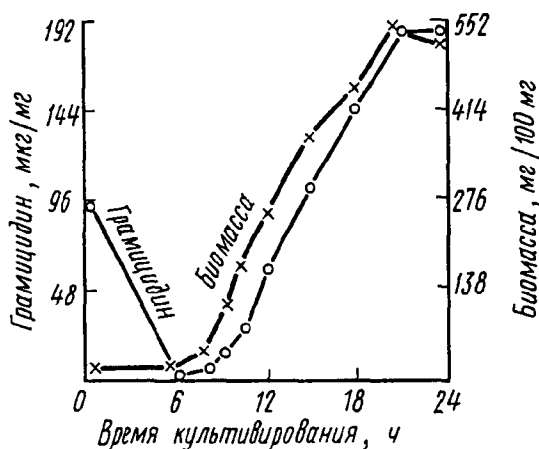


Рис. 5. Динамика содержания грамицидина С в прорастающих спорах и вегетативных клетках *Brevi bacillus* при развитии на бульоне Хоттингера (по Егорову, Коршунову, 1963)

мой культурой. Но такая же концентрация грамицидина С при добавлении к среде, содержащей стимулятор биосинтеза антибиотика (β-фенил-α-аланин), задерживает процесс спорообразования при нормальном росте бактерий.

Имеющийся в спорах *B. bacillus* R-варианта грамицидин С (примерно 35–50% от количества антибиотика, накапливающегося в вегетативных клетках) задерживает их прорастание на 4–5 ч по сравнению со временем прорастания спор P⁻ и S-вариантов *B. bacillus*, не синтезирующих грамицидин С, а также по сравнению со временем прорастания спор R-варианта, полученных в

результате развития бактерий на синтетической среде с β -фенил- β -аланином (ингибитор образования грамицидина С).

Ранее считалось, что молекула грамицидина С благодаря наличию в ее структуре двух остатков D-фенилаланина устойчива к протеолитическим ферментам. Однако в 1960 г. из культуры *B. subtilis* была выделена протеиназа, способная расщеплять некоторые полипептидные антибиотики, в том числе грамицидин. Под действием этой протеиназы молекула грамицидина С подвергается гидролизу в звене L-валин-L-орнитин.

Комплексный ферментный препарат проназа, образуемый одним видом стрептомицета, и нейтральная протеиназа фирмы Nagaso, выделенная из *B. subtilis*, инактивируют грамицидин (на 50%). Субтилизин таким действием не обладает (табл. 20).

Наши исследования показали, что сами клетки и прорастающие споры продуцента грамицидина С способны образовывать фермент грамицидиназу, инактивирующий этот антибиотик. Данные табл. 21 показывают, что более 45% грамицидина С под действием фермента, изолированного из прорастающих спор *B. bacillus*, разрушается в течение 24 ч при 37 °С.

Таблица 20

Действие некоторых протеолитических ферментов на грамицидин С при 37 °С (исходная концентрация антибиотика 1214 мкг/мл)

(по Егорову, Выпяч, Жариковой и др., 1975)

Фермент	Продуцент	Время инкубации, ч	Количество разрушенного грамицидина, %
Протеиназа Nagaso	<i>B. subtilis</i>	24	55
		48	55
Проназа	<i>S. griseus</i>	24	50
		48	50
Субтилизин	<i>B. subtilis</i>	24	0
		48	0
Контроль (без фермента)	—	24	0

Таблица 21

Разрушение грамицидина С ферментом грамицидиназой, выделенным из прорастающих спор *B. bacillus* (R-вариант) в течение 24 ч при 37 °С

Грамицидин С	Контроль (без фермента)	Опыт (добавлен фермент)
Исходная концентрация, мкг/мл	60	60
Количество через 24 ч, мкг/мл	60	28
Разрушение, %	0	45,7

С помощью электрофореза в полиакриламидном геле из белкового комплекса *B. bacillus* subsp. G. В. была выделена фракция, инактивирующая молекулу грамицидина С (табл. 22). Фермент

граммицидиназа действует по типу химотрипсин-протеиназы, разрывая пептидные связи, образованные карбоксильными группами фенилаланина и лейцина.

Таблица 22

Инактивация грамицидина С фракцией белкового комплекса культуральной жидкости *B. bacillus* subsp. G. В.

Вариант опыта	Опыт	Контроль
Грамицидин С в инкубационной смеси, мкг/мл	50	50
Белок в инкубационной смеси, мкг/мл	50	—
Грамицидин С в смеси с белковой фракцией через 24 ч инкубации, мкг/мл	Следы	50

Таблица 23

Разрушение грамицидина С ферментом грамицидиназой, выделенным из культуральной жидкости четырех вариантов *B. bacillus* (24 ч, 37 °С)

Вариант <i>B. bacillus</i>	Грамицидин С		Разрушение анги-биотика, %
	Начало опыта	Через 24 ч	
R	1300	170	87
S	1400	500	65
P ⁺	1000	370	63
P ⁻	1000	120	88

Интересно, что грамицидиназу образуют развивающиеся культуры всех вариантов (R, S, P⁺, P⁻) *B. bacillus* (табл. 23).

Таким образом, с полным основанием можно сказать, что исчезновение части антибиотика, находящегося в большом количестве в спорах *B. bacillus*, в процессе их прорастания связано с действием фермента грамицидиназы, образуемого прорастающими спорами.

Одновременно с ферментативной инактивацией грамицидина С в прорастающих спорах *B. bacillus* происходит связывание антибиотика фосфолипидами. Взаимодействие антибиотика с фракцией фосфолипидов, выделенных из клеток 24-часовой культуры, показано в табл. 24.

Таблица 24

Взаимодействие грамицидина С и фосфолипидов собственного продуцента (по Маркеловой, Юдиной, Егорову, 1981)

Вариант <i>B. bacillus</i>	Фосфолипиды в растворе, мкг/мл	Грамицидин С в растворе фосфолипидов				Грамицидин С, контроль, мкг/мл	
		до инкубации		после инкубации		до инкубации	после инкубации
		мкг/мл	%	мкг/мл	%		
R	120	85	100	40	47	85	85
S	220	85	100	42	49	85	83
P ⁺	100	85	100	40	47	85	87
P ⁻	80	85	100	65	76	85	85

Ферментативную инактивацию антибиотика и связывание его фосфолипидами в момент прорастания спор следует рассматривать как приспособление, снимающее ингибирующее действие грамицидина С на процесс прорастания спор.

Эти данные показывают, что грамицидин С, образовавшийся в клетках *B. bacillus* или добавленный к среде, не безразличен для клеток собственного продуцента. Он играет определенную роль в жизнедеятельности вырабатывающего его организма, включая процессы дифференциации клеток *B. bacillus*. Грамицидин С, внесенный в среду, усиливает процесс биосинтеза антибиотика; в зависимости от концентрации и стадии развития бактерий он тормозит или ускоряет процесс образования спор.

Низин. При засеве свежей питательной среды культурой *Lactococcus lactis* вместе с посевным материалом вносят и низин. Отмечено, что общее количество низина (внутриклеточного и содержащегося в культуральной жидкости) в процессе развития бактерий снижается и к концу периода лаг-фазы клетки стрептококка практически не содержат его. Синтез низина происходит после экспоненциального роста бактерий в период ранней стационарной фазы.

Снижение концентрации антибиотика в указанный период развития бактерий обусловлено изменением третичной структуры или степени полимеризации антибиотика. Однако не следует исключать в процессе инактивации низина и участие определенных энзиматических систем типа низиназ, так как количество низина уменьшается как в клетках стрептококка, так и в культуральной жидкости. Есть указания на то, что некоторые штаммы бактерий способны разрушать этот антибиотик.

Длительность лаг-фазы клеток, взятых в качестве посевного материала в разные периоды их развития, зависит от количества внутриклеточного низина: чем меньше клетки стрептококка содержат антибиотика, тем короче лаг-фаза, и наоборот — с увеличением внутриклеточного низина наблюдается удлинение лаг-фазы роста бактерий.

Снижение общего количества низина в лаг-период развития *L. lactis* и синтез антибиотика в более поздний период роста подтверждают значение низина как важной части бактериального ростового цикла стрептококка. По-видимому, низин связан с контролирующим механизмом, который не оказывает влияния на скорость роста продуцента антибиотика, но задерживает начало роста новых клеток.

Низин в концентрации 1500 и 2000 ед. R/мл среды (37 и 50 мкг/мл) в течение первых двух суток снижает рост биомассы

L. lactis в 2,5 и 4 раза соответственно. При этом значительно снижается и биосинтез антибиотика.

В средах, содержащих недостаточное для нормального развития количество азота (1–2 мг% NH_2 при норме 29 мг%), рост стрептококка и образование антибиотика сильно снижаются. Добавление в этих условиях к среде низина способствует увеличению роста биомассы *L. lactis* и некоторому повышению выработки антибиотика. Этот факт дает основание предполагать, что в условиях недостатка азота в среде и добавления к ней низина последний потребляется стрептококком как источник азота.

Полипептидные антибиотики могут подавлять рост организмов — продуцентов этих биологически активных веществ в тех концентрациях, которые образуются в процессе развития организмов. По-видимому, эти антибиотики выполняют регуляторную функцию в процессе перехода вегетативных клеток в споры, влияя на ДНК-репликацию, синтез клеточной стенки, функцию мембран и другие процессы.

У продуцента тироцидина *B. bacillus* АТСС 8185 ферменты, участвующие в его биосинтезе, обнаруживаются в экспоненциальной фазе развития бактерий, а в стационарной фазе их количество резко снижается. При формировании спор основная часть тироцидинсинтезирующей активности фермента обнаруживается в проспорах *B. bacillus*, куда фермент переходит из цитоплазмы вегетативных клеток. Это указывает на то, что тироцидин участвует в процессах превращения вегетативных клеток в споры.

Высказано предположение (Katz, Demain, 1977), что процессы спорообразования и синтеза антибиотиков независимы друг от друга, но регулируются общими или близкими механизмами, что и определяет их тесную взаимосвязь. Эта интересная гипотеза нуждается, однако, в экспериментальном подтверждении.

Актиномицины. Добавление актиномицина к среде одновременно с засевом ее стрептомицетом — продуцентом этого антибиотика — подавляет рост стрептомицета в первые 24 ч. В концентрации 4,2 мкг/мл среды антибиотик подавляет рост стрептомицета на 50%, а в концентрации 50 мкг/мл полностью угнетает развитие *S. antibioticus*.

Активно развивающийся мицелий актиномицета (в возрасте до 20–22 ч) наиболее чувствителен к актиномицину. Антибиотик ингибирует включение в белки ряда аминокислот: L-пролина, L-валина, DL-триптофана, L-треонина и др. 24-часовой мицелий стрептомицета способен осуществлять биосинтез актиномицина, но менее чувствителен к антибиотику, а на 48-часовой мицелий актиномицин не оказывает заметного ингибирующего действия.

Если в культуре *S. antibioticus* подавить биосинтез актиномицина ингибитором (3-метил-DL-пролин), то рост стрептомицета усиливается в 4–5 раз. Это указывает на то, что, с одной стороны, антибиотик ингибирует рост стрептомицета, а с другой — биосинтез актиномицина выступает конкурентом за общий аминокислотный пул, используемый как для построения молекулы антибиотика, так и для белкового синтеза стрептомицета.

Аурантин (антибиотик актиномициновой группы), образуя комплекс с ДНК, нарушает репликационный синтез РНК, а затем и синтез белка у продуцента. Все это подтверждает, что актиномицины оказывают заметное действие на различные стороны жизнедеятельности собственных продуцентов.

Трихотецин. Антибиотик играет значительную роль в жизнедеятельности синтезирующего его гриба. По всей вероятности, он обуславливает микропаразитизм *Trichothecium roseum*, обеспечивая грибу возможность использования поврежденных или убитых антибиотиком других грибов в качестве источника питания.

Изучение влияния трихотецина на продуцент этого антибиотика показало, что в концентрации 200 мкг/мл рост гриба угнетается в первые часы культивирования. Наиболее остро токсическое действие трихотецина проявляется в том случае, если антибиотик вводится в 48-часовую культуру гриба. Антибиотик адсорбируется поверхностью мицелия, нарушает проницаемость клеточных стенок гриба и угнетает образование трихотецина.

Поскольку предполагается, что антибиотики, выделяющиеся в среду или преимущественно накапливающиеся в клетках организма-продуцента, могут по-разному влиять на физиологические функции вырабатывающих их микроорганизмов, то для работы нами были взяты антибиотики новобиоцин, ристомицин и нистатин, отличающиеся по их содержанию и в культуральной жидкости, и в мицелии (табл. 25).

Из данных табл. 25 следует, что основное количество новобиоцина выделяется в среду и лишь небольшая часть содержится в мицелии продуцента. Ристомицин содержится в мицелии и в культуральной жидкости нокардии практически в одинаковом количестве. Нистатин в основном содержится в мицелии продуцента, и лишь небольшое его количество выделяется в среду.

Новобиоцин. Антибиотик в концентрации 400 мкг/мл, внесенный в среду перед началом развития стрептомицета, полностью останавливает рост и развитие *S. spheroides*. Иными словами, количество антибиотика, образуемое стрептомицетом к 7–8-м суткам, оказывает резко неблагоприятное действие на микроорганισμό в начале его развития.

Содержание антибиотиков в культуральной жидкости (I) и мицелии (II)
продуцентов в динамике их развития

Время роста, сут	Новобиоцин, продуцируемый <i>Streptomyces spheroides</i>			Ристомидин, продуцируемый <i>Nocardia fructiferi</i>			Нистатин, продуцируемый <i>Streptomyces noursei</i>		
	I		II	I		II	I		II
	мкг/мл	мкг/мг	мкг/мг	мкг/мл	мкг/мг	мкг/мг	мкг/мл	мкг/мг	мкг/мг
2	10-20	5-7	0,1-0,2	250-300	60-80	100-150	150-200	40-50	25-30
4	150-200	15-20	2,0-3,0	500-600	60-80	100-150	300-400	80-90	700-750
6	250-300	30-35	5,0-6,0	500-600	60-80	100-150	300-350	150-170	400-450

Исходная концентрация новобиоцина в среде, равная 100 мкг/мл, значительно тормозит рост продуцента, потребление им глюкозы, лимонной кислоты, а также снижает биосинтез антибиотика.

Необходимо отметить, что угнетающее действие новобиоцина на рост стрептомицета и его метаболизм проявляется в первые три дня развития организма. Наиболее чувствительным к действию новобиоцина оказался углеродный обмен (потребление глюкозы и лимонной кислоты). Так, новобиоцин в концентрации 200 мкг/мл полностью тормозит потребление культурой *S. spheroides* лимонной кислоты и в 4-6 раз снижает потребление глюкозы; резко снижается также использование стрептомицетом азота и фосфора (табл. 26).

Таблица 26

Влияние различных концентраций новобиоцина на развитие
Streptomyces spheroides и биосинтез антибиотика
(данные на 7-е сутки развития культуры)
(по Тороповой, Егорову, 1966)

Количество новобиоцина в среде, мкг/мл	Потребление стрептомицетом, мг/г мицелия				Биомасса		Биосинтез новобиоцина	
	азота	глю- козы	лимон- ной кис- лоты	фосфора	г/л	%	мкг/г	%
0 (контроль)	80	3500	Вся на 5-е сутки	30	11,0	100	4000	100
50	80	3500	Вся	30	11,0	100	4000	100
100	80	1000	100	30	7,0	64	1000	25
200	25	800	0	0	3,0	27	1000	25
400	0	0	0	0	0,2	2	0	0

Развитие стрептомицета в присутствии 100 мкг/мл новобиоцина сопровождается значительным накоплением в среде ацетоуксусной, пировиноградной и оксипировиноградной кислот.

При добавлении новобиоцина (100 и 200 мкг/мл) к среде перед началом развития стрептомицета биосинтез антибиотика заметно снижается: на 5-е сутки в 5–7 раз, на 7-е — в 4 раза.

Под влиянием новобиоцина (100 мкг/мл) у *S. spheroides* подавляется синтез нуклеиновых кислот, причем подавление синтеза РНК происходит в большей степени, чем торможение синтеза ДНК.

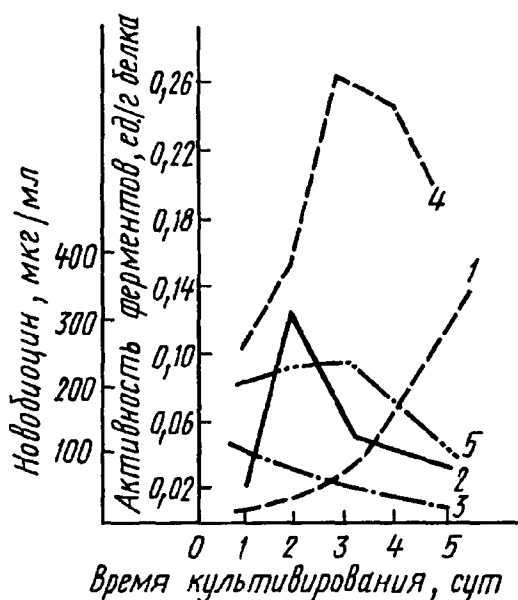


Рис. 6. Изменение активности дегидрогеназы и каталазы у *Streptomyces spheroides* и его неактивного мутанта: 1 — новобиоцин, 2 — дегидрогеназная активность, 3 — то же неактивного штамма, 4 — каталазная активность продуцента, 5 — то же неактивного мутанта

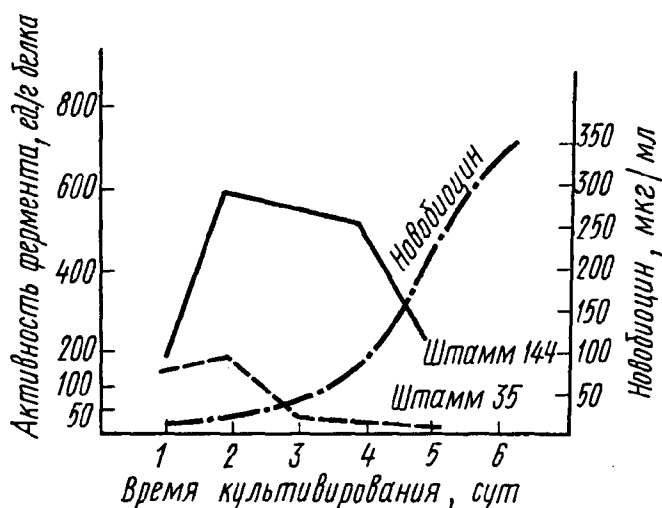


Рис. 7. Изменение глюкозооксидазной активности в процессе развития *Streptomyces spheroides* (штамм 35) и его неактивного мутанта (штамм 144)

Сравнительное изучение физиологии продуцирующего и не вырабатывающего новобиоцин штаммов

S. spheroides показало, что активность дегидрогеназы и каталазы у штамма, не продуцирующего антибиотик (неактивного), ниже, чем у образующего новобиоцин (активного) (рис. 6), а глюкозооксидазная активность, наоборот, в 30–60 раз ниже у активного, чем у неактивного штамма *S. spheroides* (рис. 7). При этом у активного штамма во вторую фазу роста стрептомицета (фаза начала биосинтеза и накопления в среде новобиоцина) активность глюкозооксидазы и некоторых дегидрогеназ резко снижается.

Эти данные позволили сделать предположение о том, что новобиоцин, по-видимому, ингибирует активность некоторых ферментов собственного продуцента. Для проверки этого предположения новобиоцин в концентрации 100 мкг/мл добавили в среду перед началом развития продуцента и изучили влияние его на

активность каталазы, дегидрогеназ и глюкозооксидазы. Результаты опытов показали, что к новобиоцину очень чувствительны глюкозооксидаза (рис. 8), некоторые дегидрогеназы и практически не чувствительны каталаза (рис. 9) и пероксидаза.

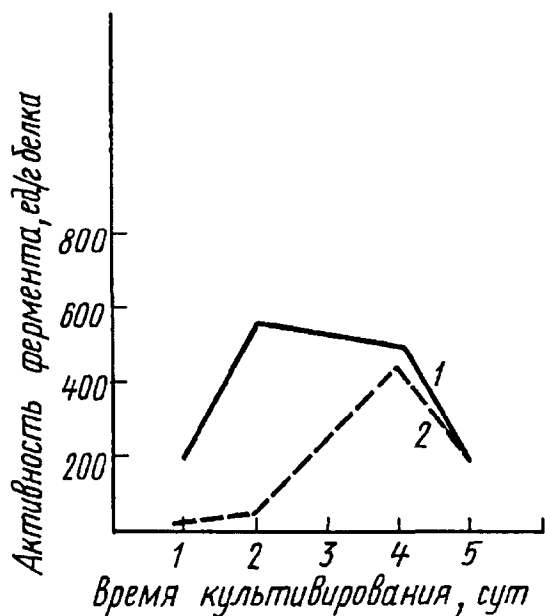


Рис. 8. Влияние новобиоцина на глюкозооксидазную активность не образующего антибиотик штамма (144) *Streptomyces spheroides*: 1 — активность фермента без новобиоцина, 2 — активность фермента при добавлении антибиотика (100 мкг/мл)

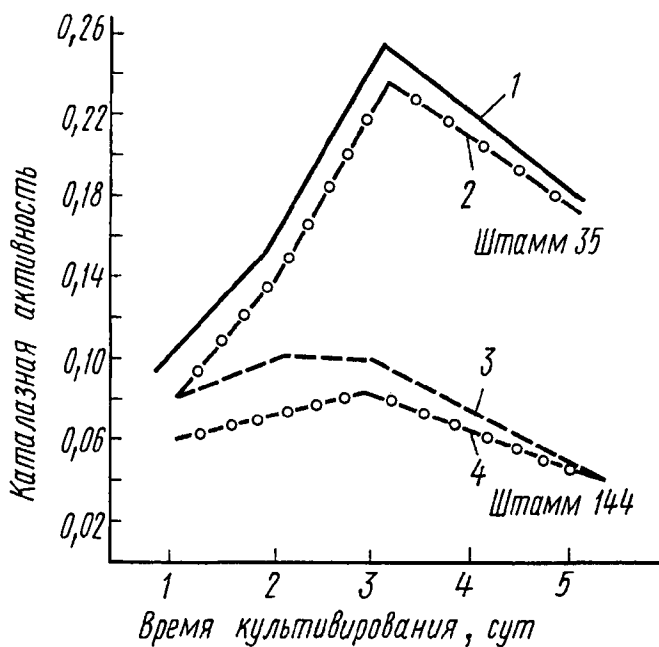


Рис. 9. Влияние новобиоцина (100 мкг/мл) на активность каталазы у *Streptomyces spheroides* (штамм 35) и неактивного мутанта (штамм 144): 1, 3 — активность фермента без новобиоцина, 2, 4 — активность фермента с добавкой к среде антибиотика

Таким образом, экспериментальные данные, прежде всего в отношении дегидрогеназ и глюкозооксидазы, при сравнительном изучении их активности у образующего и не образующего антибиотик штаммов *S. spheroides*, а также результаты изучения действия новобиоцина на активность (чувствительность) этих ферментов у неактивного штамма четко показывают, что новобиоцин ингибирующе действует на активность некоторых дегидрогеназ и глюкозооксидазы и, возможно, выполняет роль регулятора их активности.

Ристомицин. Ристомицин относится к группе полициклических гликопептидов (идентичен ристоцетину).

Количество ристомицина от 500 до 800 мкг/мл, образуемое нокардией через 4–5 сут нормального роста, при внесении в среду непосредственно перед ее засевом мицелием *Nocardia fructiferi* subsp. *ristomycini* полностью подавляет развитие продуцента антибиотика. Ристомицин в концентрации 400 мкг/мл, добавленный в синтетическую среду перед засевом ее мицелием нокардии, в 4 раза тормозит образование антибиотика на 5-е сутки роста нокардии. Однако рост микроорганизма при этом даже несколько возрастает. Наиболее чувствительны к действию

ристомидина процессы, связанные с потреблением азота, фосфора и биосинтезом антибиотика.

Как показали наши исследования, уже через 30 мин сравнительно небольшое количество ристомидина сорбируется на мицелии, откуда он довольно легко и быстро переходит в физиологический раствор при смывании. При этом чем выше концентрация ристомидина в среде, тем больше его сорбируется мицелием. В дальнейшем через 6, 12 ч роста нокардии изменений не наблюдается. Эти данные показывают, что ристомидин, по-видимому, не проникает внутрь мицелия нокардии. Действие на продуцент он оказывает находясь на поверхности клеток продуцента антибиотика.

Ристомидин, добавленный в среду в количестве 400 мкг/мл, существенно влияет на фосфорный обмен *N. fructiferi* subsp. *ristomycini*. Антибиотик изменяет содержание всех форм фосфора в мицелии продуцента ристомидина. В его присутствии резко (почти в 4 раза) увеличивается содержание стабильного фосфора по сравнению с контролем (рис. 10).

Этот антибиотик способствует увеличению содержания в мицелии собственного продуцента всех форм фосфора: общего, минерального, лабильного и особенно стабильного.

При концентрации антибиотика в среде 400 мкг/мл (рис. 11) наблюдается уменьшение образования кетокислот (пировиноградной, ацетоуксусной) примерно в 2 раза по сравнению с контролем.

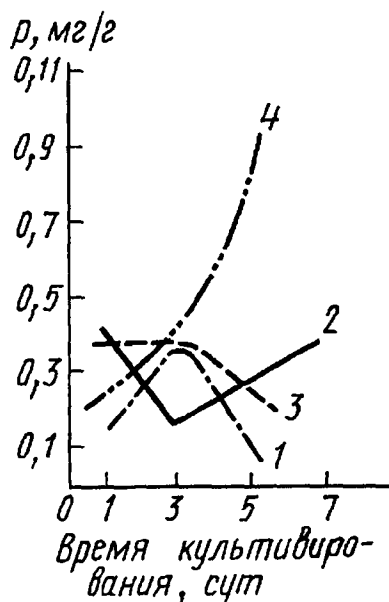


Рис. 10. Влияние ристомидина (400 мкг/мл) на содержание стабильного и лабильного фосфора в мицелии *Nocardia fructiferi* var *ristomycini*: 1 — фосфор лабильный без антибиотика, 2 — то же, плюс антибиотик, 3 — фосфор стабильный без ристомидина, 4 — то же, плюс ристомидин

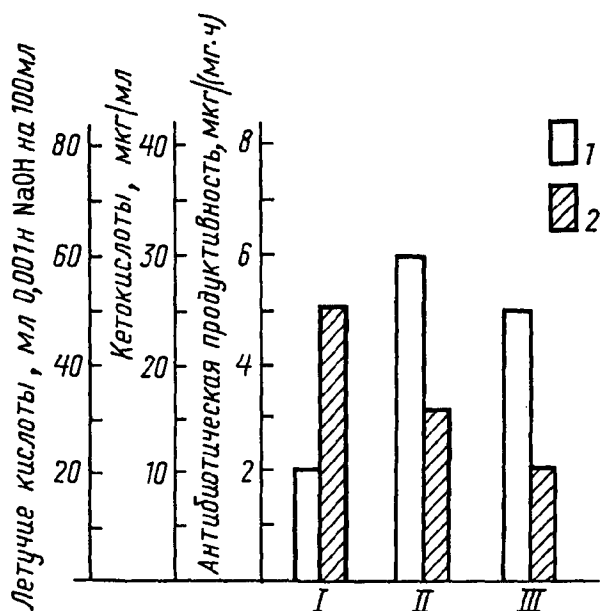


Рис. 11. Влияние ристомидина (400 мкг/мл) на образование органических кислот в культуре *Nocardia fructiferi* var *ristomycini*: I — летучие кислоты, II — кетокислоты, III — антибиотическая продуктивность. 1 — контроль (без антибиотика), 2 — в среду добавлен антибиотик

Ристомидин (400 мкг/мл) оказывает определенное влияние на синтез нуклеиновых кислот *N. fructiferi*. Из данных табл. 27 следует, что ристомидин, добавленный в среду в концентрации 400 мкг/мл, с первых суток и до конца роста нокардии немного ингибирует синтез ДНК, практически не оказывает влияния на содержание РНК в первые двое суток роста и способствует увеличению РНК во вторую фазу роста продуцента (3–4-е сутки).

Эта же концентрация антибиотика снижает у *N. fructiferi* subsp. *ristomycini* активность таких ферментов, как глицеральдегидрофосфатдегидрогеназа, транскетолаза, изоцитратдегидрогеназа и сукцинатдегидрогеназа. Ингибирование этих ферментов в присутствии ристомидина резко снижает биосинтез антибиотика.

Нистатин. Этот антибиотик относится к группе полиеновых макролидов — тетраенов (см. с. 277). Применяется в медицинской практике в качестве противогрибного препарата.

Нистатин в процессе развития стрептомицета в основном содержится в мицелии; по-видимому, клеточные стенки *Streptomyces noursei* с трудом пропускают его молекулу. Для выяснения влияния нистатина на собственный продуцент пришлось использовать довольно высокие концентрации антибиотика, а также получить неактивный (не образующий антибиотик) штамм и сравнивать их биохимические особенности. Нистатин в концентрации 8000 ед./мл, внесенный в среду перед началом развития стрептомицета, полностью подавляет синтез антибиотика, угнетая при этом образование биомассы продуцента лишь на 10–20%, в концентрации 4000 ед./мл никакого заметного влияния на биосинтез нистатина не оказывает.

Изучение активности фермента пентозного цикла расщепления углеводов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) у активного и неактивного штаммов *S. noursei* показало, что у штамма, образующего нистатин, активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 4-е сутки роста в 4 раза ниже, чем у штамма, не образующего антибиотик (табл. 28). Активность фермента резко снижается именно в тот период, когда стрептомицет начинает

Таблица 27

Влияние ристомидина на синтез нуклеиновых кислот (мг/г) *N. fructiferi* subsp. *ristomycini*

Время роста, сут	РНК		ДНК	
	Добавление в среду ристомидина, мкг/мл			
	0	400	0	400
1	30,0	28,0	15,3	13,0
2	19,7	19,8	11,0	9,0
3	18,1	19,4	11,4	8,6
4	11,0	18,2	9,0	7,5
5	9,0	14,4	6,0	5,4

образовывать нистатин. Эта закономерность дает основание предположить, что антибиотик оказывает регулирующее влияние на активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Изучение влияния добавок нистатина на активность некоторых ферментов у активного и неактивного штаммов *S. noursei*

Таблица 28

Активность фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы у двух штаммов *S. noursei* (по Тороповой, Нугуманову, Егорову, 1974)

Время роста, сут	Активный штамм		Неактивный штамм	
	Биомасса, мг%	Активность фермента, (мкмоль/мин на 1 мг белка) $\times 10^3$	Биомасса, мг%	Активность фермента, (мкмоль/мин на 1 мг белка) $\times 10^3$
1	275	156	216	208
2	411	152	380	250
4	557	69	495	272
6	430	44	402	146

подтвердило это предположение (табл. 29).

Изучение влияния нистатина на некоторые ферменты *S. noursei* показывает, что ферменты пентозного цикла превращения углеводов более чувствительны к антибиотик, чем ферменты гликолиза и цикла трикарбоновых кислот. По-видимому, нистатин выполняет в метаболизме организма-производителя определенную регулирующую функцию: подавляя ферменты пентозного цикла, он как бы направляет обмен веществ по более экономичному пути Эмбдена–Мейергофа–Парна-

са (ЭМП), способствуя большему накоплению энергии для процессов биосинтеза.

Не исключено, что в первой фазе развития стрептомицета, когда происходят энергичные конструктивные процессы, функционирует пентозный цикл превращения углеводов. Однако с началом образования и накопления в клетках стрептомицета антибиотика метаболизм переключается на другой путь — путь ЭМП.

Вместе с тем возможен и несколько иной путь воздействия нистатина на метаболизм собственного производителя. Добавление 8000 ед./мл нистатина в среду значительно подавляет (на 50–100%) у стрептомицета активность альдолазы и не оказывает влияния на транскетолазную активность. Эти данные дают основание предполагать, что нистатин выполняет роль регулятора, направляющего метаболизм по гексозомонофосфатному пути (ГМФ).

Если сравнить эти два пути (ЭМП и ГМФ) превращения углеводов с точки зрения механизма получения энергии, то ГМФ-путь в 2 раза менее эффективен, чем путь ЭМП.

Действие нистатина (8000 ед./мл) на активность некоторых ферментов
у двух штаммов *S. noursei*

(по Тороповой, Нугуманову, Егорову, 1974)

Вариант опыта	Время развития, сут	Биомасса, мг%	Фермент		
			пируватдекарбоксилаза, ед./мин на 1 мг белка	сукцинатдегидрогеназа, ммоль/мин на 1 мг белка	глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, (мкмоль/мин на 1 мг белка) × 10 ³
Активный штамм без нистатина	1	299	392	1360	156
	2	465	875	1175	152
	4	563	690	870	69
	6	501	666	293	44
Активный штамм + нистатин	1	225	410	1005	37
	2	397	663	860	38
	4	504	501	631	20
	6	447	420	201	0
Неактивный мутант без нистатина	1	216	242	—	208
	2	380	271	—	250
	4	495	143	—	272
	6	402	69	—	146
Неактивный мутант + нистатин	1	159	230	—	41
	2	291	207	—	49
	4	435	102	—	51
	6	387	57	—	35

* * *

Анализ результатов изучения влияния отдельных антибиотиков на продуцирующие их микроорганизмы со всей очевидностью свидетельствует, что биологически активные соединения действительно заметно влияют на собственные продуценты.

Во-первых, антибиотики, вносимые в среду для культивирования собственных продуцентов перед началом их посева в концентрациях, которые обычно характерны для них в условиях нормального развития, могут угнетать рост продуцентов. Во-вторых, антибиотики (бацитрацин) в ряде случаев непосредственно участвуют в образовании спор собственного продуцента; в-третьих, в зависимости от концентрации и времени внесения в среду антибиотики способны оказывать ингибирующее или, наоборот, стимулирующее действие на процесс споруляции клеток, задерживать прорастание спор, усиливать биосинтез собственного антибиотика (грамицидина С); в-четвертых, они могут выступать в качестве своеобразных регуляторов энзиматических процессов (новобиоцин, ристомицин, нистатин и др.).

Подводя общие итоги рассмотрения влияния антибиотиков на различные стороны жизнедеятельности собственных продуцентов, можно суммировать использованные материалы В. Бетина (1983), а также наши и другие литературные данные следующим образом:

Характер воздействия	Антибиотики
Подавление синтеза ДНК	Митомицин, новобиоцин, ристомицин, блеомицин
Подавление синтеза РНК	Актиномицины, рифамицины, тетрациклины, тироцидин, новобиоцин, грамицидин А, афлатоксины
Стимуляция синтеза РНК	Хлорамфеникол
Подавление синтеза белка	Тетрациклины, аминогликозиды, линкомицин, макролиды, трихотецин, фузидиевая кислота, актиномицины
Нарушение энергетического метаболизма	Пептидные антибиотики, олигомицины, антимицин А, новобиоцин
Нарушение фосфорного обмена	Новобиоцин, ристомицин
Подавление ферментов пентозного цикла	Нистатин
Изменение функции мембран	Пептидные антибиотики
Транспортные процессы	Хлорамфеникол, бацитрацин, антибиотики-ионофоры, сидеромицины
Подавление синтеза клеточной стенки	Бацитрацин, циклоспорин, ванкомицин, ристоцетин, моеномицин
Участие в спорообразовании	Бацитрацин, грамицидин С
Ингибирование синтеза собственного антибиотика	Бацитрацин, грамицидин С, низин, хлорамфеникол, трихотецин, новобиоцин, ристомицин

Вопросы для самоконтроля

1. Каково значение антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов? Рассмотрите на примере отдельных антибиотиков.
2. Какими методами можно изучить влияние антибиотика на собственный продуцент?
3. Каковы основные механизмы защиты продуцента от действия собственных антибиотиков?

ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ. ПУТИ ПОВЫШЕНИЯ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ

Продуценты антибиотиков могут выделяться из самых разнообразных субстратов: почвы, гниющих растительных и животных остатков, илов, воды озер и рек, воздуха и других источников. Наиболее богата микроорганизмами, продуцирующими антибиотики, почва. Из нее большей частью и выделяют организмы — продуценты антибиотических веществ.

Прежде чем начинать поиски продуцентов антибиотических веществ, приступать к выделению микробов-антагонистов, образующих антибиотики, из естественных мест их обитания, исследователь должен иметь ясную цель. При этом возможны три основные задачи: во-первых, поиски продуцентов уже известных, описанных в литературе и используемых на практике антибиотиков; во-вторых, поиски новых антибиотиков, способных проявлять биологическое действие по отношению к конкретным организмам; в-третьих, обнаружение продуцентов антибиотиков, подавляющих в клетке определенную мишень.

В зависимости от поставленной цели должны быть использованы и соответствующие методы поисков организмов — продуцентов тех или иных антибиотических веществ. Итак, если перед исследователем стоит задача выделить микроорганизм, образующий уже известный антибиотик, то при этом необходимо иметь в виду следующее.

1. Каждый антибиотик вырабатывается одним или несколькими определенными видами организмов.

2. Каждый микроорганизм продуцирует один или несколько вполне конкретных антибиотиков.

Образование антибиотиков есть видовая специфика или, точнее, особенность отдельных штаммов микроорганизмов.

Так, для поиска продуцента грамицидина С изучают не все бактериальные штаммы, а лишь штаммы спорообразующих бактерий, принадлежащие к *B. bacillus*; для выделения продуцента стрептомицина надо искать стрептомицеты, относящиеся к *S. griseus*; если нужно выделить продуцент фумагиллина, ищут мицелиальные грибы, принадлежащие к *Aspergillus fumigatus*, и т.д.

Следовательно, при поиске продуцентов известных антибиотиков нет необходимости выделять все организмы и изучать их антибиотические особенности. Достаточно при этом 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. Однако это не противоречит вышесказанному, а, наоборот, подтверждает положение о том, что известные антибиотики образуются вполне определенными видами (или штаммами) организмов, которые могут принадлежать к разным систематическим группам.

Иной подход диктует решение второй задачи — поиска продуцентов новых антибиотиков, активных в отношении определенных организмов. В данном случае продуценты антибиотических веществ следует пытаться выделить из всех групп организмов.

Изолированные штаммы изучаются в отношении их антибиотического действия к тем тест-организмам, для которых нужно найти антибиотик. При необходимости поиска среди микроорганизмов штамма, подавляющего развитие, например, дрожжеподобного организма *Candida albicans*, в качестве тест-микроба используют *C. albicans* или другой организм, близкий к нему по физиологическим свойствам.

Выделяя микроб-антагонист, активный в отношении какого-либо возбудителя болезней растений, в качестве тест-организма необходимо 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 надо шире использовать потенциал микроорганизмов, для чего следует разрабатывать новые методы и иные условия культивирования, с тем чтобы выделять из природных источников новые виды и роды микроорганизмов. По заключению некоторых микробиологов, мы пока научились выделять и культивировать не более 0,01% имеющихся в природе микроорганизмов.

В сферу поиска новых антибиотиков необходимо активнее включать представителей животного мира. Имеющиеся примеры подтверждают сказанное. Так, в начале 90-х гг. XX столетия из акулы семейства катранов выделен интересный антибиотик, который по химическому строению отличается от всех до этого времени известных антибиотических соединений. В 1989 г. из полиморфонуклеарных лейкоцитов человека изолированы дефензин-1 и азуроцидин — антибиотики, обладающие широким антимикробным спектром действия, а в 1997 г. на коже человека обнаружен антибиотик бета-дефензин-2.

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

Гораздо сложнее обстоит дело с поиском продуцентов антибиотиков, активных в отношении вирусов и злокачественных новообразований. Если бактерии, грибы или простейшие — возбудители тех или иных заболеваний — могут быть непосредственно использованы в опытах как тест-организмы при культивировании их на обычных лабораторных средах, то вирусы, как внутриклеточные паразиты, не могут культивироваться на таких средах. Для их развития нужны живые клетки, живые ткани. Аналогичные трудности возникают и при поисках противораковых антибиотиков (см. ниже).

Решение третьей задачи — поиска новых препаратов по принципу «мишень—антибиотик» — должно базироваться на определении основной (существенной) мишени в бактериальной клетке.

В современных условиях задача поиска продуцентов новых антибиотиков переводится на новые принципы. Перед исследователями ставится цель получения антибактериального или противогрибного препарата, подавляющего в клетке определенную мишень, конкретный фермент, ответственный за важнейшую функцию метаболизма патогенного микроба. В бактериальной клетке известно не менее 3 тыс. ферментов, каждый из которых может быть мишенью для антибиотика. Установление важнейших из этих ферментов — одна из задач, стоящих перед исследователями.

В конечном итоге при постановке и решении названной цели придется выделять новые продуценты из различных групп организмов и изучать воздействие продуктов их жизнедеятельности на обозначенные мишени.

Для поражения определенной мишени (фермента) следует шире использовать химические или биологические модификации уже известных, подробно изученных антибиотиков.

Тем не менее поиск продуцентов новых антибиотиков, обладающих принципиально иными свойствами и подавляющих в клетке новые мишени по сравнению с теми, которые обнаруживаются при использовании «классических» методов выделения, не дает пока высокого эффекта.

С развитием геномики — науки об определении полного набора генов в клетке (в организме) и об установлении биохимической функции каждого гена — появляется возможность изменить тактику поиска новых антибиотических веществ, перевести его на новые принципы.

Широко используемые в медицинской практике антибиотики подавляют в микробной клетке несколько десятков мишеней. Между тем в бактериальной клетке имеется до трех тысяч ферментов, кодируемых соответствующими генами и регулирующих ее метаболизм. Каждый из этих ферментов теоретически может быть мишенью для антибиотика.

Главной задачей на современном этапе и в будущем является определение наиважнейших (существенных) мишеней для действия антибиотика. Таким образом, решение третьей задачи должно базироваться прежде всего не на поиске новых антибиотиков, а на *определении существенных мишеней клетки*, на которые должны оказывать влияние антибиотики. При этом в первую очередь необходимо использовать сведения о геноме клетки патогенного микроорганизма и о функциональной (биохимической) роли каждого гена. Задача эта весьма сложная.

Имеющиеся немногочисленные данные, полученные в последнее время 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). Приведенные результаты показывают, что удаление части генов из бактериальной клетки не обязательно может привести ее к гибели. Следовательно, мишенями для антибиотиков могут быть только те существенные гены (265), которые обеспечивают жизненные функции указанной бактериальной клетки.

Указанный третий подход к поиску антибиотических веществ по принципу «мишень — антибиотик» лишь намечается. Он будет реализовываться в наиболее научно подготовленных коллективах, использующих новейшее необходимое оборудование, его успехи будут координироваться с развитием структурной и функциональной геномики микроорганизмов.

Использование «классических» методов поиска новых антибиотиков с широким применением направленного отбора будет оставаться основным способом выделения новых антибиотических веществ. При этом надо шире использовать потенциал новых родов и видов микроорганизмов. Для этого следует, во-первых, активнее привлекать разнообразные природные источники микробов, уникальные географические и экологические зоны их

обитания; во-вторых, разрабатывать новые методы и нестандартные условия культивирования изолированных микроорганизмов, чтобы активировать «молчащие» гены, участвующие в биосинтезе антибиотических веществ.

Итак, главное при поиске продуцентов антибиотиков — выделение их из природных источников. Вместе с тем для этих целей широко применяется метод изменения генома выделенного продуцента антибиотика путем мутагенеза и генной инженерии.

Наконец, для получения наиболее эффективного по биологическому действию антибиотика используют метод химической или биологической трансформации природных соединений.

Выделение микроорганизмов, продуцирующих антибиотики

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Для выделения микроорганизмов — продуцентов антибиотиков из естественных мест их обитания применяют разнообразные методы. Здесь же следует остановиться лишь на самой общей характеристике этих методов. В основу большинства приемов положен принцип выделения чистой культуры микроба и непосредственного испытания его по отношению к используемым тест-организмам. Однако, как отмечалось выше, существенное значение при образовании антибиотических веществ имеют и смешанные культуры. Об этом обстоятельстве также необходимо помнить при поиске продуцентов антибиотических веществ.

Важное значение при выделении микробов, способных вырабатывать антибиотические вещества, или иной группы организмов имеет специфика условий их культивирования. Как уже отмечалось, микробы — продуценты антибиотиков выделяют из субстратов, где обильно развиваются разнообразные формы микроорганизмов (бактерии, актиномицеты, дрожжи, мицелиальные грибы), поэтому очень важно знать и учитывать специфику условий развития тех организмов, которые необходимо выделить.

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

При выделении актиномицетов или грибов следует также учитывать особенности их развития. Актиномицеты растут медленнее, чем бактерии; они могут использовать такие источники питания, которые не очень хорошо усваиваются бактериями.

С учетом особенностей развития актиномицетов для выделения их из естественных субстратов рекомендуются следующие среды:

Среда первая	Среда вторая
(NH ₄) ₂ SO ₄ , г 1	KNO ₃ , г 1
K ₂ HPO ₄ , г 1	K ₂ HPO ₄ , г 3
NaCl, г 1	NaCl, г 0,2
MgSO ₄ , г 1	MgCO ₃ , г 0,3
Крахмал, г 10	Крахмал, г 10
Вода водопроводная, мл . . . 1000	FeSO ₄ , г 0,001
Агар-агар, г 15	CaCO ₃ , г 0,5
	Вода водопроводная, мл . 1000
	Агар-агар, г 15

pH сред устанавливается в пределах 6,8–7,1 после их стерилизации.

Для выделения термофильных актиномицетов удобно использовать среду следующего состава: пептон — 5 г, кукурузный экстракт — 5 мл, глюкоза — 10 г, NaCl — 5 г, CaCl₂ — 0,5 г, агар — 15 г, вода водопроводная — до 1 л. Термофильные организмы следует выращивать при температуре 55–60 °С.

Однако для поисков продуцентов новых антибиотиков из группы актиномицетов требуется выделение из природных источников новых форм этих микроорганизмов, обладающих иными физиолого-биохимическими свойствами. Применяя новые нестандартные методы выделения актиномицетов, используя необычные субстраты и образцы почв, отобранные в разнообразных экологических условиях и географических зонах, в последнее время удалось показать, что действительно в природе есть формы актиномицетов, о которых ранее не было известно. Выделены, например, актиномицеты психрофилы, способные развиваться при пониженных температурах (от 0 до 18 °С). Среди этих форм обнаружены продуценты антибиотиков, например психрофильный штамм *Streptomyces griseus*, образующий пептидный антибиотик криомицин. Выделены термотолерантные стрептомицеты — продуценты антибиотиков. Так, продуцент гранатицина *S. thermoviola-seus* образует максимальную биомассу при 30 и 50 °С, но, развиваясь при 37 и при 55 °С, биомасса стрептомицета значительно снижается. Максимальный биосинтез антибиотика у этого стрептомицета наблюдается при 45 °С, а при 55 °С гранатицин не вырабатывается (J. Edwards, 1989).

В природе существуют ацидофильные актиномицеты, которые лучше растут в условиях кислой среды (pH 3,5–6,5). Ацидо-

фильные актиномицеты образуют антибиотические вещества, обладающие противогрибным действием.

Выделены новые формы актиномицетов, предпочитающие для своего развития щелочные условия, — так называемые алкалофильные организмы. Среди новых форм актиномицетов встречаются и галофильные виды, способные расти лишь на средах, содержащих высокие концентрации минеральных солей (например, не менее 10% NaCl).

В последнее десятилетие в качестве продуцентов антибиотиков активно изучается группа актиномицетов, относящихся к роду *Actinomadura*. Этот род был впервые описан Х. и М. Лешевалье в 1970 г. Известно не менее 45 видов и 6 подвидов названного рода. Из представителей группы *Actinomadura* выделено более 35 новых антибиотиков.

Значительный интерес проявляется к таким родам актиномицетов, как *Micromonospora*, *Nocardiosis*, *Amicolactopsis*, среди которых выделены продуценты ценных аминогликозидных, макролидных и других антибиотиков, а также *Pseudonocardia*.

Приведенные примеры значительно расширяют представления о физиолого-биохимических особенностях группы актиномицетов. Исследователи, занимающиеся поисками продуцентов новых антибиотических веществ, должны иметь в виду эти особенности, с тем чтобы обеспечить максимально возможные условия для развития всех имеющихся в природе форм актиномицетов. Выделение же новых форм микроорганизмов позволяет надеяться на получение новых антибиотических веществ с ценными свойствами.

Большой интерес исследователи стали проявлять к грибам как потенциальным продуцентам разнообразных антибиотических веществ.

Мицелиальные грибы предпочтительнее развиваются на средах с несколько пониженным значением pH (4,5–5), на которых плохо растут многие бактерии и актиномицеты.

Выделять грибы можно как на синтетических (например, среда Чапека), так и на сложных по составу натуральных средах (например, сусло-агар) с начальным pH 4,5–5. Для выделения мицелиальных грибов — продуцентов антибиотиков можно рекомендовать следующие среды.

Первая среда (в %): глюкоза — 2; сахароза — 2; NH_4NO_3 — 0,02; K_2HPO_4 — 0,1; кукурузный экстракт (сухое вещество) — 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; ZnSO_4 — 0,01; FeSO_4 — 0,001.

Вторая среда (в %): глюкоза — 1; сахароза — 1; перевар Хоттингера (об. %) — 4; K_2HPO_4 — 0,05; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,05; ZnSO_4 — 0,001; FeSO_4 — 0,001.

Среды, пригодные для выделения микроорганизмов, не всегда благоприятны для образования ими антибиотических веществ. Так, многие стрептомицеты хорошо растут на простых синтетических средах, но не все штаммы синтезируют на этих средах антибиотические вещества. Иногда для выработки антибиотика организм необходимо культивировать на натуральных средах, таких, как бульон Хоттингера, картофельный отвар и т.п. Аналогичное явление имеет место и в отношении некоторых видов бактерий и мицелиальных грибов. Например, для выяснения антибиотического действия стрептомицетов рекомендуется среда следующего состава:

Соевая мука, г	10
Глюкоза, г	10
NaCl, г	5
CaCO ₃ , г	1
Вода, мл	1000

pH такой среды следует поддерживать на уровне 6,8.

При выделении продуцентов новых антибиотиков для культивирования микроорганизмов следует шире применять различные селективные среды, в том числе и среды, содержащие антибиотики.

ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ МИКРОБОВ — ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИКОВ

Высев почвенной взвеси в воде на поверхность агаровой пластинки. Определенную навеску почвы, тщательно растертую в ступке с небольшим объемом воды, количественно переносят в колбу со стерильной водой. Содержимое колбы встряхивают в течение 5 мин, а затем из водной суспензии делают ряд последовательных разведений, которые высевают на соответствующую агаризованную среду.

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

Каждую чистую культуру микроорганизма пересевают на различные по составу среды и после достаточно хорошего развития проверяют ее антибиотические свойства.

Высев почвы на питательный агар, предварительно засеянный тест-организмом. Поверхность питательного агара засевают тест-культурой необходимого организма, после чего на агаровую пластинку раскладывают небольшие (не более просяного зерна) комочки почвы или же почву наносят в виде пыли, распределяя ее по всей поверхности пластинки. Затем чашки помещают в термостат и через определенный промежуток времени (24–48 ч, а

иногда и более) просматривают кусочки почвы или отдельные ее участки, вокруг которых образовались зоны задержки роста тест-организма. Из этих участков выделяют чистые культуры организмов и изучают их.

Метод можно модифицировать. На чашки Петри с мясопептонным агаром, предварительно засеянным тест-организмом, микробиологической петлей наносят отдельными каплями взвесь почвы. На каждую чашку наносят 10–20 капель, которые, подсыхая, оставляют после себя изолированные комочки почвы. Через 1–2 сут нахождения чашек в термостате при 26–35 °С комочки почвы обрастают колониями и вокруг некоторых из них обнаруживаются зоны задержки роста тест-организма. Комочки, окруженные зонами, рассеивают на свежие чашки с агаром, и после того как вырастут отдельные колонии, их отсеивают для получения чистых культур, которые исследуют.

Метод обогащения почвы. Почву, из которой предполагают выделить антагонисты, обогащают организмами тех видов, по отношению к которым хотят получить антагонист. С этой целью к образцам почвы, помещенным в стеклянные сосуды, систематически добавляют отмытую суспензию нужных микроорганизмов.

Затем через определенные промежутки времени такая почва высевается в виде отдельных комочков на агаровые пластинки в чашках Петри, предварительно засеянные тем же самым организмом, который использовался для обогащения почвы.

Метод центрифугирования почвенной суспензии. Для выделения стрептомицетов из почв, и особенно из почв в весеннее время, когда в ней развивается большое число грибов и бактерий, применяют метод центрифугирования почвенной взвеси. Метод основан на различии скоростей оседания отдельных видов микроорганизмов в центробежном поле. При 3000 об/мин в течение 20 мин частицы, соответствующие по размерам спорам плесеней или клеткам бактерий типа *B. mesentericus*, *B. mycoides*, *B. subtilis*, осаждаются на дно пробирки. Частицы же, соответствующие по размерам спорам или отдельным обрывкам мицелия стрептомицетов, при данной скорости центрифугирования оказываются в поверхностном слое жидкости.

Высевая надосадочную жидкость, в большинстве случаев (до 92%) на пластинках питательного агара удается получить только колонии актиномицетов.

Метод замораживания–оттаивания почвы. Известно, что в почве микроорганизмы находятся в адсорбированном на частицах состоянии. Для полноты десорбции микроорганизмов с почвенных частиц применяют химические методы, при которых почвенные образцы обрабатывают различными детергентами, и физические, в основе которых лежит метод механического растирания образцов почвы.

Для лучшей десорбции микроорганизмов с почвенных частиц рекомендуется использовать метод замораживания–оттаивания почвы. Суть метода состоит в следующем. Отобранный для выделения стрептомицетов образец почвы помещают в испаритель бытового холодильника при температуре -8°C . Через час образец извлекают из холодильника и выдерживают при комнатной температуре до полного оттаивания. Процедуру замораживания–оттаивания повторяют дважды. Затем навеску почвы помещают в стерильную водопроводную воду, взбалтывают суспензию в течение 15 мин на круговой качалке при 230 об/мин, после чего различные разведения суспензии высевают на питательную агаровую пластинку в чашках Петри.

Метод замораживания–оттаивания образцов почвы позволяет обнаружить в них в 1,2–3,6 раза больше стрептомицетов, чем в тех же образцах без замораживания.

Обработка почвенного образца карбонатом кальция. Увеличение числа выделенных культур стрептомицетов примерно на два порядка наблюдается при обработке почвенного образца карбонатом кальция и при инкубировании во влажных условиях. Впервые метод был предложен П. Тсао с соавторами в 1960 г. и модифицирован И.В. Алферовой и Л.П. Тереховой в 1988 г. Образец почвы смешивают с порошком карбоната кальция в соотношении 10 : 1 и инкубируют во влажной камере при температуре 28°C . Влажность обеспечивается путем помещения в чашки Петри кусочков фильтровальной бумаги, пропитанных дистиллированной водой и прикрепленных к крышке чашки.

Увеличение общего числа выделяемых актиномицетов из таких образцов почвы, по-видимому, связано с тем, что ионы кальция инициируют прорастание спор стрептомицетов.

Применение питательных сред, содержащих антибиотики. Высев почвенной суспензии на агаровые пластинки вызывает трудности для развития редко встречающихся видов актиномицетов в результате быстрого размножения бактерий и широко распространенных в почвах видов актиномицетов. Поэтому для направленного выделения определенных групп микроорганизмов в среды для посева почвенной суспензии добавляют различные антибиотики. При добавлении антибиотиков к среде для культивирования микроорганизмов обычная микрофлора подавляется и создаются условия для развития устойчивых к этим антибиотикам форм микробов; последние могут оказаться новыми или редкими видами, способными образовывать и новые антибиотики. Для этих целей часто используют антибактериальные и противогрибные препараты.

Для выделения актиномицетов применяют среды, содержащие в своем составе такие антибиотики, как тетрациклины, неомицин, нистатин, стрептомицин, хлорамфеникол, пенициллин и др.

При выделении продуцентов новых антибиотических веществ используют среды, содержащие стрептомицин в концентрациях от 25 до 100 мкг/мл и рубомицин — от 5 до 20 мкг/мл. В случае добавления к среде стрептомицина значительно подавляется рост наиболее часто встречающихся видов *S. griseovariabilis*, *S. flavochromogenes*, *S. griseolis*, *S. aureofaciens*, *S. griseus* и др. и выделяются виды актиномицетов, которые не обнаруживались на той же среде без стрептомицина. С повышением концентрации стрептомицина в среде общее количество выделяемых стрептомицетов уменьшается, однако при этом вырастают новые виды актиномицетов.

Внесение в среду для высева почвенной суспензии рубомицина в значительной степени подавляет рост стрептомицетов и нокардия. Довольно устойчивы к этому антибиотику представители секций *Roseus*, *Helvolo-Flavus* и *Albus*. В указанных условиях в значительном количестве вырастают виды стрептомицетов, не образующие воздушный мицелий. Продуценты, например, аминогликозидных антибиотиков могут быть найдены, как правило, только среди стрептомицетов, устойчивых к действию этих антибиотиков.

Большое внимание уделяется поиску новых антибиотиков, образуемых сравнительно небольшим родом актиномицетов *Micromonospora*. Их редкая встречаемость в природных источниках (почва, илы) потребовала разработки соответствующих методов их выделения. По предложению М.В. Бибиковой, Л.П. Иваницкой и др. (1989) для выделения микромоноспора применяют селективные среды, содержащие 1 мкг/мл гентамицина, который подавляет рост быстрорастущей микрофлоры, в том числе и стрептомицетов. Это дает возможность в 2–3 раза повысить число развивающихся колоний микромоноспора и при этом в 3 раза увеличить число штаммов, способных вырабатывать антибиотики.

Представителей рода *Actinomadura* обычно выделяют из почв на богатых питательных средах, содержащих антибиотики.

Обработка почвенной суспензии УФ-светом. Для селективного выделения определенных групп актиномицетов наряду с другими методами используют метод предварительной обработки природных субстратов физическими факторами. Известно, что различные группы актиномицетов обладают неодинаковой чувствительностью к ультрафиолетовому (УФ) облучению.

О.А. Галатенко и Л.П. Терехова (1990) для преимущественного выделения из почвы редких видов актиномицетов (*Mycromonospora*, *Nocardiosis*, *Amicolatopsis*) предложили метод предварительного облучения почвенной суспензии УФ-светом.

Почвенную водную суспензию, разведенную в зависимости от образца почвы в отношении 1 : 10², 1 : 10³, 1 : 10⁴, в количестве 0,05 мл наносят на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри

и облучают УФ-светом с помощью бактерицидной лампы БУВ-15. Облучение проводят на расстоянии 20 см от источника света в течение 30 с — 2 мин. При такой обработке почвенной суспензии снижается выделение актиномицетов рода *Streptomyces* и увеличивается развитие представителей редких родов, особенно *Micromonospora*.

Использование СВЧ (волн сверхвысокой частоты). Т.И. Булина и др. (1999) для выделения из почвы редких видов актиномицетов предложили следующий метод.

Образец почвы растирают в ступке, просеивают через сито и перемешивают. 1 г почвы суспендируют в 100 мл воды, встряхивают в течение 10 мин и разводят 1 : 1000. В стерильные пробирки переносят по 2,5 мл суспензии и обрабатывают волнами СВЧ. Для этого можно использовать микроволновую печь марки «Pluton» с рабочей частотой 2640 МГц.

Наилучший эффект наблюдается при режиме облучения суспензии мощностью 80 Вт в течение 30 с. При этих параметрах обработки суспензии СВЧ-волнами споры актиномицетов проявляют наибольшую устойчивость.

Облученную почвенную суспензию разводят дистиллированной водой в 10 раз и высевают на поверхность агаровой среды по 0,05 мл на чашку. Используют среды с антибиотиком леворином (в концентрации 20 мкг/мл для ингибирования роста грибов) и налидиксовой кислотой, т.е. нефторированным хинолоном (10 мкг/мл — для подавления роста эубактерий, обладающих стелющим ростом) и без них. При этом наблюдается увеличение выделения форм редких родов актиномицетов. Среда с антибиотиком и хинолоном наиболее благоприятна для *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Saccharothrix*, *Promicromonospora* и др. Среда без ингибиторов способствует выделению таких редких родов, как *Amycolata*, *Amycolatopsis*, *Nocardioides* и некоторых других.

Известны и иные методы выделения продуцентов антибиотических веществ из естественных мест их обитания.

Как уже отмечалось, по мнению некоторых микробиологов, к настоящему времени выделено и изучено не более 0,01% всех имеющихся в природе микроорганизмов. Поэтому необходимо изучать и разрабатывать новые приемы выделения микробов, которые бы способствовали максимальному обнаружению их в природе.

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ — ПРОДУЦЕНТОВ АНТИБИОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

После того как микроорганизм, обладающий ценными антибиотическими свойствами, тем или иным способом выделен из субстрата, необходимо определить его принадлежность к определенному

виду, установить таксономическое положение этого штамма. Для указанных целей используют большой спектр признаков: культуральные свойства, морфологию и организацию клеток, физиологические и биохимические особенности организма, химический состав клеток, содержание гуанина и цитозина (ГЦ) в ДНК, ДНК-ДНК-гибридизацию и т.д.

Определенную помощь при идентификации видов стрептомицетов — продуцентов антибиотических веществ, принадлежащих к одной группе, оказывает метод, основанный на специфическом действии микробов-антагонистов. Эта специфика состоит в том, что, например, продуценты стрептомицина, выделенные в различных 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 так называемого перекрестного антагонизма.

Метод перекрестного антагонизма. Сущность метода состоит в следующем. 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 организма. При этом обнаруживается, что один вид стрептомицета-антагониста может подавлять рост других видов стрептомицетов и не подавляет развитие своего вида (табл. 30).

Таблица 30

Перекрестный антагонизм у некоторых видов стрептомицетов
(по Красильникову, 1951)

Вид стрептомицета-антагониста	Тест-организмы					
	<i>S. ruber</i>	<i>S. violaceus</i>	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. griseus</i>	<i>S. globisporus</i>	<i>S. longisporus</i>
<i>S. ruber</i>	—	+	+	+	+	+
<i>S. violaceus</i>	+	—	+	+	+	+
<i>S. coelicolor</i>	+	+	—	+	+	+
<i>S. griseus</i>	+	+	+	—	+	+
<i>S. globisporus</i>	+	+	+	+	—	+
<i>S. longisporus</i>	+	+	+	+	+	—

Примечание. Знак «—» — отсутствие подавления роста; знак «+» — подавление роста.

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

Однако необходимо 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. Так, *S. griseus* не подавляет роста *S. rimosus*, хотя это совершенно разные виды. Или в присутствии *S. lavendulae* не замедляется развитие *S. griseus* (табл. 31).

Таблица 31

Явления перекрестного антагонизма между отдельными видами стрептомицетов
(no Teillon, 1953)

Вид стрептомицета-антагониста	Тест-организмы					
	<i>S. griseus</i>	<i>S. griseus</i> № 241	<i>S. aureofaciens</i>	<i>S. rimosus</i>	<i>S. fradiae</i>	<i>S. lavendulae</i>
<i>S. griseus</i>	-	+	+	-	+	+
<i>S. griseus</i> № 241	+	-	+	+	+	+
<i>S. aureofaciens</i>	+	+	-	-	+	+
<i>S. rimosus</i>	+	+	-	-	+	+
<i>S. fradiae</i>	+	+	+	-	-	+
<i>S. lavendulae</i>	-	+	+	-	-	-

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 антибиотическому веществу. В основу этого метода положены два главных признака, связанных с образованием и действием антибиотиков.

1. Каждый антибиотик вырабатывается одним или несколькими определенными видами микробов.

2. 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 о химическом сходстве или различии этих веществ.

Для исследования этого явления изучаемый организм высевают на поверхность питательного агара в виде штриха или в виде отдельной макроколонии в центре чашки Петри. Вырабатываемое организмом антибиотическое вещество диффундирует в окружающий агар и создает определенную зону. Пересекая эту зону чувствительными и устойчивыми к определенному антибиотику микроорганизмами, выясняют сходство биологического действия изучаемого препарата с известным антибиотиком.

Установив такое сходство, можно предположить, что изучаемое соединение относится к определенной группе антибиотических веществ 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 антибиотики вырабатываются только плесневыми грибами, но последующие исследования показали, что антибиотические вещества этой природы образуют некоторые виды стрептомицетов и собственно бактерий.

Метод хроматографии. Для идентификации антибиотиков и их продуцентов применяют метод хроматографии, открытый выдающимся русским ученым М.С. Цветом еще в 1903 г. и теперь очень широко используемый в лабораторной практике. Метод особенно важен при идентификации антибиотиков на ранних стадиях исследования.

Иногда метод хроматографии необходимо дополнить данными методов электрофореза, которые помогают выяснить прежде всего ионный характер антибиотика.

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

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

Наиболее распространенным методом обнаружения антибиотиков на хроматограммах является биоавтографический метод. При этом высушенные в вытяжном шкафу полоски бумаги накладывают на агаровую пластинку, предварительно 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-микроба, образующимся вокруг тех мест на хроматограмме, где находится пятно антибиотика, во-первых, судят об однородности антибиотика, во-вторых, сравнивают полученные хроматограммы с хроматограммами известных антибиотических веществ (рис. 12).

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 антибиотиков включают способы, связанные: а) с выявлением люминесценции антибиотического пятна при воздействии УФ-излучения; б) с поглощением УФ-излучения и в) 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, характеризуемое коэффициентом R_f . Коэффициент 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.

При использовании метода хроматографии на бумаге для идентификации антибиотиков было показано, что значение R_f зависит также от системы растворителей, степени очистки изучаемого антибиотика и состава культуральной жидкости.

По спектру значений R_f , или, как его иногда называют, по хроматографическому спектру*, можно четко различать группы химически родственных антибиотиков и до некоторой степени отличать также антибиотики внутри групп (рис. 13).

* Хроматографический спектр представляет собой ломаную линию, характеризующую подвижность антибиотика при хроматографировании с использованием определенного набора систем растворителей.

Существенное значение при использовании бумажной хроматографии для идентификации антибиотиков имеет разработка методов, позволяющих проводить эти исследования на ранних этапах изучения антибиотических веществ, т.е. на стадии культуральных жидкостей. Однако при этом сильно затрудняется разгонка антибиотиков, так как факторы, влияющие на значение R_f , часто встречаются при использовании культуральных жидкостей.

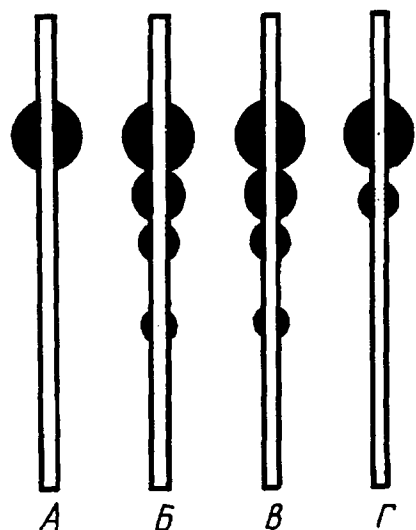


Рис. 12. Использование метода бумажной хроматографии для разделения пенициллинов, образуемых *Penicillium chrysogenum* (штамм Q-176) при развитии на кукурузной среде с лактозой. А — стандартный раствор бензилпенициллина; Б, В — хроматотраммы производственных образцов 1950 г.; Г — хроматограмма конечного препарата калиевой соли (1950) (по Герольду, 1957). За пятном бензилпенициллина (вверху) следуют: пенициллин F, дигидро F и самая нижняя зона — пенициллин К

Преодолеть эти затруднения удалось с помощью методов лиофилизации фильтратов культуральных жидкостей и экстрагирования их соответствующими растворителями. Сущность схемы хроматографической идентификации антибиотиков из культур на стадии малоактивных культуральных жидкостей состоит в следующем.

Культуральную жидкость с антибиотическими свойствами фильтруют и измеряют 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

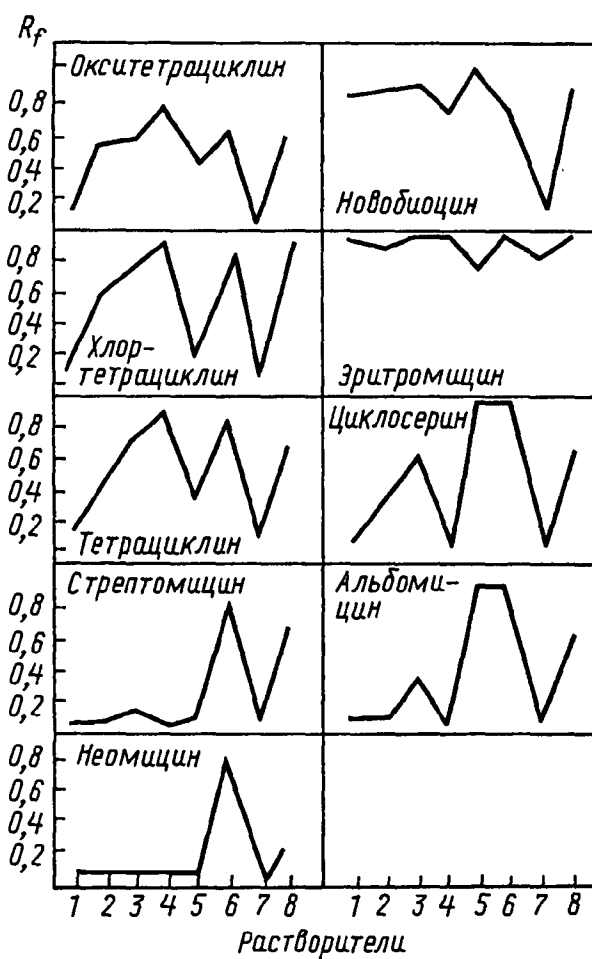


Рис. 13. Хроматографические спектры некоторых известных антибиотиков (по Доскачиловой и Вондрачек, 1961)

течение часа. Растворители берут в таком количестве, которое, как правило, позволяет получить 5–10-кратные концентрации по сравнению с исходной культуральной жидкостью. Антибиотическую активность водного раствора и спиртового экстракта определяют методом бумажных дисков.

Если антибиотическая активность спиртового экстракта близка к активности водного раствора лиофилизата, то проводят хроматографирование в соответствующей системе. Хроматограммы проявляют биоавтографически на чашках с *B. subtilis*. Одновременно проводят электрофорез в ацетатном и фосфатном буферных растворах.

Если для изучаемого антибиотика во всех системах первого типа значение R_f будет около 0,8 и выше, то спиртовой экстракт хроматографируют в другой системе. При помощи набора этой системы можно увереннее отличить антибиотики типа эритромицина — олеандомицина, типа карбомицина, типа актиномицина и хлорамфеникола.

Полученные данные позволяют в определенной степени идентифицировать антибиотик, или включить его в группу химически близких веществ, или, наконец, идентифицировать его как новый.

Антибиотик, отнесенный к группе макролидных веществ, наиболее детально идентифицируется с помощью нисходящей хроматографии в системах типа Заффарони: бензолформамид и хлороформформамид. Если же антибиотик принадлежит к другим группам соединений, то используют групповые системы.

Итак, если в результате идентификации выделенного микроорганизма установлено, что он является новым видом и антибиотическое вещество, образуемое им, не принадлежит к уже описанным соединениям, то и организм, и антибиотик должны быть детально исследованы. С этой целью прежде всего изучают условия культивирования микроба, обеспечивающие максимальное образование антибиотика. При подборе сред необходимо 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 максимальную выработку антибиотического вещества.

МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ АНТИБИОТИКОВ

Выделение антибиотиков и их очистка осуществляются разными способами, выбор которых зависит от химической природы антибиотика, характера сопутствующих антибиотику продуктов жизнедеятельности организма (органические кислоты,

аминокислоты, пигменты и другие соединения), неиспользованных компонентов среды (углеводы, масла, азотсодержащие вещества, неорганические соли и др.), а также от того, где накапливается это вещество — в культуральной жидкости или в клетках продуцента.

Основная задача первых этапов выделения антибиотического вещества — концентрирование биологически активного соединения и очистка от сопутствующих балластных веществ.

Основными методами выделения антибиотиков из нативных растворов (культуральная жидкость, освобожденная от биологической массы продуцента) можно назвать следующие: осаждение антибиотика, методы экстракции 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 трудной является десорбция (элюирование) препарата. Выделение антибиотика из клеток продуцента осуществляют методом экстракции.

Антибиотик, выделенный одним из указанных способов, представляет собой лишь технически чистый препарат, который не может еще использоваться в медицинской практике. Дальнейшая очистка препарата осуществляется или путем повторной сорбции, перекристаллизации, растворения антибиотика в органических растворителях, или иными методами (подробнее об этом см. на с. 484).

Антимикробный спектр и токсичность

После того как антибиотическое вещество с помощью того или иного метода выделено и хорошо очищено, оценивают его биологическую активность по отношению к широкому ряду микроорганизмов (проверяют широкий антимикробный спектр). Кроме того, антибиотик исследуют на стерильность, токсичность, пирогенность, испытывают в отношении действия на лейкоциты крови и определяют другие показатели.

Цель выяснения стерильности готового препарата — установление отсутствия в нем спор микроорганизмов, прежде всего патогенных. Для этого необходимо, если возможно, инактивировать антибиотическое вещество, а затем нанести его на разнообразные по составу питательные среды (мясопептонный бульон, печеночный бульон, кровяной агар и т.п.).

Пенициллин инактивируют с помощью фермента пенициллиназы (пенициллин- β -лактамазы) или пенициллинацилазы либо

солянокислого гидроксиламина. Стрептомицин инактивируют при помощи гидроксиламина или цистеина.

Многие антибиотики не удается инактивировать, поэтому их стерильность оценивают лишь в отношении форм микроорганизмов, устойчивых к этим антибиотикам. Можно также пропускать антибиотик через мембранные фильтры, задерживающие клетки и споры бактерий, и проращивать фильтры на агаровых пластинках.

Токсичность антибиотика проверяют на экспериментальных животных, которым в определенный период внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно или иными путями вводят различные дозы изучаемого антибиотика. За такими животными ведут тщательные наблюдения. При отсутствии внешних изменений в поведении животных в течение 12–15 сут считают, что антибиотик не обладает заметными токсическими свойствами. Это, разумеется, первый и предварительный этап в изучении токсичности антибиотика. При более глубоком исследовании этого вопроса выясняют влияние препарата на отдельные ткани и органы животных.

Некоторым антибиотикам свойственна кумулятивная токсичность, которая при многократном применении препарата накапливается без каких-либо внешних проявлений, но в итоге приводит к сильному отравлению или, в крайнем случае, к гибели организма. Это скрытая токсичность, противоположная острой, проявляющейся сразу же после первого введения антибиотика.

Отсутствие местной и общей токсичности антибиотика, отсутствие пирогенности и угнетения деятельности лейкоцитов, сохранение антибиотической активности препарата в присутствии сыворотки крови, гноя и других веществ, необходимый спектр антимикробного действия дают основания для дальнейшего испытания изучаемого препарата как лечебного вещества.

Вместе с этим необходимо определить характер биологического действия антибиотика, иными словами, выяснить, является ли антибиотик бактериостатическим или бактерицидным. Знание характера действия препарата может создать первичное представление о механизме его антибактериальных свойств.

Лечебные свойства антибиотиков

Следующий этап изучения антибиотика — определение его фармакологических и терапевтических свойств.

Лечебные свойства антибиотиков проверяют на экспериментальных животных, зараженных соответствующей дозой определенного вида патогенного микроба. Обычно используют дозы

инфекции с таким расчетом, чтобы вызвать гибель 50% (LD_{50}) или 100% животных (LD_{100}). LD_{50} — минимальная смертельная доза. Животных делят на три группы. Одной группе антибиотик вводят сразу же после заражения; вторая группа подвергается обработке антибиотиком через некоторое время после заражения (через 5 ч или позже). Во всех случаях применяют максимальные дозы антибиотика, которые переносятся животными. Третья группа подопытных животных не подвергается обработке антибиотиком — это контроль.

По количеству выживших особей в опытных группах судят о терапевтической ценности изучаемого антибиотического вещества. Минимальное количество антибиотика, способствующее предохранению животного от смертельной дозы инфекции, составляет минимальную терапевтическую дозу. Вместе с тем отдельные антибиотические вещества, имеющие лечебные свойства, в определенных концентрациях токсичны по отношению к макроорганизму. Если лечебная доза антибиотика ниже токсичной, то такой препарат может быть использован в медицинской практике. Если терапевтическая доза равна токсичной или приближается к ней, то широкое применение такого антибиотика в лечебной практике не разрешается.

Часто изучаемый антибиотик по тем или иным причинам не может быть использован в медицинской практике, тогда его следует испытать в сельскохозяйственном производстве или в отдельных отраслях пищевой и консервной промышленности.

Только после всестороннего и глубокого изучения антибиотика можно говорить о перспективности или, наоборот, о непригодности его для практических целей.

Лабораторный регламент

Антибиотическое вещество, имеющее практическую значимость и являющееся новым препаратом, должно выпускаться в промышленных масштабах. Поэтому при изучении продуцента и образуемого им антибиотика в лабораторных условиях разрабатывается так называемый лабораторный регламент.

Лабораторный регламент — это технологический документ, которым завершаются научные исследования в лабораторных условиях по разработке метода получения антибиотика. Он служит основой для промышленного регламента. Задача лабораторного регламента — разработка оптимального метода производства антибиотического вещества.

Лабораторный регламент получения антибиотика включает следующие разделы.

1. Характеристика антибиотика. Включает название антибиотика, основное назначение, краткое описание свойств препарата, описание организма, образующего антибиотик, методы определения биологической активности, условия хранения.

2. Технологическая схема производства. В схеме указана последовательность работ по производству антибиотика с подразделением на стадии. Технологическая схема — основа будущей технологии промышленного получения препарата.

3. Сырье и материалы. Сообщаются требования, предъявляемые к качеству сырья и материалам, используемым при получении антибиотика в целях его максимального выхода и обеспечения повторяемости результатов. При этом необходимо ориентироваться на сырье и материалы, выпускаемые отечественной промышленностью.

4. Аппаратурная схема производства. Приводится схема процесса получения антибиотика с указанием аппаратов и приборов, их конструкции, размера и других характеристик, которые могут иметь значение при производстве антибиотика.

5. Изложение технологического процесса. Описывается процесс получения антибиотика на основе завершенных научных и экспериментальных исследований, выполненных в лабораторных условиях. Процесс включается в регламент в том случае, если удастся получить воспроизводимые результаты по качеству антибиотика и по его выходу.

Технологический процесс описывают по стадиям. Подробно указываются объемы, концентрации веществ, входящих в среду, рН среды, степень аэрации, растворители, пеногасители, условия перемешивания, продолжительность процесса развития продуцента, температура и другие показатели.

6. Отходы производства, технологические и вентиляционные выбросы в атмосферу, их использование и обезвреживание. Приводится перечень возможных отходов и выбросов в атмосферу, указывается наличие в отходах ценных веществ, даются рекомендации к их использованию, а также список веществ, вредных с точки зрения загрязнения окружающей среды, и способы их обезвреживания.

7. Контроль производства. Указываются особые требования к оборудованию (герметичность ферментера и всех коммуникаций, исправность и надежность работы мешалки и т.д.). Приводятся анализ качества сырья, соответствующего определенным стандартам; режимы стерилизации сред и отдельных веществ, воздуха; методы анализа процесса биосинтеза антибиотика и готовой продукции.

8. Техника безопасности, пожарная безопасность и производственная санитария. Дается перечень веществ, способных воспламеняться и взрываться. Все вещества, применяемые в процессе получения антибиотика, должны быть изучены с позиций техники безопасности, пожарной опасности и производственной санитарии.

9. Перечень производственных инструкций. Приводятся все инструкции, которые должны быть разработаны на основе лабораторного регламента.

10. Техничко-экономические нормативы. Указываются выходы конечного продукта и промежуточных продуктов; удельные нормы расхода сырья и материалов, удельные нормы технологических затрат (пара, воды, электроэнергии, сжатого воздуха).

11. Информационные материалы. В разделе должны быть указаны биологические и физико-химические свойства вещества, степень очистки, фармакологические свойства (преимущества и особенности), сравнение с показателями идентичных зарубежных препаратов, сведения о патентной чистоте антибиотика и методе его получения с перечислением охраняющих авторских свидетельств (патентов), сведения о вредности веществ, применяемых при получении препарата, и мерах предосторожности при работе с ними.

Пути повышения антибиотикообразующей способности микроорганизмов

В микробиологии, особенно в промышленной, и в науке об антибиотиках широко используется термин «штамм» микроорганизма. Какой же смысл вкладывается в этот термин?

Штамм — это относительно устойчивый или весьма стабильный вариант определенного вида микроорганизма, выделенный из точно обозначенного места обитания или полученный в результате естественной изменчивости вида либо в процессе мутагенеза. Штаммы микроорганизмов могут отличаться один от другого существенными признаками, например уровнем образования антибиотика (низкопродуцирующие, высокопродуцирующие или неспособные к его биосинтезу), отношением к тому или иному антибиотику (чувствительные, резистентные, зависимые), рядом морфологических признаков и признаками дифференциации клетки (имеющие воздушный мицелий стрептомицеты и не имеющие его, спорообразующие и бесспорные варианты) и т.д., а также незначительными особенностями, такими, как место выделения. Однако все эти так называемые штаммовые различия встречаются лишь в пределах одного и того же вида.

Микроорганизмы — продуценты антибиотиков, выделенные из природных субстратов, обычно имеют низкую антибиотическую активность. Так, разные штаммы *Penicillium*, выделенные из почв, образуют пенициллин при глубинном их выращивании в количестве от 10 до 30 ед./мл культуральной жидкости. Продуцент стрептомицина *S. griseus*, впервые выделенный З. Ваксманом с сотрудниками в 1944 г. из сильно унавоженной почвы, образовывал до 100 мкг/мл стрептомицина.

Понятно, что потребности медицины, сельского хозяйства и некоторых отраслей промышленности не могут быть удовлетворены без получения наиболее продуктивных штаммов организмов, образующих антибиотические вещества.

Поэтому перед наукой была поставлена задача разработать пути повышения биосинтеза практически ценных антибиотических веществ. При решении этой задачи необходимо применять три тесно связанных метода: 1) естественной изменчивости, 2) индуцированного мутагенеза и ступенчатого отбора наиболее активных форм продуцентов антибиотиков, 3) генно-инженерных манипуляций. Для выделенных штаммов должны быть изучены условия культивирования полученных вариантов в целях определения наиболее оптимальной биосинтетической активности.

МЕТОД ЕСТЕСТВЕННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ

В селекционной работе по получению активных продуцентов антибиотических веществ используют приемы, основу которых составляют методы и законы генетики.

Прежде всего при изучении вновь выделенных продуцентов антибиотиков стремятся отобрать наиболее активные варианты, имеющиеся в культуре.

Микроорганизмы, относящиеся к одному клону (клон — это генетически однородное потомство, образовавшееся из одной клетки), обладают естественной изменчивостью, т.е. среди клеток или спор одного и того же клона могут обнаружиться формы, отличающиеся по морфологическим или биохимическим, в том числе и антибиотическим, признакам. При этом клоновая культура микроорганизма превращается в генетически разнородную популяцию.

Разберем метод отбора наиболее активных антибиотикообразующих вариантов микроба, полученных в результате естественной изменчивости.

Популяцию клеток продуцента высевают на пластинку питательного агара в чашке Петри с таким расчетом, чтобы на ней получалось не более 40–50 изолированных колоний. После достаточно хорошего развития колоний проверяют их способность к образованию антибиотика (в основном двумя способами).

Первый способ. Выросшие колонии заливают расплавленным и охлажденным до 50–55 °С питательным агаром, содержащим тест-организм, чувствительный к изучаемому антибиотику. Затем чашки на 20–24 ч помещают в термостат при температуре, оптимальной для развития тест-культуры. За это время вокруг колоний образуются зоны отсутствия роста тест-организма. Размеры диаметра зон отсутствия роста вокруг колоний микроорганизма различны. Чем интенсивнее колония образует антибиотик, тем больше зона отсутствия роста тест-организма. Такие наиболее активные колонии легко обнаружить (рис. 14).

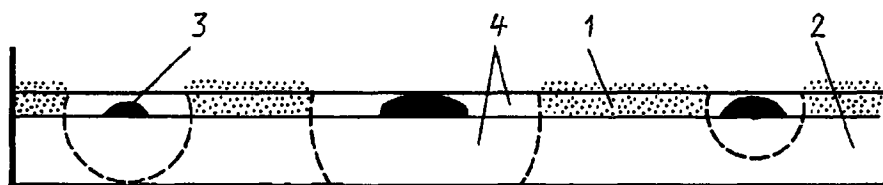


Рис. 14. Схема опыта по определению антибиотической активности колоний микроорганизмов методом заливки их питательным агаром, содержащим тест-организм: 1 — питательный агар с тест-организмом, 2 — питательный агар для развития колоний продуцента антибиотика, 3 — колония, 4 — зона диффузии антибиотика

Для выявления изменчивости, связанной с образованием антибиотиков у бактериальных организмов (споровых), на колонии перед заливкой расплавленного агара можно помещать стерильные диски фильтровальной бумаги, диаметр которых равен внутреннему диаметру чашки Петри. Таким диском фильтровальной бумаги прикрываются выросшие колонии бактерий, а расплавленный агар наливается на поверхность бумажного диска. Это облегчает последующее выделение наиболее активной колонии в чистом виде.

Для более объективного решения вопроса о возможности образования антибиотического вещества выросшими колониями иногда используют другой способ.

Второй способ. Подготавливают чашки Петри с питательным агаром, поверхность агаровой пластинки засевают тест-организмом. Затем в толще агаровой пластинки с помощью пробочного сверла или другого подобного приспособления делают лунки диаметром 6–8 мм. Из центра колонии изучаемого микроба вырезают агаровый блочок пробочным сверлом с внутренним диаметром, равным диаметру лунок. Агаровый блочок вставляют в лунку. На каждой чашке может быть сделано 6–7 лунок и, следовательно, испытано 6–7 различных колоний. Чашки с блочками, помещенными в лунки, переносят в термостат на 20–24 ч, после чего измеряют диаметры зон вокруг блочков. Чем больше диаметр зоны задержки роста тест-организма, тем активнее колония изучаемого организма.

При селекции наиболее активных штаммов продуцентов ряда антибиотиков, выделенных из естественных мест их обитания, используют среды, содержащие те же антибиотические вещества. Например, для выделения из почвы наиболее активных штаммов продуцента стрептомицина в агаровую среду, используемую для их посева, добавляют определенную концентрацию стрептомицина. Штаммы *S. griseus*, образующие большие количества антибиотика, способны выдерживать такую концентрацию стрептомицина и нормально развиваться в его присутствии. Менее активные штаммы не приспособлены к высоким концентрациям стрептомицина и в его присутствии не развиваются.

В питательную агаровую среду вносили стрептомицин в количестве 100 мкг/мл субстрата, а затем высевали выделенные штаммы стрептомицетов, относящиеся к *S. griseus*. В результате бактерии, чувствительные к этой концентрации стрептомицина, не развивались примерно в 80% случаев. Остальные 20% штаммов, среди которых были и довольно активные, выросли на этой среде. Этот метод оказался полезным для первичного исследования почвенных культур стрептомицетов.

ИНДУЦИРОВАННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И СТУПЕНЧАТЫЙ ОТБОР

Методы выделения наиболее активных форм, получающихся в результате естественной изменчивости, не дают значительного повышения продукции антибиотиков.

Решающий прием, обеспечивающий успех селекции многих продуцентов антибиотиков, — метод получения мутаций под влиянием сильнодействующих факторов, в том числе физических (рентгеновское излучение, ультрафиолетовое облучение, быстрые нейтроны), химических (азотистая форма иприта, этиленмин, аминопурин, нитрозогуанидин, гидроксилламин и др.), биологических (гены-мутаторы, транспозоны и др.).

При действии физических и химических факторов в течение определенного периода времени происходит полная гибель микроорганизмов. Однако можно подобрать экспозицию (концентрацию) и силу воздействия, при которых часть клеток или спор изучаемой популяции выживает. Среди таких выживших особей могут появляться формы с измененным характером отдельных звеньев обмена веществ, с другими свойствами, иными словами, мутанты с измененной генетической программой.

Наряду с формами, потерявшими способность образовывать антибиотик (а их обычно большинство), возникают такие, у которых обнаруживается значительное повышение продукции антибиотика. Такой индуцированный мутагенез с последующим

отбором нужных мутантов до настоящего времени остается одним из наиболее распространенных методов.

Высокоактивные штаммы выявляются теми же методами, которые используются и при отборе вариантов, возникающих в результате естественной изменчивости.

Довольно часто в селекционной работе применяют последовательное воздействие на организм различных факторов. В результате применения различных методов селекции удалось значительно (в 50–100 раз и более) увеличить образование таких важных антибиотиков, как пенициллин, стрептомицин, антибиотики тетрациклиновой группы и др. (табл. 32).

Таблица 32

Результаты селекции продуцентов некоторых антибиотиков
(по Захарову, Квитко, 1967)

Продуцент	Мутагенный фактор*	Образование антибиотика, ед./мл	
		исходным штаммом	полученным штаммом
Пенициллина	Р, УФ, АИ, ЭИ	220	5200
Стрептомицина	Р, УФ	250	4200
Хлортетрациклина	Р, УФ	600	2200
Эритромицина	УФ, ЭИ	500	1000
Альбомицина	Р	—	600% к исходному

* Р — рентгеновское излучение, УФ — ультрафиолетовое облучение, АИ — азотистый иприт, ЭИ — этиленимин.

Итоги селекции активного штамма продуцента хлортетрациклина *S. aureofaciens* приведены на рис. 15. Был взят исходный штамм со средней антибиотической активностью 600 мкг/мл (штамм 77), который подвергали ультрафиолетовому облучению; полученные варианты повторно облучали, действовали на них этиленимином, рентгеновским излучением. В результате были выделены два штамма: 2185 — с активностью 2800–3000 мкг/мл и штамм 2201, образующий 3000–3500 мкг/мл хлортетрациклина.

Существенное значение в селекционно-генетической работе имеет выход образующихся мутаций, который зависит от применяемого мутагена, его концентрации, дозы облучения, времени воздействия, а также от свойств самого организма. При селекции наиболее активных штаммов продуцентов антибиотиков необходимо иметь в виду, что частота морфологических мутаций микроорганизмов не всегда совпадает с частотой биосинтетических мутаций.

Иногда при селекции продуцентов антибиотиков, относящихся к плесневым грибам, используют анастомозные культуры, т.е. культуры, полученные в результате соединения двух развивающихся конидий перемычками, анастомозами. Образовавшиеся

таким образом гибридные формы продуцента пенициллина при действии на них ультрафиолетового облучения или этиленimina

давали большую частоту изменчивости.

Некоторые мутанты продуцировали до 5000 ед./мл пенициллина.

Селекцию стрептомицетов проводят, преследуя разные цели. Так, при селекции продуцента стрептомицина необходимо было получить штамм с высокими биосинтетическими свойствами и как можно меньшей способностью к образованию маннозидострептомицина, значительно снижающего биологическую активность стрептомицина в пересчете на единицу биомассы (мг).

Для получения высокоактивных штаммов продуцентов стрептомицина были использованы различные воздействия на стрептомицет. Вначале исходная культура, образующая до 200 мкг/мл стрептомицина, пересеивалась на среды, содержащие постепенно увеличивающиеся дозы стрептомицина. Удалось получить штамм, адаптированный к 400 мкг/мл антибиотика. Затем взвесь спор стрептомицета в дистиллированной воде подвергалась ультрафиолетовому и рентгеновскому облучениям в экспозиции, при которой гибель спор составляла 99%. Облученная суспензия с 1%

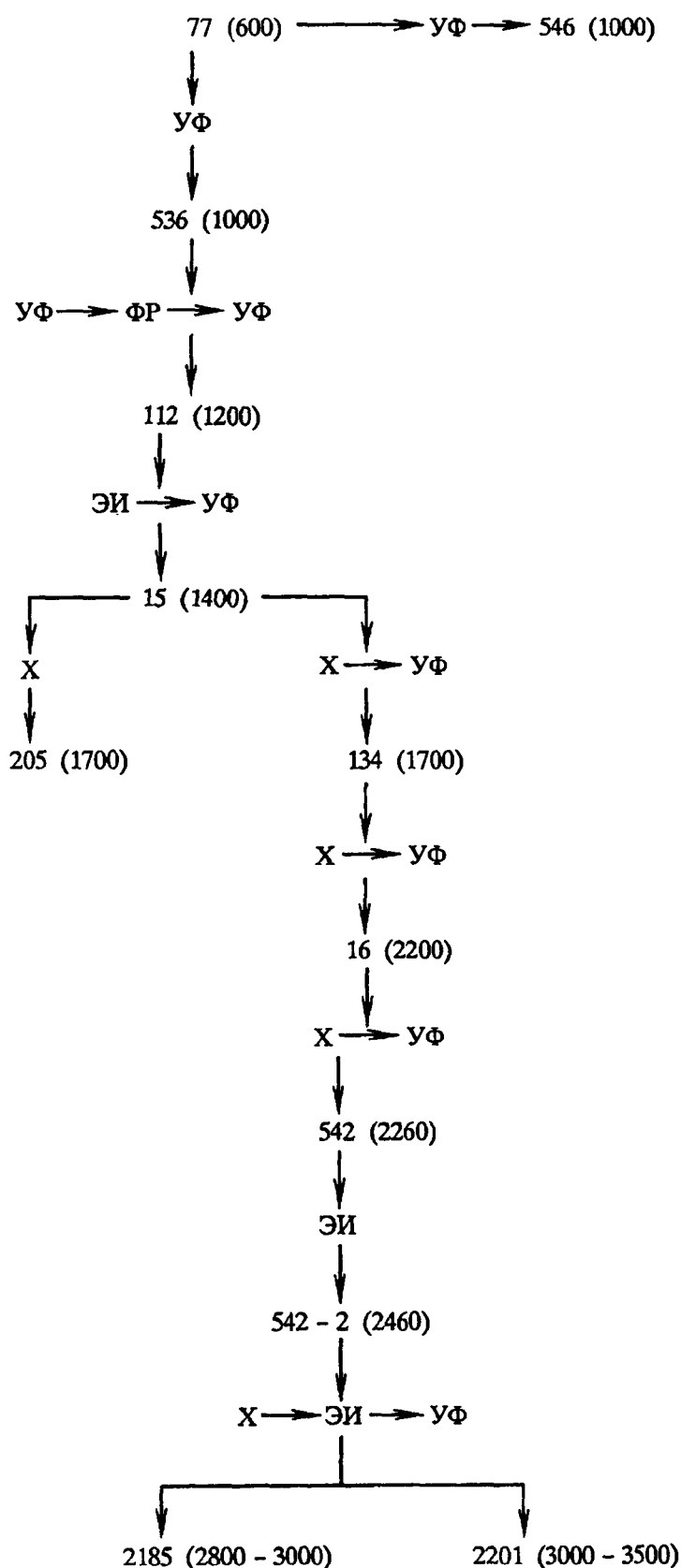


Рис. 15. Схема селекции активного штамма *Streptomyces aureofaciens* (по Гольдман, 1961): УФ — ультрафиолетовое облучение, ФР — фотореактивация, ЭИ — этиленимин, X — икс-лучи (рентгеновское излучение), цифры в скобках — антибиотическая активность (в мкг/мл)

выживших спор высевалась на чашки, и каждая выросшая при этом колония изучалась на способность к образованию стрептомицина. В результате этого был выделен вариант стрептомицета, вырабатывающий до 2000 мкг/мл стрептомицина (табл. 33).

Таблица 33

Схема селекции высокопродуктивного штамма продуцента стрептомицина
(no Dulaney, 1953)

№ п/п	Мутагенный фактор	Максимальный выход антибиотика, мкг/мл	№ п/п	Мутагенный фактор	Максимальный выход антибиотика, мкг/мл
1	Ультрафиолетовое облучение	250	5	Рентгеновское излучение	1000 1500
2	Естественная селекция	400	6	Ультрафиолетовое облучение	1000 1500
3	Ультрафиолетовое облучение	600	7	Естественная селекция	1000 1500
4	Ультрафиолетовое облучение	1000 1500	8	Ультрафиолетовое облучение	2000

Получены штаммы продуцентов стрептомицина, пенициллина, тетрациклинов, эритромицина и других антибиотиков, в несколько раз более продуктивные (иногда на порядок выше), чем в первые годы их выделения.

Например, в промышленности используются штаммы *Penicillium chrysogenum*, способные синтезировать до 50–55 тыс. ед./мл пенициллина, а штаммы *S. griseus* вырабатывают до 10–20 тыс. мкг/мл стрептомицина.

При создании высокопродуктивных штаммов микроорганизмов используют ряд других приемов, например конъюгацию плазмидами, слияние протопластов (даже межвидовых), трансформацию хромосомных генов и др.

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ МАНИПУЛЯЦИЙ

Широко распространенное клонирование регуляторных и структурных генов, контролирующих биосинтез различных антибиотиков, дало возможность использования их в целях повышения на один-два порядка антибиотической продуктивности многих штаммов стрептомицетов. Например, введение регуляторных генов в дикий штамм продуцента дауномицина *S. peuceticus* способно повысить биосинтез этого антибиотика в десятки раз.

Иногда при использовании указанного метода может происходить выработка реципиентом новых антибиотиков, не свойственных данному штамму.

Основной проблемой, связанной с использованием названного метода, является разработка приемов сохранения стабильности полученных штаммов.

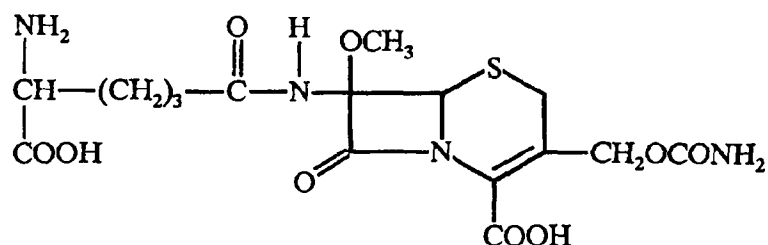
Протопластирование. Основные принципы протопластирования стрептомицетов были разработаны М. Оканиши и др. (1984).

Методы протопластирования применяются для многих микроорганизмов, в том числе и для продуцентов антибиотических веществ. При слиянии протопластов микроорганизмов осуществляются четыре основные стадии: 1) образование протопластов в результате лизиса клеточной стенки (для этих целей чаще используют лизоцим); 2) непосредственное слияние полученных протопластов; 3) культивирование образовавшихся в результате слияния структур в селективных условиях и 4) процесс регенерации. В результате протопластирования клеток и последующей регенерации протопластов удается повысить антибиотическую активность продуцентов антибиотиков, их фагоустойчивость и другие ценные свойства. При этом иногда наблюдаются морфологические изменения образовавшегося организма, элиминация плазмидных ДНК, биосинтез новых антибиотиков, а иногда и потеря антибиотической активности.

Биосинтез антибиотиков, отличающихся химическим строением от антибиотических веществ, продуцируемых исходными штаммами стрептомицетов, можно объяснить пробуждением в процессе слияния протопластов молчащих генов биосинтеза новых антибиотиков, детерминированных у родительских организмов, или же какими-то перестройками в геноме образовавшегося в результате слияния протопластов организма.

Потеря способности к продуцированию исходных антибиотиков у микроорганизма, полученного в процессе слияния протопластов, возможно, связана с изменениями экспрессии регуляторных генов, ответственных за биосинтез антибиотиков родительскими штаммами, или же с изменениями структурных генов, контролирующими биосинтетические пути.

Метод слияния протопластов позволяет получать гибриды промышленных штаммов стрептомицетов. Так, с помощью этого метода получены эффективные штаммы, продуцирующие антибиотик в больших концентрациях. В качестве примера можно указать на штамм *Streptomyces lactamdurans*, который обладает повышенной способностью к биосинтезу цефамицина С, относящегося к β-лактамным антибиотикам и имеющего следующее строение:



При слиянии протопластов двух штаммов *S. fradiae* (продуцентов аминогликозидного антибиотика неомицина) и макролидного антибиотика тилозина получены варианты, образующие антибиотики, отличающиеся от неомицина и тилозина. Эти штаммы способны синтезировать антибиотики, относящиеся к группе хинонов.

Методом регенерации протопластов удалось выделить и более активные продуценты макролидных антибиотиков (спирамицина, тилозина, цикламицина).

Недостаток метода состоит в том, что не всегда удается воспроизвести результаты в генерациях продуцента. Облучение клеток донора и реципиента дает в этом случае увеличение частоты рекомбинаций. Трансформация протопластов хромосомальной ДНК возможна лишь в том случае, если протопласты заключены в липосомы; при этом методе также возрастает частота рекомбинантов.

Таким образом, при использовании различных методов воздействия (индуцированный мутагенез, слияние и регенерация протопластов, трансформация хромосомных генов и др.) на микроорганизмы имеется возможность получить штаммы с высоким уровнем биосинтеза антибиотических веществ.

Изучение условий культивирования и сохранения выделенных штаммов продуцентов антибиотиков в активном состоянии

Не менее важную роль в увеличении выхода антибиотиков играют условия культивирования: состав среды, аэрация, температура и др. Так, подбор оптимальной среды для каждого полученного в процессе селекции варианта иногда дает возможность увеличить выход антибиотика в три и более раза.

Обычно с выделением нового варианта продуцента антибиотика довольно резко меняются его требования к условиям культивирования (аэрация среды, температура культивирования); удлиняется период процесса антибиотикообразования; могут меняться и другие параметры.

При получении нового варианта продуцента антибиотика важно выявить экономический эффект от внедрения его в практику. Иногда увеличение выхода антибиотика на 10–20% может оказаться экономически невыгодным, если при изменившихся условиях культивирования применяют более дорогостоящую среду или более жесткие условия регулирования процесса развития.

Следовательно, в вопросе увеличения выхода нужных антибиотиков существенную роль играют два тесно связанных фактора: селекция наиболее активных штаммов и изучение условий культивирования этих штаммов.

Важное значение для промышленного получения антибиотиков, а также для лабораторных исследований продуцентов антибиотических веществ имеют методы поддержания жизнеспособности организмов, позволяющие сохранять их антибиотическую активность на постоянном уровне.

Известно, что микроорганизмы, и особенно актиномицеты, легко изменяются при обычных методах их хранения. При этом довольно часто наблюдается полная или частичная потеря антибиотических свойств.

Нередко потеря активности наблюдается при культивировании микроорганизмов на богатых по составу средах и при частых посевах.

Вместе с тем изменение физиологических или биохимических свойств продуцентов антибиотических веществ может определяться их генетическими закономерностями. Известно, например, что продуцент грамицидина С в процессе развития диссоциирует на ряд вариантов; из них некоторые не образуют этот антибиотик. Причем процесс диссоциации бактерий идет в направлении возникновения в большом количестве биологически неактивных вариантов, что в конечном итоге приводит к полной потере культурой способности к синтезу грамицидина.

В настоящее время используют ряд методов сохранения продуцентов антибиотиков, обеспечивающих их длительное пребывание в активном состоянии. В основу этих методов положен принцип задержки развития микроорганизмов и принцип консервации. Для каждого вида продуцента антибиотических веществ должен быть подобран свой, наиболее подходящий метод консервирования, позволяющий сохранить клетки в активном состоянии в течение относительно длительного времени.

Наиболее распространенными методами сохранения продуцентов антибиотиков в активном состоянии являются следующие.

1 Лиофилизация клеток (высушивание из замороженного состояния).

2. L-высушивание клеток (высушивание под вакуумом из жидкого состояния).

3. Хранение вегетативных клеток или спор организмов в стерильной почве, стерильном песке или на семенах некоторых растений (например, на просе). По данным ряда авторов, клетки стрептомицетов, находящиеся в стерильной почве, сохраняют жизнеспособность в течение 30 лет и более.

4. Хранение спор в виде водных суспензий в запаянных ампулах.
5. Хранение спор в стерильном кварцевом песке.
6. Хранение культур на агаровом косячке под минеральным маслом.

7. Хранение культур при низких температурах (от 4 до -5°C).

8. Криоконсервация. В последнее время для сохранения различных микроорганизмов в активном состоянии используют рефрижераторы с азотом двух типов: газофазовым (температура -130 , -170°C) и жидким (-196°C), в которые помещают отмытую от среды суспензию клеток. Иногда в газообразной фазе жидкого азота сохраняют культуры стрептомицетов, находящиеся на агаровых блочках, вырезанных из агаровой пластинки в чашках Петри, мицелиальные грибы.

Наилучшая форма сохранения организмов, при которой не теряется антибиотическая активность, — их лиофилизация. Метод пригоден как для спорообразующих, так и для бесспорных культур микроорганизмов. Сущность метода состоит в том, что суспензия клеток или спор микроорганизма, приготовленная на среде, богатой белками (часто используется кровяная сыворотка), быстро замораживается при температуре от -40 до -60°C и высушивается под вакуумом до остаточной влажности (0,5–0,7%). После такой обработки ампулы со спорами или клетками лиофилизованного микроба запаивают. Лيوфилизованные бактерии сохраняются 16–18 лет, споры грибов не теряют основных свойств при хранении их в лиофилизованном виде в течение 10 лет.

Ценными и эффективными методами консервирования продуцентов антибиотиков следует считать также криоконсервацию и L-высушивание.

Определение антибиотической активности микроорганизмов

После того как микроб-антагонист выделен из естественного субстрата, его антибиотическую активность в отношении различных тест-объектов определяют одним из существующих методов.

При определении антибиотических свойств микробов важно учитывать факторы, влияющие на образование антибиотиков (см. гл. 4).

Антибиотические свойства микроорганизмов изучают при культивировании их на твердых (агаризированных) или в жидких средах.

Большинство методов определения антибиотической активности связано с культивированием изучаемого организма на агаризированных средах. Остановимся лишь на наиболее распространенных методах выявления антибиотических свойств микробов.

Метод перпендикулярных штрихов. Испытуемый организм высевается штрихом (полоской) на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри. После того как микроорганизм разовьется, перпендикулярно его штриху подсевают тест-организмы. Чашки помещаются в термостат на 20–24 ч. Если изучаемый организм оказывает антимикробное действие в отношении ряда тест-микробов, то последние будут расти вдали от штриха антагониста. Нечувствительные микробы будут развиваться в непосредственной близости от штриха изучаемого организма (рис. 16).

Метод штриха широко используется при поиске продуцентов антибиотических веществ, однако он имеет существенный недостаток. При этом методе применяют одну и ту же среду для культивирования изучаемого организма и для роста тест-микробов. Например, если для образования антибиотика необходима среда с нитратным источником азота, то она может быть совершенно непригодной для развития ряда тест-организмов. И наоборот, многие тест-организмы хорошо растут на среде, состоящей из бульона Хоттингера (эта среда довольно часто применяется), но не все организмы могут продуцировать на ней антибиотик. В этом случае антибиотическую активность организма можно не определить, хотя он и обладает этой способностью.

Метод агаровых блочков. Изучаемый организм высевают сплошным «газоном» на поверхность агаровой пластинки в чашке Петри. Среду используют благоприятную не только для роста организма, но и, самое главное, для образования им антибиотика. Иногда целесообразно высевать организм на разные по составу среды.

После того как продуцент хорошо разовьется, пробочным сверлом (диаметр примерно 8 мм) вырезают агаровые блочки, которые переносят на поверхность другой агаровой пластинки, предварительно засеянной одним тест-организмом. В одной чашке Петри можно разместить 5–7 агаровых блочков.

Чашки с агаровыми блочками помещают в термостат на 20–24 ч при температуре, благоприятной для развития тест-организма. Если выделяемый организмом антибиотик подавляет развитие тест-микроба, то вокруг агарового блочка образуется зона отсутствия роста. Чем больше выделяется антибиотика или чем активнее образуемое антибиотическое вещество, тем больше диаметр зоны отсутствия роста тест-микроба (рис. 17).

Метод высева антагониста на одной половине агаровой пластинки с последующим подсевом тест-микробов штрихами на другой половине агаровой пластинки. Чашку Петри разделяют стеклянной перегородкой пополам. В одну половину наливают питательный агар, благоприятный для развития изучаемого организма и образования антибиотика; другую половину чашки оставляют свободной. Иногда поступают иначе. В чашку Петри (без перегородки) наливают питательный агар, затем, когда агар застынет, стерильным скальпелем удаляют одну половину агаровой пластинки.

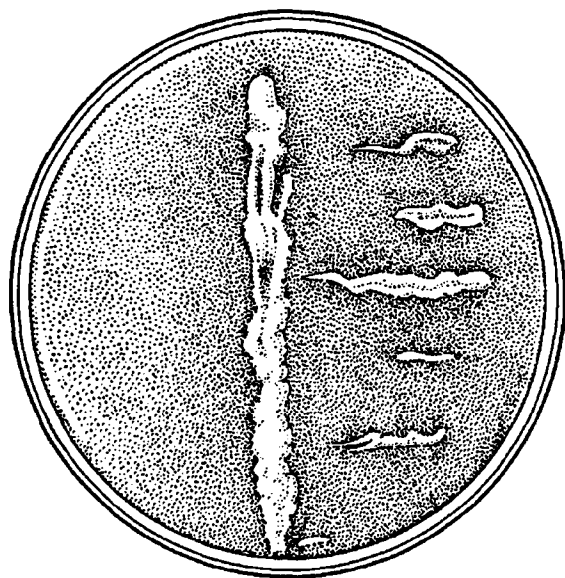


Рис. 16. Метод перпендикулярных штрихов для определения антагонистических свойств микроорганизмов

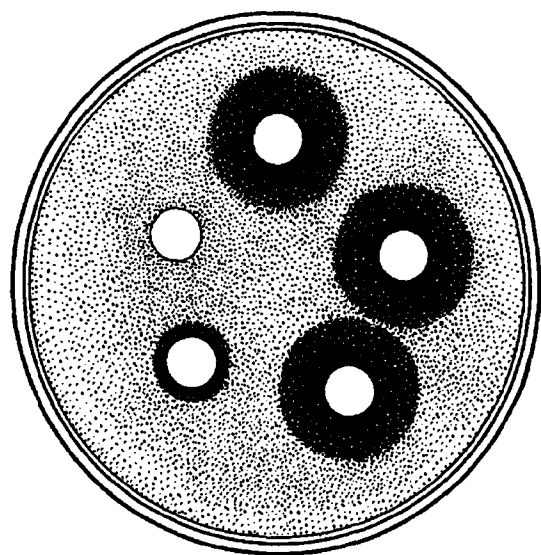


Рис. 17. Использование агаровых блочков с выросшим микроорганизмом для определения его антибиотических свойств

На половину агаровой пластинки высевают сплошным «газоном» изучаемый организм, и засеянные чашки помещают в термостат на определенное время для развития микроба. После этого на оставшуюся свободную часть пластинки в чашке наливают расплавленный питательный агар, пригодный для развития тест-организмов, которые высевают штрихами, перпендикулярными границе развития антагониста. Чашки вновь помещают в термостат на 20–24 ч при температуре, благоприятной для роста тест-организмов. Чувствительные тест-микробы будут расти на определенном расстоянии от антагониста, устойчивые же формы развиваются на протяжении всего штриха (рис. 18).

Метод агарового блочка, находящегося в центре чашки Петри. Так же как и при предыдущем методе, в чашке создают благоприятные условия для развития и антагониста, и тест-микроба.

В чашку Петри наливают питательный агар, пригодный для развития изучаемого организма с образованием антибиотического вещества, из расчета 20–25 мл на стандартную чашку. В застывшем агаре стерильным пробочным сверлом (диаметр 20–22 мм)

вырезают агаровые блочки, которые затем переносят в другие стерильные чашки Петри. В центр каждой чашки помещают по одному такому блочку (рис. 19, 1), затем в эти же чашки на

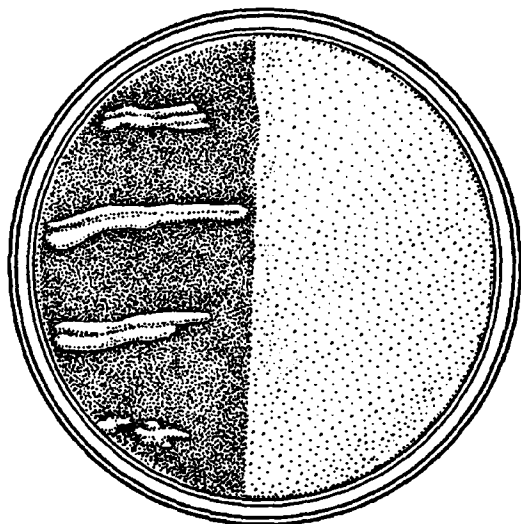


Рис. 18. Определение антибиотических свойств микробов, выросших на половине агаровой пластинки в чашке Петри

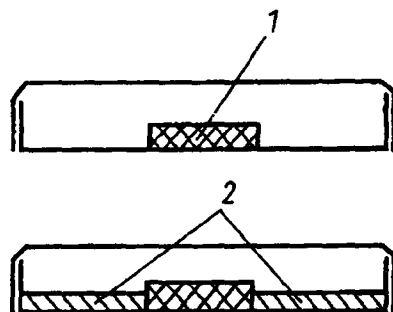


Рис. 19. Схема приготовления чашек Петри для определения антибиотических свойств микроорганизмов, выросших на поверхности агарового блочка, находящегося в центре чашки (по Егорову, 1957):

1 — агаровый блочок, 2 — агаровая среда, благоприятная для роста тест-организма

свободную их часть наливают питательный агар, пригодный для развития тест-микробов, с тем расчетом, чтобы уровень этого агара был на 1–1,5 мм ниже уровня блочка (рис. 19, 2). Для изучения бактериальных организмов приготовленные таким способом чашки необходимо немного подсушить, чтобы удалить конденсационную влагу.

После того как чашки подготовлены, изучаемый организм высевают микробиологической петлей на поверхность агарового блочка и чашки помещают в термостат на срок, обеспечивающий нормальное развитие организма. Затем по радиусам агаровой пластинки высевают штрихами тест-организмы и чашки

вновь на 20–24 ч помещают в термостат.

Отсутствие роста штриха тест-микроба на том или ином расстоянии от блока будет указывать на угнетение его антибиотическим веществом изучаемого организма. Если же

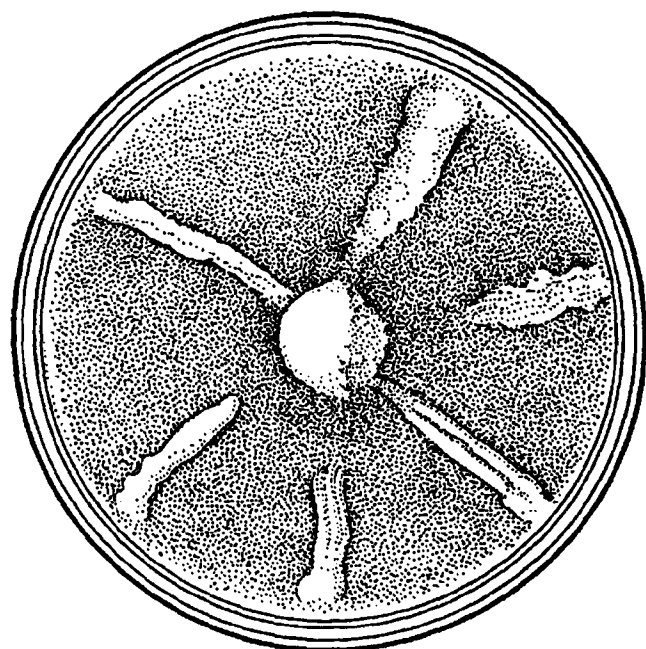


Рис. 20. Определение антибиотических свойств микроорганизмов методом агарового блочка, находящегося в центре чашки Петри (по Егорову, 1957)

штрих тест-микроба развивается в непосредственной близости от агарового блочка, то это означает, что данный организм устойчив к действию антибиотика изучаемого антагониста (рис. 20).

Для изучения стрептомицетов целесообразно агаровые блочки того же диаметра вырезать из среды, на которой уже вырос стрептомицет. Посев тест-микробов проводят сразу же после внесения агаровой среды в чашку или же чашку предварительно помещают на 18–20 ч в термостат при 26–30 °С, с тем чтобы накопившийся в блочке антибиотик лучше продиффундировал в окружающий агар.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ИХ В ЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

При определении антибиотических свойств микроорганизмов, культивируемых в жидких средах, необходимо иметь в виду, что некоторые антибиотики в процессе развития микробов накапливаются внутри клеток продуцента, практически не выделяясь в окружающую среду. Поэтому определять антибиотические свойства организмов следует как в культуральной жидкости, так и в экстрактах. Обычно для экстракции антибиотика из клеток продуцента применяют органические растворители (этиловый спирт, подкисленный этиловый спирт, ацетон и другие вещества).

Для оценки антибиотических свойств микроорганизмов, выросших в жидких средах, можно использовать метод последовательных разведений (см. с. 167–170) и метод бумажных дисков.

Метод бумажных дисков. На агаровую пластинку в чашке Петри высевают соответствующий тест-организм. Затем чашки с засеянным тест-микробом подсушивают в термостате при 37 °С в течение 15–20 мин. На одной чашке, т.е. в отношении одного тест-организма, одновременно может быть испытано 6–7 культуральных жидкостей продуцентов.

Диски из фильтровальной бумаги диаметром 8 мм заготавливают впрок, стерилизуют в автоклаве под давлением 10^5 Па в течение 20–30 мин.

Стерильный диск фильтровальной бумаги захватывают стерильным пинцетом и смачивают в испытуемой культуральной жидкости, затем накладывают на поверхность питательного агара, засеянного тест-микробом. Чашку с тест-организмом и бумажными дисками помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста тест-организма, на 24 ч для бактериальных форм тест-микроба и на 48–72 ч для грибных или дрожжеподобных.

В присутствии антибиотического вещества в испытуемой культуральной жидкости вокруг диска образуется зона задержки роста тест-микроба.

Кроме перечисленных, существуют методы с использованием лунок в толще агара и металлических цилиндриков, которые будут рассмотрены ниже (с. 173–174).

Приведенные методы пригодны для определения антибиотической активности микроорганизмов только в отношении бактерий, дрожжевых и дрожжеподобных организмов и мицелиальных грибов. Для выяснения антивирусного или антиопухолевого действия организмов в силу специфичности этих объектов используют другие методы.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИВИРУСНОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Вирусы — внутриклеточные паразиты и поэтому не могут развиваться в виде «чистой культуры» вне клеток своего хозяина. Это обстоятельство и заставляет применять другие методы первоначального отбора активных веществ, отвечающие особенностям развития вирусов.

Метод тканевых культур. Существует несколько вариантов метода тканевых культур, но наиболее удобен метод использования переживающих кусочков хориоаллантоидной ткани куриного эмбриона в модификации И. Тама, К. Фолкерса и Ф. Хорсфолла (1953).

Из верхней части куриного яйца с 10–11-дневным эмбрионом стерильными ножницами вырезают шесть кусочков скорлупы с прилегающей к ней тканью хориоаллантоидной оболочки. Кусочки ткани осторожно отделяют от скорлупы и промывают буферным раствором. Каждый такой кусочек помещают в пробирку с 1 мл среды следующего состава (%):

NaCl	0,68	NaH ₂ PO ₄	0,0125
KCl	0,04	NaHCO ₃	0,22
CaCl ₂	0,02	Глюкоза	1,0
MgSO ₄	0,01		

Кроме того, в каждую пробирку добавляют пенициллин (100 ед./мл), с тем чтобы предохранить ткань от загрязнения (развития микроорганизмов). Пробирки устанавливают в специальный, медленно (около 12 об./ч) вращающийся барабан.

Для выяснения антивирусного действия продуктов жизнедеятельности определенного организма кусочки ткани заражают соответствующим видом вирусов и вносят в пробирки, содержащие культуральную жидкость (при рН 7,0) исследуемого организма. Пробирки помещают в барабан на 48 ч.

Если культуральная жидкость обладает антивирусным действием, то в среде, окружающей ткань, не будет обнаружено вируса. При отсутствии антивирусного действия вирусы будут интенсивно размножаться в клетках ткани, что может быть легко обнаружено методом титрования на эритроцитах.

Метод оценки антивирусных свойств культуральных жидкостей различных микроорганизмов прост, удобен и позволяет сравнительно быстро получить необходимый результат при массовых испытаниях.

Метод с использованием листьев растений. Разработан относительно простой метод выяснения антивирусного действия антибиотиков в отношении вируса табачной мозаики.

Микроорганизм выращивают на агаровой пластинке в чашке Петри. После достаточно хорошего развития микроба из агара вырезают блочки, которые затем с помощью расплавленной желатины прикрепляют к листьям дурмана, предварительно зараженным вирусом табачной мозаики. Для предохранения от инфекции к желатине добавляют пенициллин. Листья дурмана с агаровыми блочками помещают на несколько дней во влажные камеры. В течение этого периода поверхность листа дурмана покрывается очагами некроза. Но если находяще-

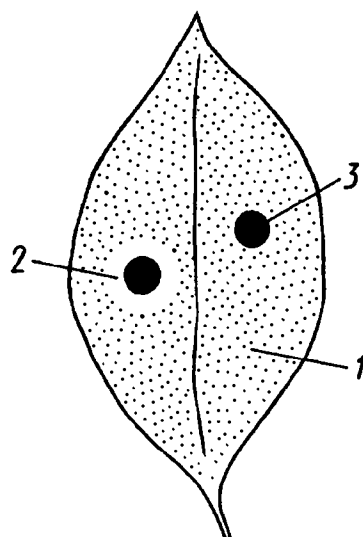


Рис. 21. Использование листьев дурмана для определения антивирусного действия антибиотиков (по Шорину и др., 1956):

1 — очаги некроза, вызванные вирусом табачной мозаики, 2 — противовирусное действие, 3 — отсутствие действия на вирусы

ся в агаровой блочке антибиотическое вещество, вырабатываемое изучаемым организмом, подавляет развитие вируса, то вокруг такого блочка некротических образований не будет. Поверхность листа в зоне действия антибиотиков свободна от поражения вирусом табачной мозаики (рис. 21).

Для окончательной оценки противовирусного действия антибиотических препаратов необходимо использовать животных (чаще всего мышей) или куриные эмбрионы, зараженные вирусами.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОФАГОВОЙ АКТИВНОСТИ

Бактериофаги обладают рядом свойств, общих с вирусами растений и животных. Фаги — это вирусы микроорганизмов. Определение противофаговой активности микроорганизмов основано на тех же принципах, что и определение противобактериальных свойств организмов.

Микроорганизм, изучаемый на антифаговые свойства, высевается на агаровую или в жидкую среду, благоприятную для образования антибиотического вещества. В качестве тест-объекта используют смесь бактерий и специфического для этих бактерий фага.

При использовании одного из диффузионных методов (метода агаровых блочков, лунок в толще агаровой пластинки, штрихов и т.д.) наблюдается следующая картина. Если антибиотическое вещество подавляет рост фага, то в зоне диффузии антибиотика будет происходить рост используемой бактерии, на остальной же поверхности агаровой пластинки под действием развивающегося фага бактерии будут лизированы и поверхность пластинки останется чистой.

Если же под действием изучаемого биологически активного вещества бактерии не развиваются и в зоне его диффузии, то это может означать, что используемый в опытах организм не образует противофаговое вещество или же вырабатываемое антибиотическое вещество подавляет развитие как фага, так и бактерии. Последнее легко проверить, если в качестве тест-организма взять только бактерию.

Противовирусным действием обладает ряд антибиотических веществ (эрлихин, лурин, фумагиллин, гелиомицин (резистомицин), вирусин и др.).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОТИВОРАКОВОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Не всегда антираковое действие препарата совпадает с антибактериальным или антигрибным действием, поэтому для определения противораковой активности культуральных жидкостей или очищенных препаратов в качестве тест-объектов используют непосредственно раковые клетки. С этой целью применяют методы, основанные на использовании экспериментальных животных, культуры тканей или свободноплавающих в отдельных полостях организма опухолевых клеток (асцитные клетки), но окончательно антиопухолевое действие испытуемого вещества оценивается в опытах на животных.

Методы с использованием экспериментальных животных. В качестве тест-объекта применяют клетки асцитного рака Эрлиха у мышей (клетки находятся в виде взвеси в асцитической жидкости животных). Взвесь асцитных раковых клеток смешивают с равным объемом изучаемого антибиотического препарата и смесь помещают в рефрижератор при 4 °С на 4 ч, после чего ее прививают мышам (подкожно).

Для контрольных животных вместо исследуемого препарата используют физиологический раствор. Через 10 дней мышам убивают

и определяют наличие опухолей и их размеры. Если изучаемый препарат убивает асцитные раковые клетки, то они, естественно, не образуют опухолей.

Тест-объектом могут служить клетки не только асцитного рака Эрлиха, но и других опухолей, полученных экспериментальным путем у мышей и крыс. Использование клеток различных опухолей связано с необходимостью более широкого изучения противоопухолевого действия исследуемых препаратов для более точного определения значения изучаемой культуральной жидкости или антибиотика в отношении их действия на раковые клетки.

Прежде чем использовать опухоль в качестве тест-материала, необходимо из опухолевых тканей получить тонкую взвесь. С этой целью применяют следующий метод.

В стерильных условиях вылушивают опухоль, тщательно очищают от некротических участков и несколько раз промывают стерильным физиологическим раствором. После этого отобранные в чашки Петри кусочки опухоли измельчают ножницами до получения гомогенной кашицы и разводят примерно в 2 раза стерильным физиологическим раствором. После тщательного размешивания взвесь фильтруют через два слоя стерильной марли. Затем определяют количество опухолевых частиц, содержащихся в 1 мл взвеси (подсчет проводят в камере Горяева). Если при подсчете оказывается, что количество частиц в 1 мл незначительно, то полученную взвесь концентрируют методом центрифугирования. Надосадочную жидкость отсасывают, а опухолевые клетки, осевшие на дно пробирки, разводят нужным объемом стерильного физиологического раствора.

В дальнейшем постановка опыта со взвесью опухолевых клеток, приготовленной из опухоли животных, такая же, как и с клетками асцитного рака Эрлиха. Различие лишь в некотором удлинении срока наблюдения (до 12 дней). В опыте с клетками асцитного рака Эрлиха наблюдение ведут в течение 10 дней.

Чашечный метод. Тест-объектом служат клетки асцитного рака, которые смешивают с теплой агаровой средой (пептон, глюкоза, плазма крови) и разливают в чашки Петри. На застывшую агаровую пластинку, содержащую клетки асцитного рака, накладывают агаровые блочки с выросшим микроорганизмом или диски фильтровальной бумаги, предварительно смоченные культуральной жидкостью или раствором очищенного препарата. Чашки помещают в холодильник на несколько часов для диффузии изучаемых веществ в толщу агара, содержащего асцитные раковые клетки ($2 \cdot 10^7$ клеток в 1 мл). После этого чашки ставят в термостат при 37°C на несколько часов и затем, вынув из термостата, освобождают от агаровых блочков или дисков фильтровальной

бумаги. Поверхность агаровых пластинок заливают 0,05%-м раствором метиленового синего. Чашки покрывают стеклянными пластинками и снова помещают в термостат на несколько часов. При отсутствии действия антибиотика на клетки асцитного рака вся поверхность агаровой пластинки будет бесцветной. Если же изучаемые препараты убивают клетки асцитного рака, то на месте агаровых блочков или дисков фильтровальной бумаги появятся голубые зоны. Свойство обесцвечивать метиленовый синий, т.е. превращать его в лейкосоединение, связано с выделением живыми асцитными клетками ферментов дегидраз. Убитые клетки не выделяют дегидразы, и метиловый синий не обесцвечивается.

Следует отметить, что дегидразная активность раковых клеток может обнаруживаться с помощью не только метиленового синего, но и ряда других веществ, например 2,6-дихлорфенолиндофенола, солей тетразола. Способностью восстанавливать метиленовый синий обладают взвеси клеток разных опухолей животных и человека. Однако при использовании взвеси клеток опухолей их количество в 1 мл взвеси, необходимое для восстановления метиленового синего, различно (табл. 34).

Таблица 34

Количество клеток различных солидных опухолей животных и человека, необходимое для восстановления метиленового синего
(по Талызиной, 1960)

Опухоль	Количество клеток в 1 мл взвеси, необходимое для восстановления метиленового синего, млн*	Время восстановления метиленового синего, ч
Саркома Крокера у мышей	1-1,1	4
То же	0,35-0,4	24
Опухоль ОЖ-5 у мышей	1-1,1	24
Саркома М-1 у крыс	5-5,5	24
То же	1-1,5	72
Рак молочной железы у человека	1,5-2	45
Саркома голени у человека	1,5-2	72

* Для асцитных раковых клеток — $2 \cdot 10^7$ в 1 мл.

Данные табл. 34 показывают, что, пользуясь чашечным методом, вполне возможно вести отбор противораковых веществ на раковых клетках человека, так как взвеси последних, как и клетки асцитного рака, восстанавливают метиленовый синий.

Препараты, подавляющие или тормозящие рост опухоли, обычно подавляют и дегидразную активность соответствующей опухоли.

Пробирочный метод. Модификацией чашечного метода служит метод испытания противораковой активности антибиотиков в пробирках. Метод состоит в следующем. В стандартные пробирки вносят 0,5 мл испытуемой культуральной жидкости и 0,5 мл взвеси клеток асцитного рака Эрлиха (конечная концентрация клеток 500 тыс./мл), затем добавляют 2 мл расплавленной агаровой среды, содержащей метиленовый синий. В контрольные пробирки вместо испытуемой культуральной жидкости добавляют 0,5 мл среды, на которой выращивают изучаемый организм. После перемешивания пробирки помещают на 3–4 ч в термостат при 36–37 °С.

Если содержимое пробирок окрашивается метиленовым синим, то это указывает на то, что испытуемый препарат подавляет дегидразную активность клеток асцитного рака.

Преимущество пробирочного метода по сравнению с чашечным состоит в том, что при этом происходит непосредственный контакт антибиотика с асцитными клетками Эрлиха независимо от степени диффузии изучаемого препарата в агар.

Использование микроорганизмов при изыскании противораковых антибиотиков. Обмен веществ в опухолевых клетках отличается от обмена нормальных клеток, в частности, различие определяется интенсивностью дыхания: в опухолевых клетках оно значительно снижено. Исходя из этого высказано предположение о возможности использования в качестве тест-объектов для поисков противораковых антибиотиков мутантов микроорганизмов с пониженным коэффициентом дыхания.

В результате ультрафиолетового облучения и действия урета-на удалось получить мутанты стафилококков, бактерий кишечной группы и других организмов с пониженным коэффициентом окисления. Поглощение кислорода у таких микроорганизмов может составлять 20–80% по сравнению с дыханием исходных родительских культур. В качестве тест-организмов для определения антиопухолевого действия культуральных жидкостей микроорганизмов можно также применять мутанты дрожжевых организмов с пониженным коэффициентом дыхания.

Сравнивая чувствительность метода с использованием асцитных клеток Эрлиха и метода с биохимическими мутантами микроорганизмов, следует заключить, что биохимические мутанты — более чувствительные тесты для определения противоопухолевого действия микроорганизмов.

Использование опухолевых клеток, выращенных *in vitro*, для отбора организмов, образующих противоопухолевые антибиотики. Оказалось возможным культивировать некоторые опухолевые клетки в искусственных условиях (*in vitro*) подобно тому, как это

осуществляется в отношении микроорганизмов. Лейкемические клетки мышей могут расти и размножаться в среде, содержащей пептон, диализированную лошадиную сыворотку и фолиевую кислоту (10 мкг/мл).

Это позволяет использовать перевиваемые штаммы клеток рака человека для изучения противоопухолевого действия некоторых антибиотиков. С этой целью клетки перевиваемых штаммов выращивают в матрацах Ру на специальной среде с добавлением 10%-й телячьей сыворотки. Культивирование проводят при 36 °С. Через 6–7 сут среду удаляют и слой клеток снимают с поверхности стекла 0,02%-м раствором этилендиаминтетрауксусной кислоты. Через 15–20 мин инкубации в термостате клетки переходят в суспензию.

Способность некоторых опухолевых клеток размножаться в пробирках позволяет применять их в качестве тест-объекта при поиске, выделении и очистке новых антибиотических веществ, обладающих противоопухолевой активностью. С этой целью можно использовать опухолевые клетки лимфоимы. Для получения асцита клеток лимфоимы белым мышам внутрибрюшинно вводят по 0,3 мл взвеси асцитных клеток. Через 10–12 дней асцит стерильно отбирают и сразу же вносят в пробирки с вышеназванной средой. Количество среды в каждой пробирке 2 мл. Оптимальная концентрация опухолевых клеток составляет $3 \cdot 10^6$ – $5 \cdot 10^6$ в 1 мл среды. При этих условиях через 48 ч инкубации при 36,5 °С в пробирках без перемешивания число клеток увеличивается в 1,5–2 раза. Размножение клеток в культуре оценивают в камере Горяева.

Если исследуемый препарат тормозит развитие и размножение клеток асцита, то это указывает на его антиопухолевое действие.

Применение метода позволяет проводить первичный отбор противоопухолевых антибиотиков на стадии культуральной жидкости, а также выделять и химически очищать отобранные антибиотики. Причем удается обнаружить и выделить противоопухолевые антибиотики, не обладающие подавляющим действием в отношении обычных тест-организмов, биохимического мутанта стафилококка и не влияющие на дегидразную активность опухолевых клеток лимфоимы.

Методы количественного определения антибиотиков

Количественное определение антибиотиков в культуральных жидкостях, готовых препаратах или в разнообразных растворах осуществляют различными методами: биологическими, химическими,

физико-химическими и иммунохимическими. Наиболее распространены биологические методы: они не требуют специального дорогостоящего оборудования и дают довольно точные результаты.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Биологические методы основаны на непосредственном действии антибиотика на используемый тест-организм, чувствительный к данному препарату, а поэтому считаются наиболее объективными.

Еще в 1906 г. В.Л. Омелянский указывал на преимущества биологических методов при количественном учете разных веществ. Он писал: «В лице бактерий химия приобретает новый и поистине неисчерпаемый источник разнообразнейших реактивов, во много раз более точных и более специализированных, чем те, какими располагала эта наука до сих пор».

Однако биологические методы определения антибиотиков имеют и недостатки: длительность проведения анализов, зависимость точности результатов от многих внешних факторов и т.п. Точность биологических методов обычно составляет $\pm 10\%$.

Наиболее широкое распространение среди биологических методов количественного определения антибиотиков получили метод последовательных разведений, диффузионные и турбидиметрические.

Метод последовательных разведений. Метод используется для определения количества антибиотика в культуральных жидкостях, растворах или в экстрактах. Он также применяется для обнаружения антибиотика при выделении новых продуцентов. Для работы подготавливают питательный бульон, пригодный для развития выбранного тест-организма. Непременное условие: бульон должен быть прозрачным. Одновременно с этим подготавливают и культуру тест-организма. Стерильный питательный бульон разливают в чистые стерильные пробирки; количество бульона должно обеспечивать нужную степень разведения изучаемого антибиотика.

Если антибиотик обладает высокой биологической активностью и в испытуемом растворе содержится в большом количестве, необходимо подготовить ряд пробирок с питательным бульоном таким образом, чтобы обеспечивалось относительно большое разведение. Например, в две пробирки вносят по 9 мл бульона. В первую пробирку вносят 1 мл испытуемого раствора антибиотика (разведение 1 : 10), тщательно перемешивают и 1 мл смеси переносят во вторую пробирку (разведение 1 : 100). Затем 1 мл раствора разведения 1 : 100 смешивают с 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7 мл бульона — получают разведения 1 : 200, 1 : 300, 1 : 400, 1 : 500, 1 : 600; 1 : 700 и 1 : 800. Для дальнейшего увеличения разведения,

последовательно отличающегося на 100, берут 0,5 мл раствора с разведением 1 : 100, смешивают с 4; 4,5; 5 и 5,5 мл бульона и получают разведения 1 : 900; 1 : 1000, 1 : 1100 и 1 : 1200. При желании данный ряд разведения можно увеличить до необходимого значения. Иногда используют и другие ряды разведений, например: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160 и т.д. или 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16, 1 : 32 и т.д.

В полученном ряду разведений антибиотического вещества в каждую пробирку вносят определенное количество клеток тест-микроба. Затем пробирки помещают в термостат на 20–24 ч при температуре, оптимальной для роста тест-микроба. После этого в пробирках определяют наличие или отсутствие роста тест-организма.

Допустим, что в нашем случае развитие организма начинается при разведении 1 : 1100 и далее, а во всех предыдущих разведениях, кончая 1 : 1000, рост тест-микроба отсутствует. Это означает, что в испытуемом растворе содержится 1000 ед. разведения антибиотика. Или, для более точного расчета, берут среднее значение максимального разведения, при котором отсутствует развитие тест-организма, и минимальное разведение, при котором начинается развитие. В данном случае это будет $(1000 + 1100) : 2 = 1050$ ед. разведения.

Методом последовательных разведений можно определить количество антибиотика не только в условных единицах разведения, но и в весовых или стандартных единицах. Для этой цели титрование (разведение) проводят стандартным раствором данного антибиотика, имеющего известную концентрацию, выраженную в мкг/мл или в ед./мл препарата.

Например, необходимо определить концентрацию стрептомицина, содержащегося в культуральной жидкости *S. griseus*. Делают ряд разведений культуральной жидкости, освобожденной от мицелия, а параллельно таким же способом делают разведение стандартного раствора стрептомицина, содержащего, например, 10 мкг/мл. Испытуемую жидкость и стандартный раствор антибиотика необходимо разводить в бульоне с фосфатным буферным раствором при pH 7,8–8,0. Пример расчета приведен в табл. 35.

В данном случае 10 мкг/мл стрептомицина подавляют развитие тест-культуры в наибольшем разведении, соответствующем 5-й пробирке. Следовательно, 5 мкг/мл вызывают подавление роста микроба только в 4-й пробирке, но не в 5-й, а 20 мкг/мл задерживают рост в 6-й пробирке, 40 мкг/мл — в 7-й; 80 мкг/мл — в 8-й; 160 мкг/мл — в 9-й; 320 мкг/мл — в 10-й пробирке и т.д.

Сравнивая эти величины, устанавливают, что испытуемый раствор, задерживающий развитие тест-организма в 10-й пробирке (разведение 1 : 1024), содержит 320 мкг/мл стрептомицина.

**Определение концентрации стрептомицина методом
последовательных разведений**

Объект исследования	Номер пробирки					
	1	2	3	4	5	6
	Разведение					
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
Стандарт (10 мкг/мл)	-	-	-	-	-	+
Испытуемый материал	-	-	-	-	-	-

Объект исследования	Номер пробирки					
	7	8	9	10	11	12
	Разведение					
	1 : 128	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 2048	1 : 4096
Стандарт (10 мкг/мл)	+	+	+	+	+	+
Испытуемый материал	-	-	-	-	+	+

Примечание. Знак «-» — отсутствие роста тест-микроба, знак «+» — наличие роста.

Антибиотическую активность испытуемого раствора при работе по методу последовательных разведений при наличии стандарта можно рассчитать по следующей формуле:

$$X = P_{и} : P_{с} \cdot C,$$

где $P_{и}$ — максимальная степень разведения испытуемого раствора, при которой отсутствует рост тест-организма; $P_{с}$ — максимальная степень разведения стандартного раствора, обеспечивающая отсутствие роста тест-микроба; C — исходная концентрация стандартного раствора антибиотика; X — искомая концентрация антибиотика в исследуемом растворе.

В нашем примере $P_{и} = 1024$; $P_{с} = 32$; $C = 10$ мкг/мл; искомая концентрация антибиотика

$$X = 1024 : 32 \cdot 10 = 320 \text{ мкг/мл.}$$

Метод последовательных разведений дает сопоставимые результаты лишь при соблюдении таких условий, как:

- 1) тщательная стерильность проведения анализов;
- 2) использование постоянных сред для разведения одного и того же антибиотика;

- 3) внесение определенного количества клеток или спор тест-организма;
- 4) определенная длительность инкубации пробирок, засеянных тест-культурой.

Иногда под действием испытуемого антибиотика возникают устойчивые к нему формы тест-микроба. Появление даже единичных резистентных клеток, которые могут в дальнейшем развиться, приведет к ошибочным результатам при определении биологической активности препарата. Чтобы избежать подобного явления, для разведений используют не бульон, а агаризованные среды, разлитые в пробирки. После разведения пробирки ставят в наклонном положении, с тем чтобы получить косячки застывшего агара. На поверхность скошенного агара микробиологической петлей высевают суспензию тест-микроба. После этого пробирки помещают в термостат на 24 ч при температуре, оптимальной для развития тест-организма. Активность рассчитывают тем же способом, что и при разведении антибиотика (культуральной жидкости) в жидкой среде. Появление одиночных колоний, образовавшихся из резистентных форм, в расчет не принимают.

Определять антибиотическую активность методом серийных разведений можно и на чашках Петри. В пробирки, содержащие по 9 мл расплавленного питательного агара, вносят по 1 мл изучаемого антибиотика определенного разведения или культуральной жидкости. После тщательного перемешивания содержимое пробирки выливают в чашку Петри и дают агару застыть. Затем по поверхности пластинки штрихами делают посев тест-организмов. Чашки выдерживают в термостате при оптимальной для используемых тест-организмов температуре в течение 20–21 ч.

Преимущество этого метода по сравнению с пробирочным состоит в том, что в данном случае каждое разведение изучаемого препарата может быть использовано для многих тест-организмов.

Диффузионные методы. Количественное определение антибиотиков диффузионными методами основано на способности антибиотических веществ диффундировать в агаровых средах и образовывать зоны, в которых не развиваются используемые тест-организмы. Величина зоны диффузии антибиотика зависит прежде всего от химической природы антибиотического вещества и его концентрации, состава агаровой среды, ее рН, температуры и других факторов, которые необходимо учитывать при анализах.

Антибиотики-полипептиды с большой и сложной молекулой диффундируют медленнее, чем, например, антибиотики ациклического строения или антибиотики тетрациклиновой природы и гетероциклического строения. Поэтому для количественного определения антибиотиков, трудно диффундирующих в агаризованных

средах, необходимо подбирать условия, обеспечивающие лучшую их диффузию. К таким условиям можно, например, отнести добавление к среде отдельных веществ, повышающих диффузию антибиотиков. Так, CaCl_2 способствует повышению диффузии грамицидина С. Иногда чашки с агаром, тест-культурой и антибиотиком помещают на 20–24 ч в холодильник (4 °С); тест-организм в это время не развивается, а антибиотик диффундирует. Используя этот метод, можно примерно в 2 раза увеличить скорость диффузии антибиотика при нормальном периоде роста тест-организма.

Концентрации испытуемых антибиотиков не должны быть слишком высокими, так как установлено, что диаметр зоны задержки роста тест-организма есть линейная функция логарифмов концентрации антибиотика, но лишь в определенных пределах концентрации. Так, увеличение концентрации неомицина выше 5%, по существу, не сказывается на величине зоны задержки роста тест-микроба. Величина зоны задержки роста тест-организма в определенной степени зависит от длительности контакта антибиотика со средой (табл. 36).

Анализы необходимо проводить через определенный интервал времени, так как

между моментом посева тест-организма и началом его прорастания проходит какой-то промежуток времени, в течение которого антибиотик продолжает диффундировать в агар и оказывать биологическое действие.

Состав агаровой среды и особенно ее рН также существенно влияют на величину образования зон задержки и рост тест-микроба (рис. 22). Стрептомицин, стрептотрицин, неомицин более сильно проявляют антибиотические свойства в щелочной среде (рН > 7); тетрациклиновые антибиотики наиболее активны в слабнокислой зоне (рН среды 6,3–6,4). Наличие в среде ароматических аминокислот снимает биологическую активность антибиотика азасерина по отношению к *E. coli*.

Плотность используемой культуры тест-организма должна быть постоянной для каждой серии опытов, ибо с повышением

Таблица 36

Величина зон угнетения роста *Streptomyces aureofaciens* в зависимости от времени контакта антибиотика со средой (на бумажном диске с агаром) (по Teillon, 1953, 1953a)

Длительность контакта бумажного диска с агаром перед посевом актиномицета	Величина зоны угнетения роста, мм	
	сернокислый стрептомицин 0,5%	хлорамфеникол, насыщенный раствор
1 мин	13,0	22
20 мин	13,0	21
2 ч	12,5	23
5 ч	15,0	22
24 ч	17,0	30

плотности клеток тест-культуры уменьшается величина зоны задержки ее роста, так как бактерии заметно влияют на процесс диффузии антибиотика ввиду того, что антибиотические вещества в определенной мере связываются этими организмами.

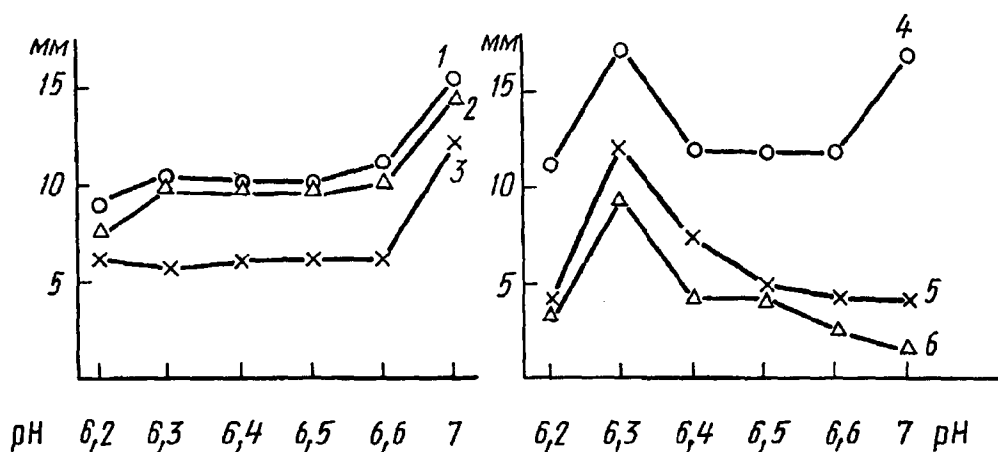


Рис. 22. Зависимость биологической активности антибиотиков (диаметра зоны задержки роста, мм) от рН среды: 1 — стрептотрицин; 2 — стрептомицин; 3 — неомицин; 4 — хлорамфеникол; 5 — окситетрациклин; 6 — хлортетрациклин

Применение в опытах постоянной плотности вегетативных микробных клеток и спор тест-организма в агаровой среде дает возможность получать зоны угнетения роста используемой тест-культуры соответствующей величины с резко очерченными краями.

Чаще всего для определения плотности микробных клеток и спор бактерий используют фотоэлектрокалориметр или стеклянный оптический стандарт, выпускаемый Государственным контрольным институтом им. Л.А. Тарасевича (ГКИ); стандарты соответствуют 5, 9, 10 и 11 единицам мутности. За единицу мутности условно принята мутность взвеси тифозных бактерий, содержащая 100 млн микробных тел в 1 мл. Однако при определении биологической активности антибиотиков в качестве тест-организмов чаще всего используют другие микробы, числовой эквивалент мутности которых обычно не соответствует числовому эквиваленту мутности тифозных бактерий.

Существуют поправки, которые необходимо вносить при использовании взвеси спор тест-организмов в процессе определения биологической активности антибиотиков. Поправки по отношению к числовому эквиваленту мутности для взвесей тифозных бактерий следующие:

споры <i>L</i> ₂ (типа <i>B. subtilis</i>)	1/12
споры <i>B. mycoides</i>	1/6
споры <i>B. mycoides</i> (гладкий вариант)	1/5

Зная эти поправки, можно рассчитать число спор в 1 мл суспензии.

Пример расчета. Допустим, что плотность взвеси спор *B. subtilis* соответствует 5 единицам мутности стандарта ГКИ. Зная, что числовой эквивалент указанной мутности для взвесей тифозных бактерий составляет $100 \text{ млн/мл} \times 5 = 500 \text{ млн/мл}$ и что соответствующий эквивалент для взвесей спор *B. subtilis* в 12 раз меньше, находим, что концентрация спор в исследуемой суспензии равна

$$500 \text{ млн/мл} : 12 \approx 42 \text{ млн/мл.}$$

Соблюдение указанных основных правил постановки опыта при определении биологической активности антибиотиков методом диффузии в агар позволяет получить вполне сравнимые результаты.

Среди диффузионных методов определения биологической активности наиболее широко применяются три.

1. Метод с использованием металлических цилиндриков. На поверхность питательного агара в чашках Петри или в специальных кюветах расставляют цилиндрики (с внешним диаметром 8 мм, внутренним диаметром 6 мм и высотой 10 мм) из алюминия или нержавеющей стали. Как правило, питательный агар используют двухслойный: первый слой агара наливают из расчета 15 мл на одну чашку Петри (диаметр 9 см); второй слой агара, содержащий суспензию тест-организма определенной плотности, разливают на застывшую поверхность первого слоя агара по 5 мл на чашку. На застывшую поверхность второго слоя агара по специальному трафарету расставляют предварительно простерилизованные металлические цилиндрики (5–6 цилиндриков на чашку).

В одни цилиндрики вносят испытуемый раствор антибиотика, в другие — стандартный раствор того же антибиотика с известным числом микрограммов или единиц активности в 1 мл раствора. Обычно цилиндрики с испытуемым и стандартным растворами чередуют. Затем чашки или кюветы помещают в термостат при температуре, оптимальной для роста тест-организма, на 20–24 ч, после чего измеряют диаметры зон задержки роста тест-микроба (рис. 23). Количество антибиотика в 1 мл раствора рассчитывают или по стандартной кривой, полученной на полулогарифмической сетке, или по таблицам В.С. Дмитриевой (1958).

2. Метод с применением лунок в толще агара. В толще агаровой пластинки делают лунки диаметром 8 мм, используя пробочное сверло соответствующего диаметра или специально сделанное приспособление, состоящее из резиновой груши, в которую вставляют заостренную с одного конца металлическую трубочку с внешним диаметром 8 мм (рис. 24). Блочки, надрезанные пробочным сверлом на всю глубину агаровой пластинки, удаляют с помощью

стерильного скальпеля или специального крючка. В одни лунки вносят раствор испытуемого антибиотика, в другие — стандартный раствор антибиотика (рис. 25).

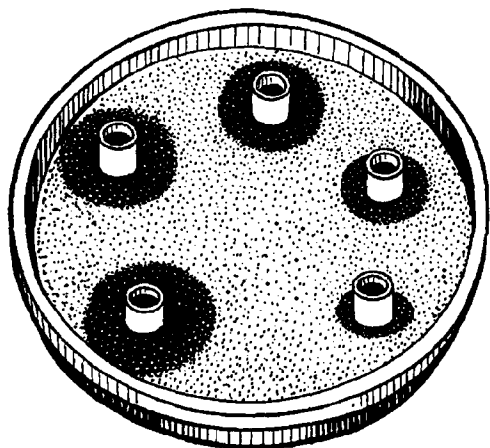


Рис. 23. Определение биологической активности антибиотиков диффузионным методом с использованием металлических цилиндров

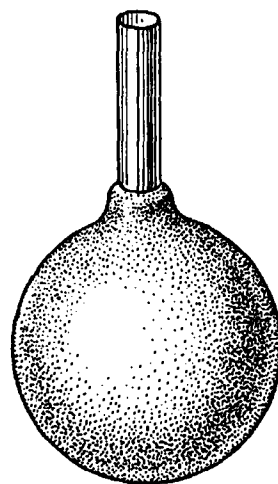


Рис. 24. Приспособление для получения лунок в толще агаровой пластинки

Метод лунок имеет некоторые преимущества по сравнению с первым методом: нет необходимости в очистке и стерилизации цилиндров. При использовании цилиндров, сделанных из алюминия, иногда происходит взаимодействие кислых антибиотиков с металлом, что частично или полностью инактивирует препарат. Метод лунок это исключает.

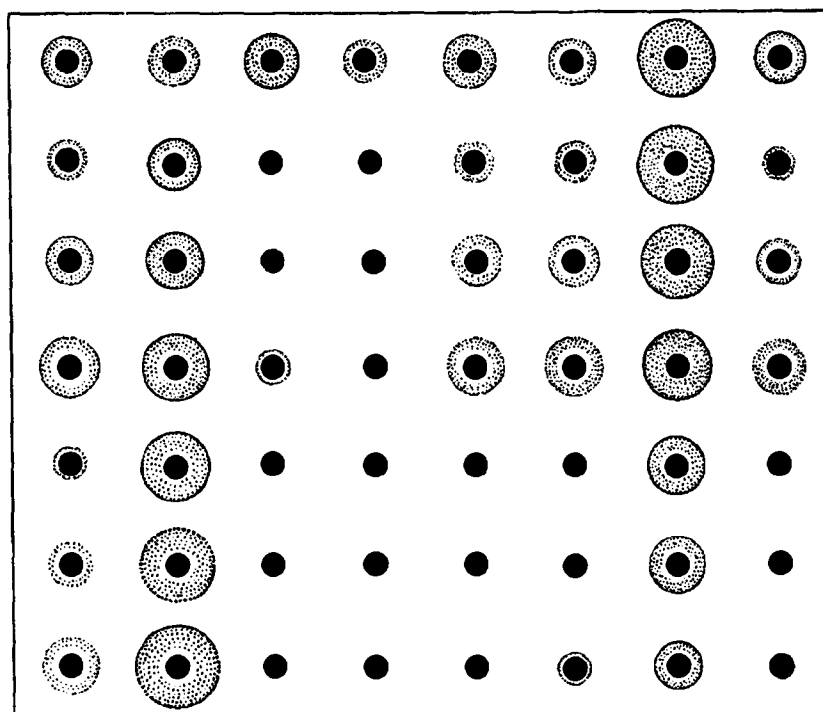


Рис. 25. Определение антибиотической активности препаратов в кюветках с использованием лунок в толще агара

При работе с цилиндриками возможно (особенно у начинающих исследователей) подтекание раствора антибиотика из-под неправильно поставленных цилиндров, что приводит к образованию расплывчатых зон неправильной формы. Метод лунок подобных эффектов не дает.

3. Метод использования дисков фильтровальной бумаги. На поверхности питательного агара, засеянного тест-организмом, помещают диски фильтровальной бумаги, пропитанные испытуемым раствором антибиотика. В качестве стандарта используют диски, смоченные раствором антибиотика известной концентрации, или специально приготовленные диски, содержащие уже известное количество антибиотиков (табл. 37).

Таблица 37

Бумажные диски для определения концентрации антибиотика

Наша отечественная промышленность выпускает такие диски, содержащие антибиотики.

Дальнейшие операции проводят так же, как и при работе с применением лунок в толще агара.

В некоторых случаях при использовании бумажных дисков получают зоны неправильной формы. Это связано с тем, что в данном случае диск фильтровальной бумаги оказывается хроматограммой изучаемого антибиотика и препарат концентрируется в одном участке диска.

Турбидиметрические методы. В основу этих методов положена логарифмическая зависимость степени угнетения роста тест-организма от концентрации антибиотика.

Метод основан на измерении концентрации клеток тест-микроба, образующих определенную оптическую плотность среды (мутность) в результате роста в присутствии небольших количеств антибиотика. При небольших количествах антибиотика полного подавления роста тест-микроба не происходит и лишь задерживается темп их роста, что и сказывается на оптической плотности бульона.

Антибиотик, содержащийся в диске	Содержание антибиотика в диске, мкг, ед.	Цвет диска
Ампициллин	10	Белый
Бензилпенициллин	10 ед. (6 мкг)	Зеленый
Гентамицин	10	Белый
Доксициклин	10	»
Канамицин	30	Оранжевый
Карбенициллин	25	Белый
»	100	Оливковый
Левомицетин	30	Белый
Линкомицин	15	Голубой
Мономицин	30	Светло-оранжевый
Метициллин	10	Белый
Неомицин	30	Коричневый
Новобиоцин	15	Серый
Олеандомицин	15	Бирюзовый
Оксациллин	10	Белый
Полимиксин	300 ед.	Бежевый
Ристомицин	30	Черный
Рифампицин	5	Оранжевый
Стрептомицин	30	Фиолетовый
Тетрациклин	30	Желтый
Эритромицин	15	Красный
Цефалексин	30	Белый
Фузидин	10	»

Турбидиметрические методы определения антибиотиков обычно неприемлемы для плотно окрашенных растворов. Но, учитывая высокую чувствительность этих методов, применяют довольно большие разведения исследуемых жидкостей, что значительно снижает концентрацию пигментных веществ, мешающих проведению анализа; в ряде случаев можно использовать турбидиметрический метод и для окрашенных растворов.

Оптическую плотность жидкостей определяют с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) или обычного турбидиметра. Эти методы пригодны для количественного определения любых антибиотиков, если есть стандартный раствор изучаемого препарата.

При подборе быстрорастущих организмов, используемых в качестве тест-объектов, турбидиметрический метод можно использовать как экспресс-метод, получая ответ через 3,5–4 ч.

* * *

Благодаря простоте применения, доступности и отсутствию больших материальных затрат на их проведение вышеназванные методы занимают ведущее место в оценке биологической активности антибиотиков. Однако эти методы имеют ряд недостатков. Так, метод серийных разведений связан с длительностью анализа, полученные результаты недостаточно точны. Для методов, связанных с диффузией в агар, также характерны длительность процесса анализа, зависимость результатов от свойств антибиотика (растворимость, молекулярная масса и др.), определенная чувствительность к компонентам агаровой среды, трудность автоматизации. Результаты турбидиметрических методов нередко зависят от примесей, способных угнетать или стимулировать рост тест-организма; эти методы неприменимы для анализа окрашенных или мутных растворов.

Отмеченные недостатки широко применяемых методов стимулировали разработку других методов учета биологической активности антибиотиков, которые бы обеспечивали более быстрое получение результатов. В основу разработки таких методов, обобщенных в обзоре Е.М. Берштейна (1991), были положены два принципа: связь анализа с механизмом действия антибиотиков и использование современного оборудования для регистрации результатов анализа.

Рассмотрим некоторые из этих методов.

Методы, основанные на изменении цитоплазматической мембраны. Одним из механизмов биологического действия антибиотиков на клетки микроорганизмов является нарушение проницаемости

цитоплазматической мембраны. К числу таких антибиотиков относятся грамицидин С, нистатин, амфотерицин В, гентамицин. В результате действия названных антибиотиков микробная клетка теряет жизненно важные компоненты (ионы калия, магния, АТФ и др.). Обнаружить эти компоненты можно с помощью физико-химических методов, а их количество в специально подобранных условиях анализа связано с биологической активностью антибиотика или его концентрацией.

Для регистрации ионов калия или магния применяют методы плазменной фотометрии, атомно-абсорбционной спектроскопии, радиометрии, ионселективных электродов. Содержание АТФ в среде может быть оценено по изменению люминесценции люциферина.

Методы, основанные на регистрации определенных продуктов метаболизма тест-организма. Развитие микроорганизмов постоянно сопровождается выделением в окружающую среду тепла, некоторых продуктов метаболизма, например диоксида углерода, ряда ферментов и других соединений. Количество выделяемого тепла, CO_2 или иных продуктов жизнедеятельности зависит от фазы роста микроорганизма, интенсивности процесса метаболизма и других факторов развития популяции.

Определение количества тепла, выделяемого культурой микроорганизма в единицу времени, CO_2 или каких-либо специфических ферментов может служить основой количественной оценки антибиотической активности препарата.

1. Определение углекислоты, образующейся при дыхании микроорганизмов. Может быть осуществлено с помощью CO_2 -чувствительного электрода или радиометрическим методом.

Д.Л. Симпсон и Р.К. Кобос (1982) показали, что подавление образования CO_2 в суспензии клеток *E. coli* пропорционально концентрации тетрациклина в среде в интервале 33–167 мкг/мл.

2. Учет выделяемого тепла. Известно, что даже небольшие отклонения метаболизма в культуре микроорганизмов приводят к изменению скорости выделения тепла, которое регистрируется при достаточной чувствительности прибора (микрокалориметра).

3. Определение изменения биолюминесценции. Интенсивность биолюминесценции пропорциональна как содержанию присутствующих в микробной клетке метаболитов, так и количеству добавленных посторонних для клетки веществ, активно включающихся во внутриклеточные ферментативные процессы. В основе одного из этих методов лежит способность «тусклых» мутантов светящихся бактерий отвечать светоизлучением на добавление малых количеств (пмоль) миристиновой кислоты $\text{C}_H_3(\text{C}_H_2)_{12}\text{COOH}$. С помощью биолюминесценции может быть

измерена активность гидролитических ферментов, освобождающих миристиновую кислоту из сложных липидов.

Анализ такого антибиотика, как церуленин, основан на эффекте ингибирования этим веществом люминесценции альдегидзависимых мутантов.

4. Определение антимикробной активности хлортетрациклина. Этот метод основан на изменении скорости ферментативного процесса, а грамицидина С — на нарушении функции мембраны и выделении фермента люциферазы и соответственно на изменении интенсивности свечения культуры люминесцентных бактерий *Photobacterium leiognathi* после контакта их с антибиотиком (Шендеров и др., 1985). Эти же люминесцентные бактерии можно использовать при определении антибиотической активности тетрациклина, окситетрациклина и рифамицина.

Рассмотренные методы определения биологической активности антибиотиков характеризуются оперативностью, чувствительностью, высокой воспроизводимостью результатов анализа. В то же время высокая стоимость и дефицит необходимых приборов не позволяют широко применять их.

ХИМИЧЕСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

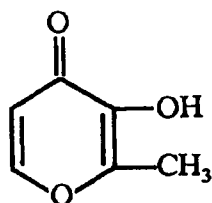
Химические и физико-химические методы определения различных групп антибиотиков все шире используются в лабораторной практике. Их преимущество по сравнению с биологическими методами состоит в быстроте анализов и, следовательно, в немедленном получении ответа. В ряде случаев химические и физико-химические методы несколько уступают по точности биологическим. Однако их основное свойство — высокая скорость определения — способствует широкому практическому использованию.

К химическими и физико-химическим методам относят колориметрические и спектрофотометрические, основанные на образовании различных соединений или использовании определенных свойств антибиотиков: цветные реакции, исчезновение характерных полос в ультрафиолетовой или инфракрасной части спектра под действием различных веществ (кислот, щелочей и др.).

Чисто химические методы определения количества антибиотиков применяются очень редко. Существует несколько модификаций определения пенициллинов, в основу которых положено поглощение йода продуктами гидролиза этого вещества, а также ацидометрический способ. При расщеплении молекулы пенициллина с помощью пенициллинацилазы или щелочи с образованием пенициллановой кислоты освобождается одна карбоксильная группа, которую можно учесть титрованием.

Чаще применяют колориметрические и спектрофотометрические методы определения концентрации антибиотиков. В основу колориметрических методов положен принцип превращения препарата или его отдельных группировок в окрашенные соединения. При спектрофотометрических методах используют свойства многих антибиотиков давать характерный спектр поглощения в видимом свете или в ультрафиолетовой области.

Определение стрептомицина базируется на характерных реакциях различных функциональных групп молекулы антибиотика. Чаще всего применяют мальтольный метод, который состоит в том, что при щелочном гидролизе стрептомицина из стрептозной части молекулы образуется мальтол



который с солями трехвалентного железа дает окрашенное соединение. Этим методом можно определять стрептомицин в растворах товарных препаратов и в культуральных жидкостях после соответствующей их очистки.

Для получения вполне воспроизводимых результатов при работе указанным методом рекомендуется использовать следующую методику: к 10 мл стрептомицина (концентрация 100–300 мкг/мл) добавить 2 мл 0,2 н. NaOH, поставить сосуд на кипящую водяную баню на 4 мин, затем охладить в водопроводной воде в течение 3 мин, добавить 8 мл 1%-го раствора железоаммиачных квасцов в 0,55 н. серной кислоте и точно через 3 мин после этого измерить удельную экстинкцию (оптическую плотность или поглощение).

Для определения маннозидострептомицина, который обычно образуется в небольшом количестве вместе со стрептомицином, применяют антрон — вещество, способное давать с углеводами в крепких растворах серной кислоты соединение интенсивно зеленого цвета. Оптическую плотность этого окрашенного соединения обычно определяют на фотоэлектроколориметре.

Определение тетрациклиновых антибиотиков физико-химическими методами также основано на образовании окрашиваемых соединений при взаимодействии этих антибиотиков с хлористым железом, солями меди, азотной или серной кислотой. Количественно тетрациклиновые антибиотики можно определять спектрофотометрическим методом, основанным на исчезновении одного из характерных максимумов поглощения раствора антибиотика после щелочного гидролиза.

Описано несколько физико-химических методов определения эритромицина, из которых наиболее широко распространены колориметрический и спектрофотометрический.

Колориметрический метод определения эритромицина основан на изменении оптической плотности раствора антибиотика после реакции его с серной кислотой (27 н.). При взаимодействии эритромицина с серной кислотой образуются продукты, окрашенные в желтый цвет.

Замечено, что оптическая плотность испытуемого раствора антибиотика и серной кислоты зависит от температуры сливаемых растворов. Чтобы исключить это влияние, необходимо измерять оптическую плотность раствора антибиотика после нагревания его с 18 н. H_2SO_4 при 100°C .

Физико-химический метод нашел широкое практическое применение при определении циклосерина. Метод основан на реакции циклосерина с нитропруссидным реагентом в кислой среде. В результате реакции образуется комплексное соединение голубого цвета, концентрацию которого легко измерить колориметрически.

Нитропруссидный реагент представляет собой смесь равных объемов 4%-го раствора нитропруссида натрия $\text{Na}_4\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_2$ и 4 н. раствора NaOH . Реагент можно готовить за 16–24 ч до начала определения и хранить в холодильнике, но лучше — перед началом определения.

Метод определения циклосерина состоит в следующем. К 1 мл раствора циклосерина (концентрация 50–200 мкг/мл) добавляют 3 мл 1 н. раствора уксусной кислоты и 1 мл нитропруссидного реагента. После перемешивания раствор оставляют при комнатной температуре на 10 мин и измеряют величину оптической плотности.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Для определения малых концентрации антибиотиков (порядка 50–500 нг/мл*) в сыворотке крови человека или для обнаружения возможного загрязнения продуктов питания животного происхождения остаточными количествами антибиотических веществ применяются высокоспецифичные, чувствительные и достаточно быстрые иммуноферментные методы анализа, например метод твердофазного иммуноферментного анализа, разработанный А.Ю. Колосовой с соавторами (1998).

Наиболее сложной процедурой этих методов является получение иммунохимических реагентов: иммуногенов (конъюгаты

* нг — наногрaмм, равен $1 \cdot 10^{-9}$ г.

соответствующих антибиотиков с белками, например сывороточным альбумином) и специфических поликлональных антител к этим антибиотикам.

Номенклатура антибиотиков

Не существует единого и всеми принятого принципа в обозначении выделяемых антибиотиков. Многие антибиотики названы по родовому или видовому наименованию их продуцентов, например пенициллин, цефалоспорины, стрептомицин и др. — в соответствии с родовыми названиями продуцентов этих соединений: *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Streptomyces*; полимиксин — от видового названия продуцента *Bacillus polymyxa*, виридин — от *Trichoderma viridi*, гризеофульвин — от *Penicillium griseofulvum*.

Часть антибиотиков получает названия от наименования местности (региона), откуда выделен продуцент: миамицин — от местности Miami (Майами, Флорида), никкомицин — от Nikki (Япония) и т.д.

Значительное число антибиотиков названо в соответствии с их химическим строением или веществом, входящим в молекулу антибиотика. Так, тетрациклины содержат четыре шестичленных кольца, бицикломицин — два циклических компонента.

Названия могут отражать наличие в составе антибиотиков отдельных химических веществ. Например, валин является составной частью валиномицина, изолейцин — илеумицина, триптофан — триптантрина и т.д. По наличию хлора или брома в молекуле антибиотика названы хлортетрациклин, хлорамфеникол, бромтетрациклин.

Некоторые антибиотики получили свое наименование от номера штамма продуцента: этамицин — от номера 8 (eight), эйфайвин — от культуры A₅ (эйфайвин позднее был отнесен к бацитрацину). Бацитрацин получил свое название от фамилии семилетней больной девочки Маргарет Траци, из раны которой был выделен продуцент антибиотика.

Используются и другие подходы к обозначению антибиотиков. В 1965 г. Международный комитет по номенклатуре антибиотиков высказал рекомендации по названию новых антибиотиков, которые в общих чертах сводятся к следующему.

А. Если у нового антибиотика установлена химическая структура, то:

- 1) название следует выбирать с учетом того класса химических соединений, к которому относится это вещество;
- 2) название должно быть благозвучным;

3) выбор названия антибиотика следует основывать на химической структуре соединения.

Б. Если же химическая структура антибиотического вещества неизвестна или мало изучена, то:

1) название нового антибиотика следует основывать на наименовании рода или порядка, к которому относится продуцент, при этом суффикс «мицин» рекомендуется присваивать лишь антибиотикам, образуемым организмами, относящимися к порядку *Actinomycetales*;

2) в случае, когда название антибиотика на основе рода, семейства или порядка, к которому относится продуцент, уже использовано ранее, рекомендуется применять эпитет к видовому названию

3) в названии антибиотика можно использовать спектр его антимикробного действия или способ действия.

* * *

При изложении основ науки об антибиотиках, преимущественно включающих условия образования наиболее ценных препаратов и другие, главным образом биологические, проблемы, связанные с этими соединениями, целесообразно, с нашей точки зрения, рассматривать антибиотические вещества по тем группам организмов, которые их продуцируют.

Каждая группа организмов образует большое число разнообразных антибиотиков. Подробно ознакомиться со всеми этими веществами в данном случае не представляется возможности. Во второй части учебника будут рассмотрены лишь антибиотики, представляющие тот или иной практический либо теоретический интерес.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте основные методы выделения продуцентов антибиотиков из природных условий.
2. Расскажите о специфических методах идентификации микроорганизмов — продуцентов антибиотиков, об идентификации самих антибиотиков.
3. Каковы основные методы выделения и очистки антибиотиков?
4. Каковы принципы разработки лабораторного регламента?
5. Охарактеризуйте основные пути повышения способности микроорганизмов к образованию антибиотиков.
6. Назовите методы сохранения микроорганизмов — продуцентов антибиотиков в активном состоянии.
7. Каковы основные методы определения антибиотической активности микроорганизмов при культивировании их на твердых и в жидких средах?
8. Дайте характеристику основных биологических, химических, физико-химических и иммунохимических методов количественного определения антибиотиков.

**АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ
РАЗЛИЧНЫМИ ГРУППАМИ ОРГАНИЗМОВ,
УСЛОВИЯ И ПУТИ ИХ БИОСИНТЕЗА,
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ
И ПРОБЛЕМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К НИМ
МИКРООРГАНИЗМОВ**

Вторая часть учебника посвящена рассмотрению представителей основных групп антибиотиков. Главный акцент здесь сделан на описании условий и путей биосинтеза, химического строения, антимикробных спектров действия и на практическом использовании рассматриваемых антибиотических веществ. Особое внимание уделено вопросам, связанным с направленным биосинтезом ценных антибиотиков, что дает возможность управлять процессом образования антибиотических веществ.

Большое теоретическое и практическое значение имеют изучение механизма биологического действия антибиотиков, возникновения резистентности микроорганизмов к этим биологически активным соединениям и пути их преодоления, а также получение новых форм антибиотиков, в том числе липосомальных, химическая и биологическая модификация природных антибиотиков и синтез на этой основе ценных для практического применения препаратов.

В этой же части книги рассмотрены и основные этапы промышленного получения антибиотиков, дан анализ применения их в сельском хозяйстве как важнейших лечебных веществ, используемых в ветеринарии, и как факторов борьбы с фитопатогенными организмами в растениеводстве. Приведены данные по использованию этих биологически активных веществ в пищевой промышленности. Обсуждены некоторые экологические вопросы, связанные с проблемой промышленного получения и практическим использованием антибиотиков.

АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ БАКТЕРИЯМИ

Как известно, бактерии — это организмы с прокариотным типом строения клетки. К ним относятся собственно бактерии, актиномицеты и цианобактерии. Антибиотики, образуемые бактериями, будут рассмотрены по этим группам.

Антибиотики, образуемые собственно бактериями

Большое число антибиотических веществ, образуемых различными группами организмов, являются продуктами жизнедеятельности собственно бактерий. Однако лишь немногие из них нашли практическое применение, так как большинство бактериальных антибиотиков токсично для макроорганизмов. Часть этих антибиотиков (грамцидин С, полимиксины, бацитрацины и др.) используется в медицинской практике, другие (субтилин, низины) нашли применение в пищевой и консервной промышленности. Они предохраняют от порчи мясные, рыбные, молочные и другие скоропортящиеся продукты. Некоторые из бактериальных антибиотиков, например бацитрацины, употребляют в сельском хозяйстве как добавки к корму домашних животных.

Все это указывает на необходимость дальнейшего изучения антибиотиков бактериального происхождения.

По химической природе почти все бактериальные антибиотики — полипептиды или белки. Это представляет особый интерес в связи с изучением путей биосинтеза названных веществ и использованием этих путей в качестве моделей для изучения проблем биосинтеза полипептидов вообще, что имеет большое теоретическое значение.

К настоящему времени известно около 1000 антибиотиков бактериального происхождения, но мы остановимся лишь на некоторых наиболее характерных представителях этой группы, имеющих практическое или теоретическое значение; к ним относятся тиротрицин, грамицидины, полимиксины, бацитрацины, низины и некоторые другие.

В большинстве случаев при изучении бактериальных антибиотиков приходится иметь дело не с одиночными веществами, а с группой близких друг другу по химическим и биологическим свойствам веществ, синтезируемых одним видом бактерий. Известно,

что *Bacillus subtilis* образует около 70 различных полипептидных антибиотиков, *B. polymyxa* — более 20 полимиксинов, *Brevi bacillus* — 23 антибиотических вещества полипептидной природы и т.д.

У разных бактерий антибиотики-полипептиды, по всей вероятности, образуются идентично. Процесс биосинтеза активируется полиферментными комплексами, близкими по типу действия. Однако некоторые антибиотики (из группы лантибиотиков, бактериоцинов) продуцируются на рибосомах.

Особенность полипептидных антибиотиков, образуемых бактериями, заключается еще и в том, что в их состав наряду с L-формами аминокислот входят D-аминокислоты, а также метилированные аминокислоты (например, метилдегидроаланин), иминокислоты. По химической классификации большинство антибиотиков, вырабатываемых бактериями, относятся к IV семейству «Антибиотики — аминокислоты, пептиды и пептолиды». Рассмотрим три подгруппы этого семейства: гомопептидные соединения, гетеромерные пептиды и высокомолекулярные пептиды.

ГОМОПЕПТИДНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ

В эту подгруппу входят тиротрицин, грамицидины и бацитрацины.

Тиротрицин (Tyrothricin)

Тиротрицин впервые был получен Р. Дюбо в 1939 г. при развитии бактерии *Bacillus brevis*, выделенной из почвы. В последнее время этот организм отнесен к роду *Brevi* и называется *Brevi bacillus*. Продуцент тиротрицина — аэробная, спорообразующая грамположительная бактерия.

Температурный оптимум развития около 37 °С. Для получения антибиотика бактерии выращивались в течение 4–5 сут при 37 °С на жидкой питательной среде (обычно мясопептонный бульон), разлитой тонким слоем в матрацы. В процессе развития бактерий образующийся антибиотик в небольшом количестве выделяется в окружающую среду, а основная масса тиротрицина находится в бактериальных клетках.

Тиротрицин — полипептид с большим числом аминокислотных остатков. Биосинтез полипептида осуществляется по мультиферментному тиошаблонному пути.

При выделении антибиотика необходимо помнить, что большая часть его содержится в клетках бактерий, а следовательно, обрабатывать следует как культуральную жидкость, так и бактериальную массу,

Культуральную жидкость вместе с бактериями подкисляют соляной кислотой до рН 4,5. При этом выпадает осадок, состоящий

из бактериальных тел и антибиотика. Фильтрацией отделяют осадок от жидкости и подвергают обработке кислым спиртом в течение суток. За этот промежуток времени антибиотик извлекается из бактериальных клеток и переходит в спиртовой раствор, который отделяют от бактериальной массы. Спиртовой экстракт упаривают в вакууме, а остаток переносят в раствор NaCl. При этом тиротрицин выпадает в виде хлопьевидного осадка. «Свободный» антибиотик, т.е. антибиотик, выделенный бактериями в окружающую среду, может извлекаться нейтральным буфером непосредственно из осадка, полученного при обработке HCl (рис. 26).

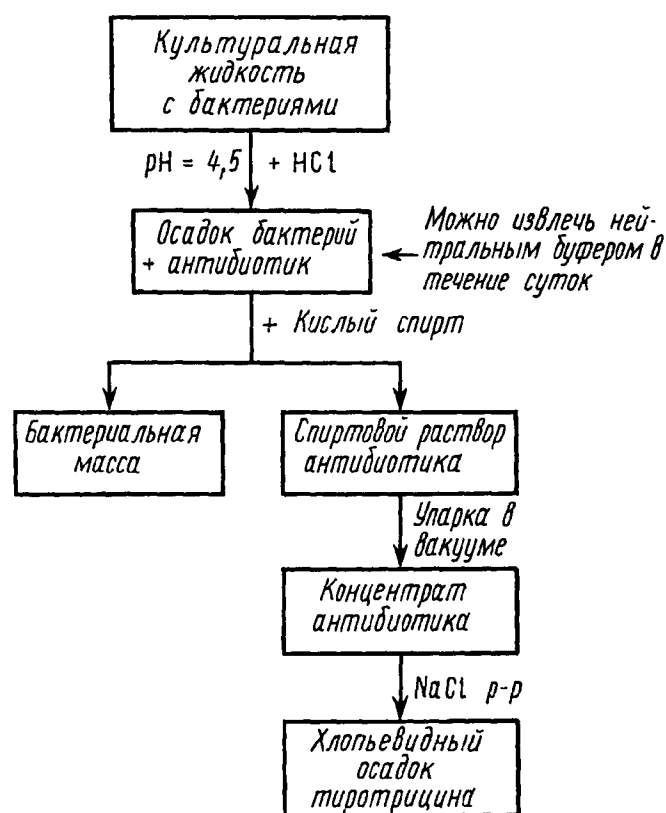


Рис. 26. Схема выделения тиротрицина

Тиротрицин обладает бактериостатическим и бактерицидным действием в отношении грамположительных бактерий и главным образом гноеродных кокков. Преимущество тиротрицина состоит в том, что он действует на те патогенные микробы (например, фекальный стрептококк), на которые не влияют ни пенициллин, ни сульфаниламидные препараты. Грамотрицательные бактерии устойчивы к действию антибиотика.

В 1941 г. было выявлено, что тиротрицин состоит из двух разных полипептидов. Их разделили и дали самостоятельные названия — тироцидин и грамицидин.

При обработке тиротрицина смесью равных объемов ацетона и эфира или одним эфиром в раствор переходит только грамицидин (15–20% от массы тиротрицина). Тироцидин остается нерастворимым.

В 1950 г. было установлено, что фракция тироцидина неоднородна и состоит из трех близких по аминокислотному составу полипептидов, получивших названия тироцидинов А, В и С (табл. 38).

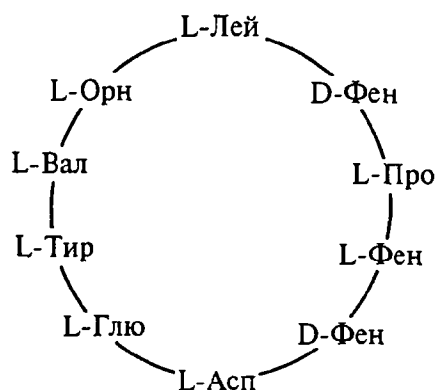
Грамицидиновая фракция тиротрицина также оказалась неоднородной, были выделены четыре полипептида: грамицидины А, В, С_D и D.

**Аминокислотный состав антибиотиков-полипептидов, образуемых
различными штаммами *Brevi bacillus***

Аминокислота	Эдеин	Бреволин	Бревин	Грамицидины				Тироцидины			Эсеин	Бресейн
				А	В	С _D	С(S)	А	В	С		
Треонин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Серин	-	+	2	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Валин	-	+	-	4	4	4	2L	1L	1L	1L	1	2
Орнитин	-	+	-	-	-	-	2L	1L	1L	1L	1	-
Глутаминовая кислота	+	+	-	-	-	-	-	1L	1L	1L	1	6
Пролин	-	-	-	-	-	-	2L	1L	1L	1L	2	-
Изолейцин	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6
Лейцин	-	+	-	4	4	4	2L	1L	1L	1L	2	-
Аспарагиновая кислота	+	-	16	-	-	-	-	1L	1L	1L	4	1
Аланин	-	-	-	2	2	2	-	-	-	-	6	1
Глицин	+	+	1	1	1	1	-	-	-	-	8	-
Фенилаланин	-	-	-	-	1	-	2D	2D1L	2D	1D	-	3
Тирозин	+	+	8	-	-	1	-	1L	1L	1L	-	-
Триптофан	-	-	-	4	3	3	-	-	1L	1L1D	-	-
Аргинин	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Гистидин	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Знак «+» — наличие аминокислотного остатка в молекуле; знак «-» — отсутствие аминокислотного остатка; цифры — количество аминокислотных остатков; L или D — форма аминокислотного остатка.

Тироцидин А ($M=1270$) имеет следующую структуру:



Грамицидины (Gramicidins)

В процессе разделения грамицидиновой фракции установлено, что грамицидин А находится в преобладающем количестве. В отдельных препаратах грамицидиновой фракции содержится около 85% грамицидина А, 9% грамицидина В, 6% грамицидина С_D и

антибиотик синтезируется как в процессе спорообразования (по-видимому, на стадии проспоры), так и активно размножающимися клетками. В период, когда культура переходит к массовому спорообразованию, биосинтез грамицидина отсутствует.

Грамицидин С существенно отличается от грамицидинов, выделенных из тиротрицина, по аминокислотному составу, однако по структуре и действию на бактерии он сходен (но не идентичен) с тироцидином А.

Условия образования. Грамицидин С длительное время получали при выращивании *B. bacillus subsp. G. V.* на средах, содержащих мясной гидролизат, или на 10%-м дрожжевом гидролизате при поверхностном культивировании организма и температуре около 40 °С. В этих условиях образуется до 2000 мкг/мл грамицидина.

Еще в 1962 г. нами (В.В. Коршунов, Н.С. Егоров) установлена принципиальная возможность хорошего роста организма с образованием антибиотика при глубинном культивировании бактерии в колбах на качалках или при продувании воздуха в опытных ферментерах.

Интенсивность аэрации среды для развития *B. bacillus subsp. G. V.* играет существенную роль в образовании грамицидина С. При низкой интенсивности аэрации среды (0,38 г O₂/(л·ч)) бактерии плохо развиваются и слабо синтезируют антибиотик. Это связано, по-видимому, с недостатком кислорода в среде. Повышение интенсивности аэрации до 4,38 г O₂/(л·ч) способствует увеличению скорости роста бактерий и активному потреблению основных компонентов субстрата, что в итоге также приводит к снижению образования антибиотика.

Интервал аэрации, необходимый для биосинтеза грамицидина С, зависит от состава среды. Интенсивность аэрации должна быть не ниже 0,6–2,0 и не выше 5,8 г O₂/(л·ч) (Куплетская, 1965).

Для максимального накопления биомассы бактерий и биосинтеза антибиотика необходимо подобрать сбалансированное сочетание интенсивности аэрации среды и концентрации входящих в нее веществ. При этом источники азота и углерода должны содержаться в среде в некотором избытке.

Источники углерода в условиях глубинного культивирования продуцента грамицидина С на среде, содержащей 0,5% янтарнокислого аммония, по-разному влияют на рост бактерий и образование антибиотика.

Из данных табл. 39 следует, что такие сахара, как глюкоза, галактоза и мальтоза, способствуют сравнительно хорошему росту организма и относительно высокому уровню биосинтеза грамицидина С (до 250–300 мкг/мл). Лактоза и сахароза в тех же условиях среды не оказывают благоприятного влияния на рост продуцента и не способствуют выработке грамицидина С.

Влияние источника углерода на рост *B. bacillus* subsp. G. B.
и биосинтез грамицидина С
(по Коршунову, Егорову, 1962)

Источник углерода	Биомасса, мг/100 мл, через 48 ч	Антибиотик, мкг/мл, через 48 ч	Источник углерода	Биомасса, мг/100 мл, через 48 ч	Антибиотик, мкг/мл, через 48 ч
Глюкоза	220	300	Маннит	100	0
Галактоза	300	250	Этанол	12	0
Мальтоза	250	250	Янтарная кислота	180	350
Сахароза	140	0	Пировиноградная кислота	95	0
Лактоза	160	0	Уксусная кислота	80	25
Крахмал	160	250	Молочная кислота	160	250
Глицерин	460	1000			

B. bacillus интенсивно образует грамицидин (до 2500 мкг/мл) при культивировании на относительно простой синтетической среде (янтарнокислый аммоний — 0,5%; глицерин — 1,5, MgSO₄ — 0,02; K₂HPO₄ — 0,2%; вода дистиллированная; рН среды перед посевом 7,0–7,3). Увеличение концентрации неорганического источника фосфора в среде существенно не влияет на биосинтез грамицидина.

Развитие *B. bacillus* и образование грамицидина С может происходить при температуре как 28, так и 40 °С. Однако в последнем случае максимальный биосинтез антибиотика наблюдается в первые 24 ч развития культуры, а при температуре 28 °С — в период между 24 и 48 ч.

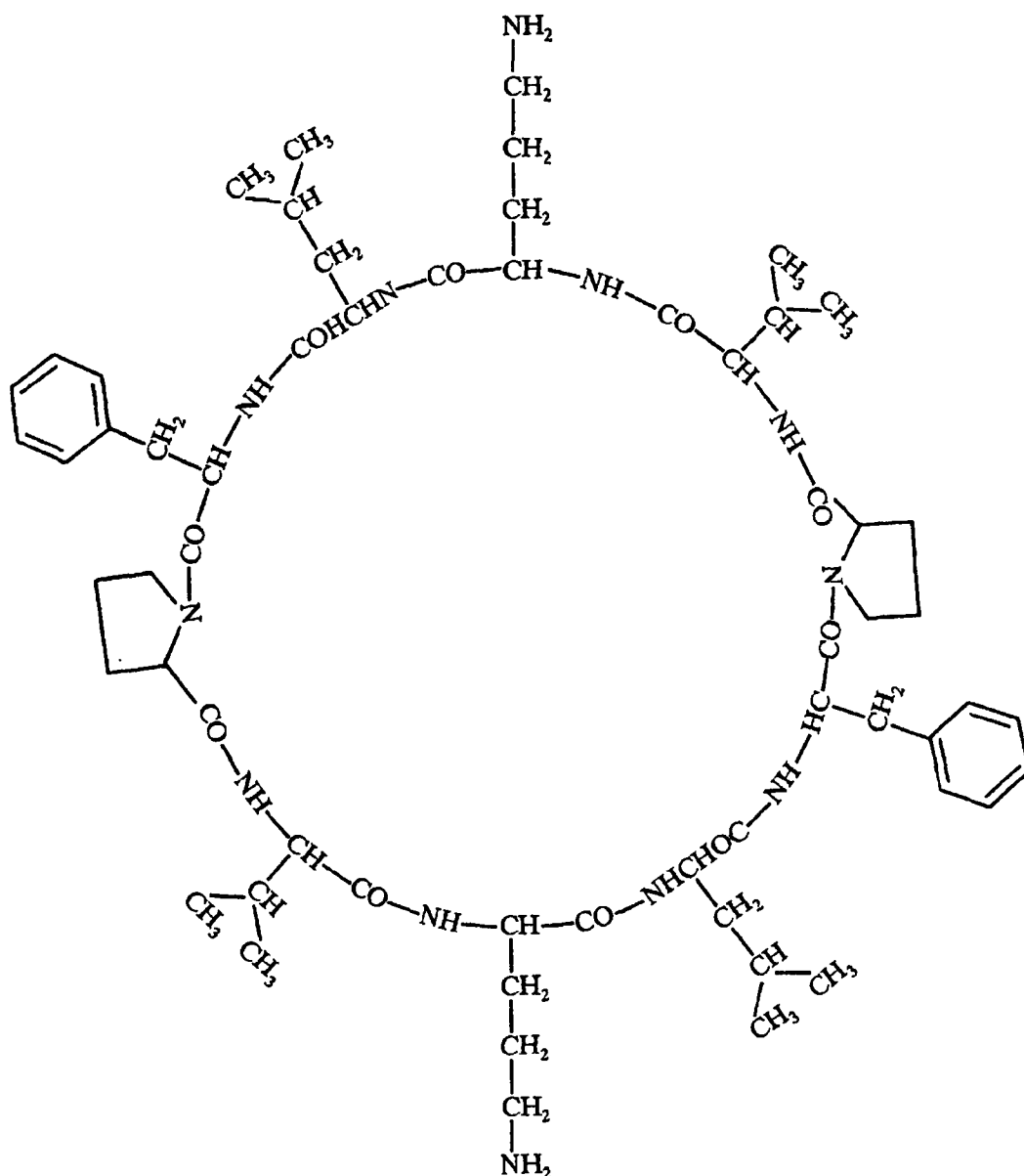
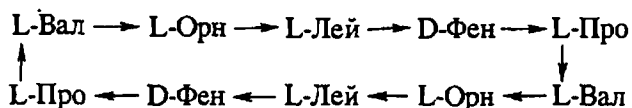
Добавление к натуральной среде неопределенного состава (состоящей из дрожжевого экстракта, мясного экстракта, бактопептона и глюкозы) меченных по углероду ¹⁴С аминокислот, входящих в состав молекулы грамицидина С, показало, что каждая из пяти аминокислот довольно быстро включается в пептидный цикл молекулы антибиотика. Структурные аналоги этих аминокислот подавляли антибиотическую активность, мало затрагивая при этом рост организма и синтез белка. На синтетической среде в присутствии фенилаланина биомасса бактерий увеличивается в 1,5–2 раза, а биосинтез грамицидина С — в 5,4 раза у R-формы по сравнению с контролем (среда без фенилаланина) и в 3,8 раза — у R⁺-формы. Интересно, что аналог фенилаланина β-фенил-β-аланин полностью подавляет антибиотикообразование у R-форм и значительно угнетает рост всех форм изученной бактерии.

На биосинтез грамицидина С существенно влияют некоторые аминокислоты. Так, β-фенил-α-аланин заметно стимулирует образование антибиотика, тогда как ее ближайший аналог β-фенил-β-аланин выступает в роли мощного ингибитора биосинтеза

молекулы грамицидина С. Одна и та же аминокислота в зависимости от штамма продуцента оказывает стимулирующее или ингибирующее действие.

Химическое строение и синтез. Впервые в 1945 г. химическое строение грамицидина С было детально изучено А.Н. Белозерским и Т.С. Пасхиной, которые убедительно доказали отличие его от полипептидов Дюбо.

Грамицидин С — пептид, в состав которого входят пять аминокислот: L-валин, L-орнитин, L-лейцин, D-пролин и D-фенилаланин. В состав же грамицидина Дюбо входят 15 аминокислотных остатков шести аминокислот. При дальнейшем изучении химии грамицидина С, и в частности при определении его молекулярной массы (равной 1141), было установлено, что грамицидин С — декапептид, содержащий в определенной последовательности десять аминокислотных остатков тех же пяти аминокислот:



Из структурной формулы грамицидина С видно, что в нем имеется свободная аминная группа, представленная δ -аминогруппой орнитина. Изучение взаимосвязи между химической структурой грамицидина С и его биологической активностью показало, что свободная аминная группа играет важную роль в антибиотической активности. Блокирование аминогруппы путем ацилирования или ее снятие путем дезаминирования приводит к значительному снижению, а в некоторых случаях к полному подавлению антибиотической активности.

Уровень антибактериальной активности производных грамицидина С зависит не только от присутствия аминной группы, но и от ее положения в молекуле. Если удалить эти основные, биологически активные группы по отношению к циклопептидной части молекулы грамицидина на 2, 5 и 9 атомов углерода от положения их в природном антибиотике, биологическая активность снижается в 7 раз. При ацилировании (замещении кислотными остатками типа $R-\underset{\text{I}}{\underset{|}{C}}=O$) δ -аминных групп орнитина антибио-

тическая активность грамицидина С практически полностью исчезает. Однако алкильные производные грамицидина С по свободной δ -аминной группе орнитина (присоединение метильной или этильной группы) сохраняют антибактериальную активность.

Еще в 1954 г. было показано (В.Ф. Erlanger и L. Goode), что у линейного декапептида, состоящего из тех же остатков аминокислот и в той же последовательности, что и грамицидин С, биологическая активность была почти в 30 раз меньше, чем у природного антибиотика.

Все это указывает на то, что молекула грамицидина С, образуемая в процессе биосинтеза, обладает оптимальной с точки зрения антибактериального действия структурой и определенной жесткостью конформации. С ослаблением жесткости конформации молекулы антибиотическая активность уменьшается или полностью исчезает. Р. Швайзер и П. Зибер в 1956 г. осуществили полный синтез антибиотика.

Биосинтез грамицидина С. Биосинтез антибиотика идет по мультиферментному пути, т.е. не по рибосомальному механизму. Грамицидин С синтезируется клетками *B. bacillus* при участии двух ферментов (грамицидинсинтетазы I и II) в присутствии АТФ и ионов Mg^{2+} . Синетаза I (молекулярная масса 280 000) активирует четыре аминокислоты, входящие в молекулу грамицидина С. Для каждой аминокислоты у этого фермента имеется свой активный центр. Процесс активации аминокислот происходит по следующей схеме: вначале образуются аминокиладенилаты, связанные с ферментом I, затем происходит отщепление АМФ и аминокислоты переносятся на сульфгидрильные группы фермента.

Синетаза II — рацемаза фенилаланина — с молекулярной массой 100 000 активирует фенилаланин также в присутствии АТФ и ионов магния, в результате чего образуется аминокислота, которая переносится на сульфгидрильную группу фермента II с образованием тиоэфира D-фенилаланина.

Пептидные связи между активированными аминокислотами образуются с участием фосфопантетеина, ковалентно связанного с грамицидинсинтетазой I. Перенос D-фенилаланина с синтетазы II на иминную группу L-пролина идет без участия фосфопантетеина. Биосинтез дипептида (фенилаланин–пролин) — это первая стадия образования полипептидного антибиотика. Синтезированный дипептид переносится на фосфопантетеин, с помощью которого этот дипептид в результате пептидилтрансферазной реакции перемещается на аминную группу L-валина.

Образуется трипептид: Фен–Про–Вал. Трипептид переносится на аминную группу орнитина с выходом тетрапептида: Фен–Про–Вал–Орн, который тем же путем переносится на аминную группу лейцина с синтезом пентапептида: Фен–Про–Вал–Орн–Лей.

Одновременно с биосинтезом одного пентапептида при участии идентичного мультифермента происходит образование аналогичного второго пентапептида. Два пентапептида затем соединяются, образуя циклический декапептид, названный грамицидином С.

Грамицидинсинтетазы вырабатываются в период развития культуры, следующий за лаг-фазой, и активность их быстро уменьшается, когда клетки переходят к стационарной фазе развития. Грамицидин С начинает обнаруживаться через несколько часов после начала проявления активности ферментов. Образование антибиотика продолжается и после прекращения активности ферментов в культуральной жидкости.

Грамицидинсинтетазы могут находиться как в растворимой, так и в связанной с мембранами форме. Последняя форма более устойчива и, по-видимому, ответственна за образование антибиотика после инактивации растворимой синтетазы.

Группа сотрудников Массачусетского технологического института (США) в 1973 г. разработала метод ферментативного синтеза грамицидина С. Для синтеза этого антибиотика-полипептида потребовалась иммобилизация нескольких ферментов (грамицидинсинтаз) и разработка АТФ-системы, функционирующей в качестве легко возобновляемого энергетического источника. Использование «многоэтажных» ферментных систем для получения некоторых биологически активных полипептидов — метод весьма перспективный.

Выделение грамицидина С. Грамицидин С выделяют следующим способом. Культуральную жидкость подкисляют соляной кислотой до рН 4,5–5. При этом в осадок выпадают дихлоргидрат грамицидина С и бактериальные клетки продуцента, затем антибиотик из осадка экстрагируется спиртом. Полученный концентрат, содержащий до 4% грамицидина, используют в медицинской практике. Спиртовой концентрат помимо грамицидина С содержит еще несколько близких соединений.

Антимикробный спектр и применение. Грамицидин С обладает довольно высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Bacillus subtilis</i>	10–16
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Shigella dysenteriae</i>	12
<i>Salmonella paratyphi</i>	50
<i>S. typhi</i>	50
<i>Clostridium welchii</i>	7
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	10
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5
<i>N. meningitidis</i>	5
<i>Proteus vulgaris</i>	50
<i>Staphylococcus aureus</i>	3–12
<i>S. pyogenes</i>	3–12

Антимикробный спектр грамицидина С отличается от спектра тиротрицина и его компонентов шириной действия.

Антибиотические свойства грамицидина С сохраняются в присутствии лимфы, сыворотки крови и гноя. Грамицидин С находит применение в хирургии при первичной обработке ран, при лечении инфицированных ран, ожогов и других нагноительных процессов. Антибиотик применяют в акушерско-гинекологической практике при лечении эрозий шейки матки и кольпитов (воспаление слизистой влагалища).

Различные штаммы *B. bacillus* кроме вышеназванных антибиотиков способны синтезировать и другие полипептидные антибиотические вещества. К их числу относятся эдеин, бреволин и бревин, выделенные из культуральной жидкости *B. bacillus*, а также бревиген, гратизин, грацейлин, комисан, мемориалин, эсеин, бресеин и др. Штаммы *B. bacillus*, полученные в результате естественной изменчивости и индуцированным путем, образуют 23 полипептидных антибиотика, отличающихся строением молекулы и аминокислотным составом (табл. 40).

Образование антибиотиков различными штаммами *B. bacillus*

Антибиотик	Продуцент	Число аминокислотных остатков
Бревиген	<i>B. bacillus</i>	6
Бревин	То же	27
Бреволин	»	9
Бресеин	»	22
Грамицидин А	<i>B. bacillus</i> Dubos	15
Грамицидин В	То же	15
Грамицидин С	<i>B. bacillus</i> R, P ⁺	10
Грамицидин С _D	<i>B. bacillus</i> Dubos	15
Грамицидин D	То же	20–21
Гратизин	<i>B. bacillus</i> V-33	12
Грацейлин	<i>B. bacillus</i> P ⁻	34
Комисан	<i>B. bacillus</i> RB-103	12
Мемориалин	<i>B. bacillus</i>	Не установлено
Тироцидин А	<i>B. bacillus</i> Dubos	10
Тироцидин В	То же	10
Тироцидин С	»	10
Эдеин	<i>B. bacillus</i> Vm-4	4
Эсеин	<i>B. bacillus</i> S	29

Бацитрацины (Bacitracins)

Бацитрацины — полипептидные антибиотики, выделенные Б. Джонсоном с соавторами в 1945 г. из культуры *Bacillus licheniformis*. Немного позже (1949) из культуры *B. subtilis*, близкой *B. licheniformis*, была выделена смесь антибиотиков, которая получила название «эйфайвин». Позднее было выяснено, что полипептиды, входящие в эйфайвин, идентичны полипептидам бацитрацина, поэтому было принято решение упразднить название «эйфайвин» и сохранить лишь название «бацитрацин».

Условия образования. Бацитрацины получают при поверхностном или глубинном росте бактерий на соответствующих средах, содержащих глюкозу, лактат аммония и неорганические соли или соевую муку и глюкозу. При развитии *B. licheniformis* и образовании бацитрацина очень важно наличие в среде определенного соотношения углерода и азота. При высоком показателе отношения углерод/азот в среде вырабатываются бацитрацины, но при повышенном соотношении азота к углероду и при развитии бактерий в среде с лактатом аммония преимущество образуется новая группа антибиотиков — лихениформины, в состав которых входят три антибиотика: лихениформин А, В и С.

Смесь всех лихениформинов обладает высокой антибиотической активностью. Так, эта смесь подавляет *in vitro* *Corynebacterium renale* в концентрации 0,025 мкг/мл, *C. diphtheriae* — в концентрации 0,1–0,8 мкг/мл, *S. aureus* — в концентрации 1,3–6 мкг/мл. Лихениформины А и В по сравнению с лихениформином С более активны и вместе с тем менее токсичны.

Антибиотическое действие лихениформины проявляют также в опытах *in vivo*, но сильное токсическое действие оказывают главным образом на почки животных.

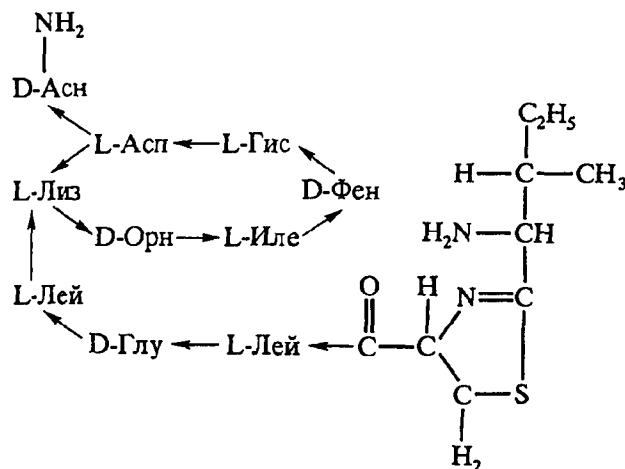
Процесс образования бацитрацина *B. licheniformis* связан со спорообразованием культуры. Антибиотик синтезируется только при таких условиях развития бактерий, которые способствуют их споруляции. Ингибирование процесса спорообразования тормозит биосинтез бацитрацина.

Путем применения радиоактивного антибиотика показано, что бацитрацин в процессе спорообразования включается в споры. Концентрация его в спорах достигает 15% от общего количества образовавшегося антибиотика. В связи с этим высказывается мысль, что биосинтез бацитрацина происходит в конце цикла развития бактерий и антибиотик входит в состав спор как их необходимая составная часть. Его биосинтез, как и ряда других полипептидных антибиотиков, образуемых бактериями, идет по мультиферментному пути. В то же время такой полипептид, как субтилин, образуемый *B. subtilis* и относящийся к лантибиотикам, генетически кодируется и синтезируется на рибосомах.

Методом противоточного распределения получено десять индивидуальных бацитрацинов: А, А₁, В, С, D, Е, F₁, F₂, F₃ и G. Бацитрацин А составляет основную часть выделенных фракций — до 37%.

Важно подчеркнуть, что не все выделенные бацитрацины являются непосредственными продуктами жизнедеятельности бактерий. Например, бацитрацины группы F образуются из бацитрацина А и бацитрацина В в период разделения смеси антибиотиков.

Строение бацитрацина А. С помощью метода хроматографии на бумаге изучен кислотный гидролизат бацитрацина А и установлено, что он состоит из десяти аминокислот: трех остатков L-изолейцина и по одному остатку L-лейцина, L-цистеина, L-гистидина, L-лизина, L-аспарагиновой кислоты, D-фенилаланина, D-орнитина, D-аспарагиновой кислоты и D-глутаминовой кислоты. В добавление к этому выделяется также одна молекула аммиака. Молекулярная масса бацитрацина А примерно 1420. Строение его можно представить следующим образом:



Химическое строение других бацитрацинов изучено менее подробно. Молекулы всех бацитрацинов имеют в своем составе тиазолиновое кольцо.

Антимикробный спектр и применение. Бацитрацины обладают высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий и почти не действуют на грамотрицательные формы:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Bacillus anthracis</i>	80,0–250,0
<i>Corynebacterium diphteliae</i>	0,3–0,08
<i>Clostridium perfringens</i>	0,5–4,04
<i>Flavobacterium</i>	0,05
<i>Micrococcus pyogenes</i>	100–1,0
<i>Micrococci</i> (аэробные)	100–0,10
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,12
<i>Pneumococcus</i>	2,0–0,04
<i>Streptococcus haemolyticus beta</i> (A, B, C, F, G) . .	0,5–0,1
<i>S. haemolyticus D</i>	60–0,16
<i>S. haemolyticus</i> (анаэробные)	0,2–0,02
<i>Troponema pallidum</i>	0,08

По спектру действия эти антибиотики близки к пенициллинам. Вместе с тем бацитрацины влияют на многие микробы, устойчивые к пенициллинам. Бацитрацины проявляют определенное синергидное действие с другими антибиотиками, и в частности с пенициллинами, стрептомицином, хлортетрациклином.

Препараты бацитрацинов, полученные в результате высокой степени очистки, обладают активностью около 60 мкг/мл. При хранении таких препаратов их активность падает примерно до 45 мкг/мл. Более устойчивые формы этих антибиотиков — цинковые соли бацитрацина. В сухом состоянии при комнатной температуре бацитрацины сохраняются довольно длительное время (до двух лет), не теряя своей активности.

В медицинской практике бацитрацины используются преимущественно при местном лечении некоторых гнойных процессов. Их с успехом применяют в целях профилактики и лечения ряда хирургических инфекций, для лечения кожных заболеваний, пневмонии, бациллярной дизентерии и других заболеваний. Появление резистентности у чувствительных к бацитрацину бактерий практически не наблюдается. Механизм действия антибиотика в основном связан с нарушением функции клеточной мембраны, следствием чего является подавление синтеза белка и клеточных стенок чувствительных к бацитрацину бактерий.

При добавке в корма сельскохозяйственных животных бацитрацины могут стимулировать их рост. Однако использование антибиотических веществ в пищевых продуктах должно быть резко ограничено и находиться под строгим контролем компетентных органов.

Изучены антибиотические свойства различных бацитрацинов и показано, что эти свойства в отношении *Corynebacterium xerosis* заметно отличаются:

Бацитрацин	Относительная активность	Бацитрацин	Относительная активность
A	1	F ₁	0,055
B	0,375	F ₂	0,028
C	0,500	F ₃	0,014
D	0,014	G	0,140
E	0,008		

Кроме антибиотической активности бацитрацины различаются и по степени токсичности. Бацитрацин В, например, менее токсичен, чем бацитрацин А. Бацитрацин С токсичнее, чем бацитрацины А и В. Наименее токсичны бацитрацины группы F.

ГЕТЕРОМЕРНЫЕ ПЕПТИДЫ

В эту подгруппу входят полимиксины.

Полимиксины (Polymyxins)

Полимиксины— это родственные антибиотические вещества полипептидной природы, образуемые различными штаммами *Bacillus polymyxa* и *B. circulans*. Об антибиотическом веществе, образуемом *B. polymyxa*, впервые было сообщено в 1947 г. Р. Бенедиктом и А. Лангликком.

П. Стенсли с сотрудниками описали некоторые свойства антибиотика, активного по отношению к грамотрицательным организмам. Эти же авторы предложили назвать выделенный антибиотик полимиксином и определили продуцирующий его организм.

Методом бумажной хроматографии было показано, что разные штаммы *B. polymyxa* образуют разные варианты полимиксина,

отличающиеся аминокислотным составом. Вначале было определено пять разных полимиксинов: полимиксин А (ранее этот антибиотик назывался аэроспорином), полимиксин В, полимиксин С, полимиксин D и полимиксин Е (колистин). В.С. Россовская

Таблица 41

Аминокислотный состав антибиотиков группы полимиксинов

Антибиотик	Треонин	Лейцин	Фенилаланин	Серин	Изолейцин	ДМК	Жирная кислота
Полимиксины:							
A ₁	3L	1D				5L, 1D	6-МОК
A ₂	3L	1D				5L, 1D	6-МГЕП
B ₁	2L	1L	1D			6L	6-МОК
B ₂	2L	1L	1D			6L	6-МГЕП
B ₃	2L	1L	1D			6L	Октаноил
C ₁ (P ₁)	3		1			6	6-МОК
C ₂ (P ₂)	3		1			6	6-МГЕП
D ₁	3L	1L		1D		5L	6-МОК
D ₂	3L			1D		5L	6-МГЕП
E ₁	2L	1L, 1D				6L	6-МОК
(колистин А)							
E ₂	2L	1L, 1D				6L	6-МГЕП
(колистин В)							
F ₁	1	2		1	1	5	6-МОК
F ₂	1	2		1	1	5	6-МГЕП
F ₃	1	2		1	1	5	Октаноил
К	3L	1D				6L	Алифатическая кислота
М	3L	1D				6L	6-МОК
S ₁	3L		1D	1D		5L	6-МОК
T ₁	1L	2L	1D			6L	6-МОК
T ₂	1L	2L	1D			6L	6-МГЕП
Циркулин А	2L	1D			1L	6L	6-МОК
Циркулин В	L	1D			1L	6L	6-МГЕП
Октапептины:							
A ₁		2L, 1D				4L, 1D	ОМДЕК
B ₁		1L, 1D	1L			4L, 1D	ОМДЕК
C ₁		2L	1D			4L, 1D	ОМОК

Примечания. 1. Октапептины близки по аминокислотному составу, но различаются по строению липидной части молекулы. 2. ДМК — остаток α, γ-диамино-масляной кислоты; 6-МОК — 6-метилоктаноил; 6-МГЕП — 6-метилгептаноил; ОМДЕК — оксиметилдеканоил; ОМОК — оксиметилоктаноил.

в 1956 г. выделила из почв Москвы штамм *B. polymyxa* Ross., образующий полимиксин М.

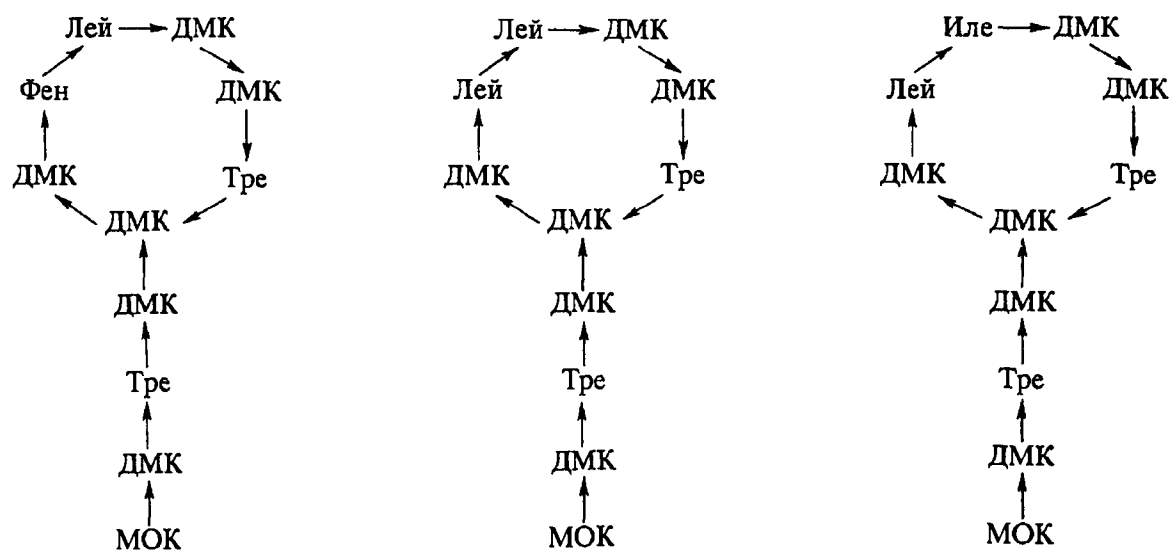
Японские ученые Ю. Кимура, И. Мураи и др. в 1969 г. сообщили о новом полипептидном антибиотике полимиксине Р, который затем был разделен на два полипептида: полимиксин Р₁ и полимиксин Р₂. К этой группе антибиотиков относятся также циркулины (А и В) и октапептины. К настоящему времени описано 35 антибиотиков полимиксинового ряда, в том числе 22 антибиотика, относящиеся собственно к полимиксинам, и 13 — к октапептинам.

Все известные полимиксины различаются аминокислотным составом. Однако в структуре всех этих антибиотиков присутствуют треонин, α, γ-диаминомасляная кислота (ДМК) и одна из жирных кислот (табл. 41), что и дало основание отнести их к гетеромерным пептидам.

Одни штаммы *B. polymyxa* в процессе развития образуют лишь полимиксины А и С, другие — только полимиксины В и D.

Полимиксины по-разному относятся к действию ферментов. Например, полимиксины А и D устойчивы к действию липазы, а полимиксины В (В₁ и В₂) быстро инактивируются под действием этого фермента.

Молекулярная масса полимиксинов, циркулинов и колистинов порядка 1200—1300. Полимиксин В₁ состоит из кольца, включающего три аминокислоты (D-фенилаланин, L-лейцин и L-треонин) и четыре остатка L-диаминомасляной кислоты, а также цепи, состоящей из L-треонина, двух остатков ДМК и метилоктановой кислоты. Аналогичное строение имеют колистин А, циркулин А:



Полимиксин В₁

Колистин А

Циркулин А

ДМК — остаток α, γ-диаминомасляной кислоты;
МОК — остаток 6-метилоктановой кислоты

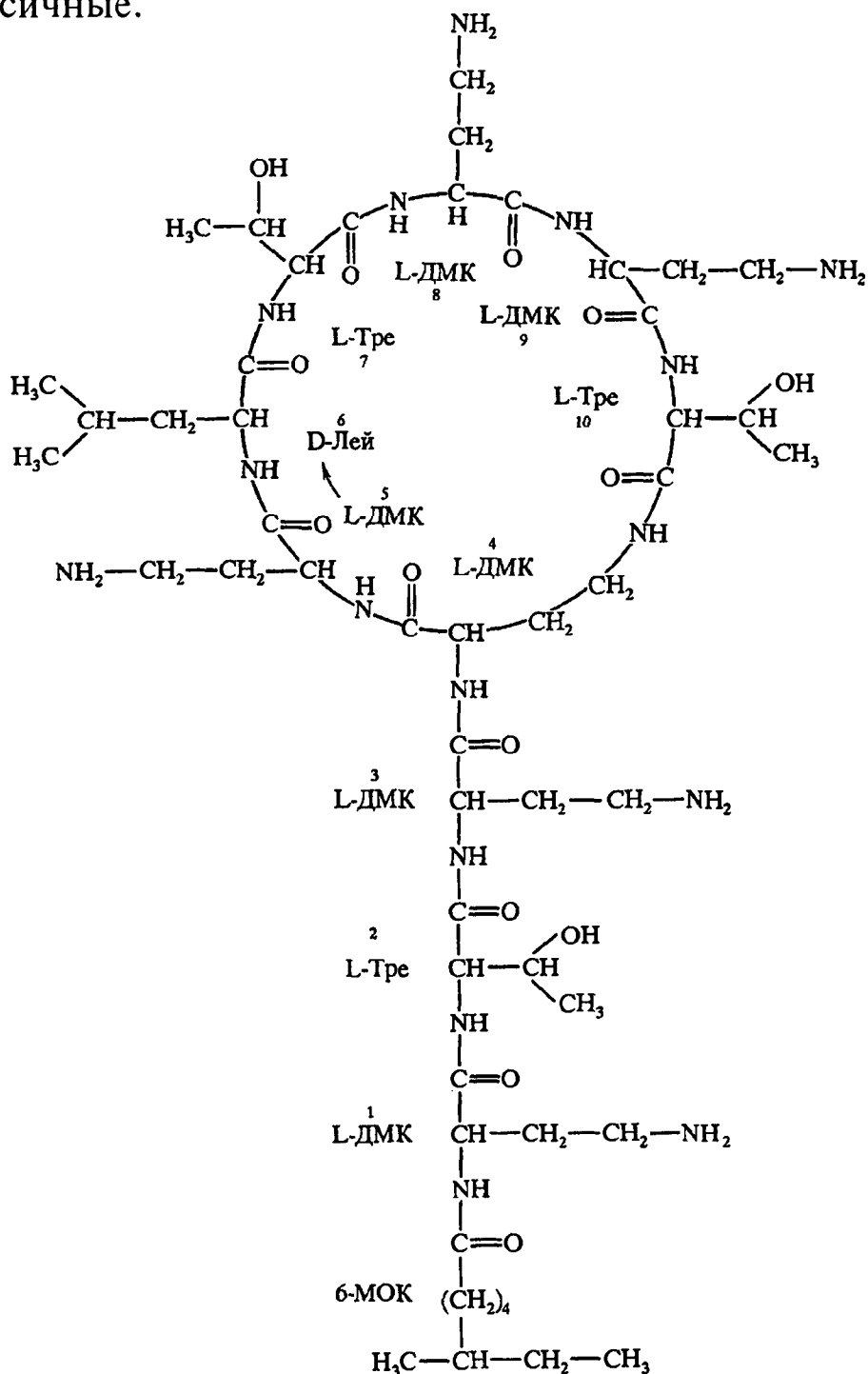
и полимиксин М, структура которого приведена ниже.

Антибактериальная активность полимиксинов определяется специфической структурой молекулы антибиотиков, в которую

входят высокомолекулярная алифатическая кислота, семичленный цикл и три свободных и одна гидроксильная группа в циклической и линейной частях молекулы.

Особенность группы полимиксинов заключается в том, что в составе их молекул имеется 4–5 свободных γ -аминных групп α , γ -диаминомасляной кислоты, что придает полимиксинам свойство катионных детергентов, способных образовывать комплексы с фосфолипидами клеточных мембран. Этим и определяется их антибактериальная активность.

Полимиксины отличаются характером побочных реакций. Так, полимиксины А и D обладают высокой нефротоксичностью, в то время как полимиксины В и Е (колистины) — препараты наименее токсичные.



Строение полимиксина М

Условия образования и выделение. Обычно для получения полимиксинов используют среды, в состав которых кроме неорганических солей входят дрожжевой экстракт, глюкоза, а иногда и другие компоненты.

Для развития продуцентов полимиксина в среде необходимо присутствие сложных растительных компонентов (кукурузный или дрожжевой экстракты, соевая, арахисовая или овсяная мука и другие аналогичные компоненты) или витаминов (биотин, тиамин, никотиновая кислота).

В качестве примера состава среды, пригодной для развития продуцента полимиксина и образования антибиотика, можно рекомендовать следующий (г/л): глюкоза — 20; поваренная соль — 0,1; мел — 3; кукурузный экстракт — 2 мл/л или биотин — 0,5 мкг/мл. Вода водопроводная, рН 7,0–7,2.

V. polymyxa хорошо растет при глубинном культивировании в среде, содержащей кукурузный экстракт.

В качестве дополнительного источника азота можно использовать сернокислый аммоний. Хорошими источниками углерода служат глюкоза, сахароза, крахмал. Основная масса углерода потребляется *V. polymyxa* в условиях глубинного культивирования к 10–15-му часу роста, аминного азота — к 20–30-му. Антибиотик образуется довольно быстро, достигая максимума к 24–30-му часу с последующим сохранением этого уровня в течение 10–15 ч (рис. 27). *V. polymyxa* может образовывать полимиксин D, содержащий L-лейцин, D-серин и другие аминокислоты (см. табл. 41), и на простой синтетической среде.

Добавление к среде D-лейцина подавляет образование антибиотика, но рост бактерии при этом не прекращается. D-серин, L-лейцин и L-треонин не оказывают влияния на биосинтез полимиксина D, а L- α , γ -диаминомасляная кислота стимулирует его. Биосинтез полимиксина В культурой *V. polymyxa* Pfeizer 2459 связан со спорообразованием бактерий. Выработка антибиотика прекращается при нарушении спорообразования. Однако в оболочке спор *V. polymyxa* α , γ -диаминомасляная кислота — основной структурный компонент полимиксина — не найдена.

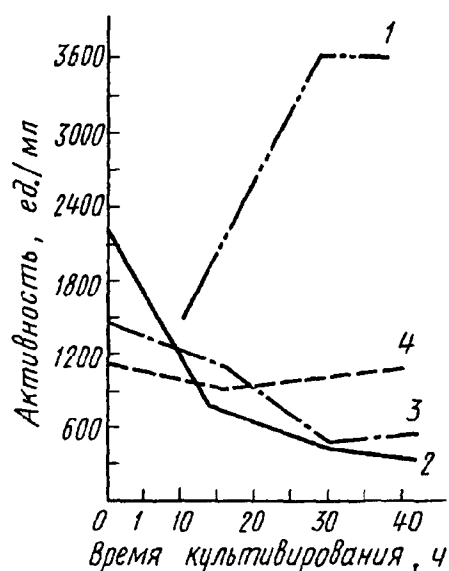


Рис. 27. Динамика потребления питательных веществ субстрата и образование полимиксина культурой *Bacillus polymyxa* (по Ильинской, Россовской, 1958):

1 — образование антибиотика, 2 — потребление углевода, 3 — потребление аминного азота, 4 — изменение рН

Продуцент полимиксина В (*B. polymyxa* 153), развивающийся в условиях, способствующих спорообразованию, синтезирует значительно больше антибиотика, чем клетки бесспорного типа развития. Вместе с тем у данной культуры наблюдается подавление образования спор глюкозой, но в этом случае процесс биосинтеза полимиксина не нарушается.

Специфические ингибиторы биосинтеза полимиксина (D-лейцин, D-треонин), подавляя процесс образования антибиотика, угнетают и спорообразование у *B. polymyxa*. Добавление полимиксина к среде, благоприятной для образования спор клетками *B. polymyxa*, приводит к тому, что процесс споруляции клеток бактерий ускоряется и количество спор возрастает.

Приведенные примеры показывают довольно сложный и до конца не раскрытый механизм взаимоотношения процессов спорообразования и биосинтеза полимиксина. Вместе с тем они приводят к выводу, что биосинтез полимиксинов не зависит от спорообразования клеток продуцента. Однако образование спор в определенной степени связано с биосинтезом антибиотика.

Бактерии, синтезирующие полимиксины, выработали механизмы защиты продуцента от собственного антибиотика. Такой механизм включает ферментативное отщепление жирной кислоты, что приводит к инактивации полимиксина.

Выделение полимиксинов осуществляется разными способами. В одних случаях антибиотики адсорбируют углем и элюируют подкисленным водным ацетоном, метиловым и этиловым спиртами. Выделять антибиотики можно также путем экстракции их из нефильтрованной культуральной среды изопропиловым спиртом (0,25 объема спирта на объем культуральной жидкости) в присутствии сульфата аммония. Для выделения полимиксинов используют и ионообменные смолы. По химической природе полимиксины — основания, поэтому для их выделения используют катиониты.

Антимикробный спектр и применение. Полимиксины избирательно действуют на грамотрицательные бактерии. В отношении *Pseudomonas aeruginosa* полимиксины значительно активнее *in vitro*, чем такие антибиотики, как хлорамфеникол, тетрациклиновые антибиотики, стрептомицин, неомицин и др. На грамположительные формы бактерий полимиксины действуют очень слабо.

Это связано, по-видимому, с тем, что в мембранах грамположительных бактерий, например *Streptomyces sanguis*, присутствуют холестерин и в больших количествах гликолипиды, которые защищают клетки от действия полимиксина В.

Многие полимиксины обладают фунгицидной активностью. Антимикробный спектр некоторых полимиксинов приведен в табл. 42.

Минимальная концентрация полимиксина,
подавляющая рост микроорганизмов, мкг/мл

Микроорганизм	Полимиксины		
	А	В	Д
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,25	0,25	0,45
<i>Brucella bronchiseptica</i>	0,125	0,125	0,15
<i>B. abortis</i>	1,00	1,00	1,25
<i>Escherichia coli</i>	0,25	0,25	0,30
<i>Haemophilus pertussis</i>	0,25	0,25	0,15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,00	2,00	2,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1,00	2,00	1,50
<i>Salmonella typhi</i>	0,25	0,25	0,30
<i>Vibrio comma</i>	0,25	0,25	0,30

Антимикробная активность полимиксинов связана с тем, что эти антибиотики обладают сродством к отрицательно заряженным фосфолипидам клеточных мембран, изменяют их ионную проницаемость, в результате чего клетка теряет ионы калия (K^+).

По антибиотическому действию все полимиксины сходны. В опытах на животных, зараженных грамотрицательными бактериями, обнаружены химиотерапевтические свойства этих антибиотиков. Под действием полимиксинов нарушается функция ферментов дыхательной цепи чувствительных микробов.

Полимиксин В в комбинациях с тетрациклином, бацитрацином и некоторыми другими антибиотиками проявляет синергидное действие.

Полимиксины в виде мазей могут с успехом использоваться при лечении некоторых форм экзем, фурункулов, гидраденитов и других кожных заболеваний.

Полимиксины В и Е применяются при лечении менингитов, инфекций дыхательных путей и мочеполового тракта, наружного отита. Их часто используют в сочетании с другими антибиотиками.

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПЕПТИДЫ

В эту подгруппу входят лантибиотики и бактериоцины.

Лантибиотики

Лантибиотики характеризуются тем, что в их молекулах имеются сульфидные кольца, которые содержат мезолантионин и 3-метиллантионин, а также необычные аминокислоты: дигидромасляную и D-цистеин. К этой группе антибиотиков относятся более 20 лантибиотиков, некоторые из них представлены в табл. 43.

Лангибиотики, их некоторые характеристики и продуценты

Лангибиотик	Молекулярная масса	Число тиоэфиров	Продуцент
Мерсацидин	1825	4	<i>Bacillus subtilis</i>
Микроцин*	—	4	<i>Enterobacteriaceae</i> sp.
Низин А	3353	5	<i>Lactococcus lactis</i>
Низин Z	3330	5	То же
Субтилин	3317	5	<i>B. subtilis</i>
Эпидермин	2164	4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Галлидермин	2164	4	<i>S. gallinarum</i>
Эпиланцин К-7	3032	3	<i>S. apidermidis</i>
Лактицин 481	2901	3	<i>L. lactis</i>
Стрептококцин А	2795	3	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Саливарцин А	2315	3	<i>S. salivarius</i>
Карноцин U 149	4635	2—3	<i>Carnobacterium piscicola</i>
Лактоцин S	3764	3	<i>Lactobacillus sake</i>
Цитолизин LL	4164	?	<i>Enterococcus faecalis</i>
Цитолизин	2631	?	То же

* Молекула микроцина содержит 43 аминокислотных остатка.

По механизму биосинтеза лангибиотики делятся на две группы: антибиотики, которые синтезируются на рибосомах (низины, субтилин), и полипептиды, биосинтез которых осуществляется не рибосомальным механизмом.

Из лангибиотиков подробнее рассмотрим низины.

Низины (Nisins)

Из группы лактококков в 1944 г. был выделен штамм *Lactococcus lactis*, образующий антибиотик низин.

Из культур стрептококка, изолированных из естественных мест обитания (молоко), можно получить более активные штаммы путем высева суспензии клеток продуцента на среды, содержащие в своем составе определенные концентрации низина, а также в результате получения мутантов, образующихся в процессе обработки клеток стрептококка ультрафиолетовым, рентгеновским излучением, γ -излучением, и методом слияния протопластов.

В группу низинов входит ряд форм антибиотиков — низины А, В, С, D. Низины А, В и С кроме общих для всех вариантов аминокислот имеют по два остатка валина и метионина, а в низине D эти аминокислоты отсутствуют.

Иногда низины А, В и С объединяют в низин А, а низин D называют низином Z.

Низин А чувствителен к ферменту низиназе, образуемому культурой *B. cereus*, а низин Z устойчив к этому ферменту. Наиболее биологически активный вариант — низин А.

Низин подавляет развитие ряда грамположительных и некоторых кислотоустойчивых бактерий, не оказывает влияния на грамотрицательные бактерии, дрожжи и плесневые грибы. Антибиотик подавляет развитие многих микроорганизмов: *Micrococcus pyogenes*, различные виды *Bacillus*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, некоторые виды *Streptomyces*. Низин не оказывает антимикробного действия на *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Shigella*, некоторые виды *Neisseria*.

Низин влияет на споры чувствительных к нему бактерий, которые более богаты катионами по сравнению с вегетативными клетками, и выступает как катионитный детергент. Антибиотик, адсорбируясь на поверхности спор, в момент прорастания нарушает проницаемость цитоплазматической мембраны и таким образом подавляет рост развивающихся клеток бактерий.

Низин способен также реагировать с сульфгидрильными группами биологически важных соединений, выводя их из реакций метаболизма. Первичной мишенью действия низина является цитоплазматическая мембрана.

Этот антибиотик впервые был получен в Англии под торговой маркой «Низаплин». Типичный препарат «Низаплин» содержит: низина 1 млн МЕ, или 25 мг, на 1 г препарата (2,5%), хлорида натрия 74,5%, денатурированного молока (сухого) 23,8%. Влажность препарата 1,7%. 1 мкг чистого низина соответствует приблизительно 40 МЕ.

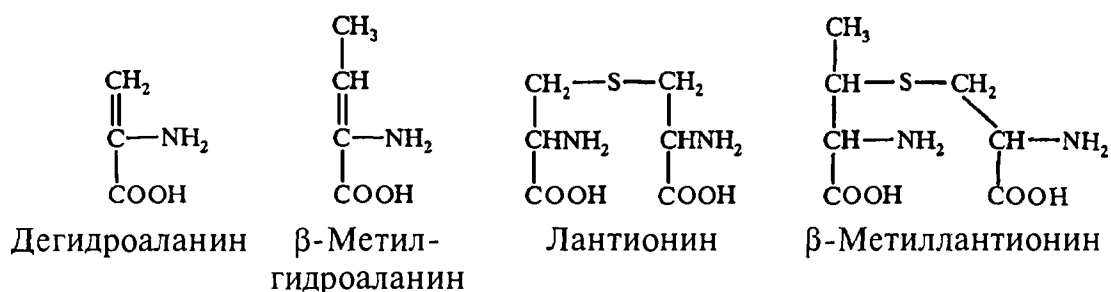
Низин нашел применение в пищевой промышленности в качестве консерванта некоторых скоропортящихся продуктов (томаты, зеленый горошек и др.), а также для предупреждения порчи сыров. Консервированный сыр, не содержащий низина, полностью портится в течение 25–50 дней. При добавлении к сыру 50 ед./г низина за 200 дней хранения было испорчено всего лишь 27% банок с сыром, взятых в опыт.

Безопасность использования низина при хранении пищевых продуктов обусловлена тем, что, имея полипептидную структуру, этот антибиотик в организме человека быстро разрушается до аминокислот ферментами пищеварительного тракта. Благодаря этому исключается возможность накопления низина в организме человека и появления резистентных к нему форм микроорганизмов.

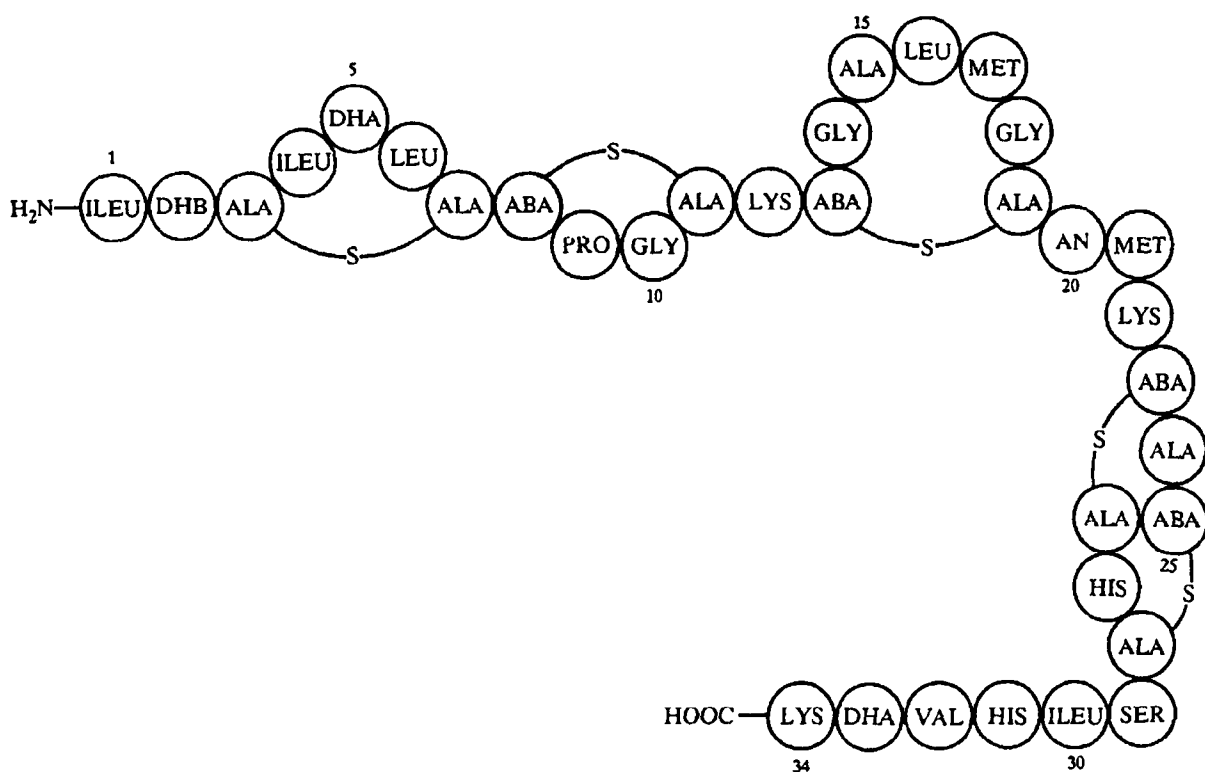
Низин не используется в медицинской практике, но с успехом применяется в ветеринарии для лечения маститов у коров. Есть сообщения об активности низина в отношении малярийного плазмодия.

Строение низина. В конце 60-х гг. началось активное изучение химии низина. Было установлено, что низин имеет молекулярную массу, равную 3500. Причем антибиотик может полимеризоваться и образовывать из мономера димер (молекулярная масса 7000) и тетрамер (молекулярная масса 14 000). Полимеризацию низина связывают с наличием в его молекуле дегидроаланина.

В состав молекулы низина входят 34 аминокислотных остатка 15 аминокислот: лизина, гистидина, аспарагиновой кислоты, серина, пролина, глицина, аланина, валина, метионина, изолейцина, лейцина, а также остатки ненасыщенных аминокислот — дегидроаланина и β -метилдегидроаланина и редко встречающихся серосодержащих аминокислот — лантионина и β -метиллантионина:



И. Гросс с сотрудниками в 1970 г. установили следующую структуру молекулы низина:



ABA — аминокислотная кислота

DHA — дегидроаланин

ALA-S-ALA — лантионин

DHB — дегидробутирин (β -метилдегидроаланин)

ABA-S-ALA — β -метиллантионин

Определено положение пяти сульфидных мостиков, образованных остатками β -метиллантионина и лантионина.

Биологическая активность низина обусловлена наличием в его молекуле α , β -ненасыщенных аминокислот (дегидроаланин, β -метилдегидроаланин). Это подтверждается тем, что аналоги низина, не содержащие дегидроаланинлизина, а также пирувиллизин не активны по отношению к *Staphylococcus aureus*.

Димеры и тетрамеры низина с молекулярной массой соответственно 7000 и 14 000, подобно мономеру, обладают биологической активностью.

Низин — это кислота, и поэтому он более стабилен в кислых условиях среды. Раствор антибиотика при pH 2 остается стабильным в течение длительного времени в интервале температуры от 2 до 7 °С и выдерживает кипячение до 120 °С без потери активности.

Фермент низиназа, образуемый культурой *B. polymyxa*, инактивирующий низин, по-видимому, специфически действует на пептиды, содержащие дегидроаланин.

Условия образования. Изучению условий образования низина культурой *Lactococcus lactis* (штамм МГУ) посвящен ряд работ, выполненных на биологическом факультете МГУ. Наши исследования показали, что интенсивная аэрация культуры лактококка не оказывает благоприятного влияния ни на рост бактерий, ни на образование низина.

Более существенно влияет на развитие продуцента низина и биосинтез антибиотика pH среды. С понижением pH среды увеличивается выделение низина из клеток в культуральную жидкость. Так, при pH 4,3 более 90% низина выделяется в среду, а при pH 6,8 — лишь 40%. Необходимо иметь в виду, что для роста лактококка и образования им низина оптимальное значение pH 6,5–6,8.

Быстрый синтез низина культурой лактококка начинается в период ранней стационарной фазы развития продуцента.

Изучение влияния источников азота на рост *L. lactis* и образование низина показало, что лучшие азотсодержащие компоненты в средах — дрожжевой автолизат, пептон или казеиновый гидролизат. Относительно высокий выход антибиотика наблюдается при развитии лактококка на средах, содержащих аммонийные соли органических кислот.

Хорошим источником углерода для роста бактерий и биосинтеза низина служит глюкоза. Добавление к среде с глюкозой двух-, трех-, четырех- и пятиуглеродных органических кислот способствует повышению роста продуцента антибиотика и некоторому увеличению образования им низина.

Предшественниками биосинтеза лантионина являются серин и цистеин, β -метиллантионина — треонин и цистеин.

В процессе развития *L. lactis* нередко наблюдается значительная инактивация низина, как находящегося в культуральной жидкости, так и связанного с клетками бактерий, которая, по-видимому, обусловлена изменением структуры молекулы антибиотика, степенью его полимеризации или образованием биологически неактивных компонентов низина с солями кальция, входящими в состав клеточных стенок лактококка.

Белок, и в частности казеин, уменьшает инактивацию низина, обладает защитными свойствами. Это подтверждается результатами исследований, проведенных на кафедре микробиологии МГУ. В процессе культивирования *L. lactis* (штамм МГУ) с рН-стабилизацией и при внесении в среду казеина наблюдается не только стабилизация антибиотической активности, но и повышение образования антибиотика (табл. 44).

Таблица 44

Определение концентрации низина (МЕ/мл), образуемого *Lactococcus lactis* (штамм МГУ) при различных условиях культивирования с рН-стабилизацией

Низин	Время культивирования лактококка, ч							
	9				24			
	Без стабилизации рН	Стабилизация рН			Без стабилизации рН	Стабилизация рН		
		без казеина	с казеином, 1%	с казеином, 3%		без казеина	с казеином, 1%	с казеином, 3%
Общий	3400	4100	5000	5300	2050	800	2650	3300
В фильтре	2400	2400	3000	3000	1300	200	1600	2250
В клетках	1000	1700	3000	2300	750	600	1050	1050

Механизм биосинтеза низина. Механизм биосинтеза таких полипептидных антибиотиков, как актиномицины, грамицидины, полимиксины, бацитрацины и др., принципиально отличается от синтеза белка. Ингибирование синтеза белка у микроорганизмов — продуцентов названных антибиотиков не приостанавливает образования антибиотиков-полипептидов.

Ингибиторы белкового синтеза (хлорамфеникол и пуромицин), а также ингибитор синтеза РНК (актиномицин D), добавленные к культуре *L. lactis*, подавляют как синтез белка независимо от времени их введения, так и синтез низина. Причем биосинтез низина более чувствителен к действию этих ингибиторов, чем белковый синтез.

Эти факты дают основание высказать предположение, что в отличие от других полипептидных антибиотиков путь синтеза низина сходен с путем образования белков, т.е. связан с рибосомным механизмом.

Синтез низина идет через образование низиноподобных белков — предшественников биосинтеза антибиотика, причем превращение пренизина в низин происходит под действием фермента на внешней поверхности мембраны клетки лактококка.

Процесс включения меченой серы (^{35}S) цистеина в лантионин и β -метиллантионин ингибируется хлорамфениколом в большей степени, чем включение цистеина в белок. Это также указывает на то, что низин синтезируется с участием рибосомного механизма.

Биосинтез низина из молекулы-предшественника кодируется геном, находящимся не на плазмиде, а на хромосоме.

Механизм биосинтеза низина и его молекулярная масса позволяют рассматривать этот антибиотик как низкомолекулярный основной белок. Это дало основание некоторым авторам отнести низины и всю группу лантибиотиков к бактериоциноподобным веществам.

L. lactis кроме низина синтезирует шесть других основных белков, не обладающих антибиотическими свойствами. Низин составляет лишь 20% от основных белков, образуемых лактококком.

Бактериоцины (Bacteriocins)

Многие представители грамотрицательных и грамположительных бактерий продуцируют антибиотические вещества белковой или пептидной природы, убивающие родственные виды бактерий и штаммы того же вида, или тормозящие их рост, или же имеющие более широкий спектр антибактериального действия.

Различные штаммы *E. coli* способны образовывать антибактериальные вещества белковой природы с молекулярной массой от 50 000 до 90 000, получившие название колицинов.

Джакоб с соавторами в начале 50-х гг. XX в. предложили называть антимикробные белки колицинового типа бактериоцинами.

Известны четыре разновидности колицинов: E_1 , E_2 , E_3 и К. Эти антибиотики подавляют развитие *E. coli*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella paradysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* и некоторых других видов бактерий.

Колицины синтезируются на рибосомах и регулируются плазмидами. Они подавляют метаболизм чувствительных к ним клеток бактерий на уровне цитоплазматических мембран, обладают способностью блокировать клеточное деление бактерий и ингибировать синтез ДНК и РНК.

Полипептидные цепи колицинов организованы в виде трех доменов, один из которых (С-концевой) обладает порообразующей активностью (так называемые киллер-поры).

Бактериоцины способны вырабатываться не только представителями рода *Escherichia*, но и бактериями других родов (*Shigella*, *Salmonella*, *Serratia*) семейства *Enterobacteriaceae*. Эти антимикробные

белки продуцируются также грамотрицательными бактериями, относящимися к таким семействам, как *Pseudomonadaceae*, *Neisseriaceae*.

Большое число бактериоцинов вырабатывается грамположительными бактериями. Значительное место среди этих продуцентов занимают лактобактерии. Бактериоцины, продуцируемые лактобактериями, подразделяют на две группы. Представители первой группы характеризуются узким спектром антибактериального действия, они подавляют развитие бактерий, близких к организму-продуценту. В эту группу входят следующие бактериоцины: лактоцин S (образуемый *Lactobacillus sake*), амиловорин (*L. amylovorus*) и др. Ко второй группе относятся антибиотики, ингибирующие рост многих видов грамположительных микроорганизмов. Сюда относятся такие бактериоцины, как ацидоцин В (образуемый *L. acidophilus*), курвацин (*L. curvatus*), лактицин (*Lactococcus lactis*) и ряд других.

Биосинтез бактериоцинов осуществляется и другими представителями грамположительных бактерий. Так, *Brevibacterium linens* образует липоцин, активный в отношении *Listeria monocytogenes*; *Bifidobacterium* sp. осуществляет синтез бактериоцина, подавляющего рост лактококков, лактобацилл, клостридий.

Бактериоцины продуцируют и анаэробные бактерии, относящиеся к роду *Clostridium*. Так, *C. botulinum* образует ботуцины, *C. butyricum* — бутироцины, *C. perfringens* — перфрингоцины.

Механизм биологического действия бактериоцинов связан прежде всего с нарушением цитоплазматических мембран чувствительных к ним микроорганизмов.

Биосинтез бактериоцинов регулируется особыми плазмидами и происходит в большинстве случаев на рибосомах. Эти продукты жизнедеятельности бактерий инактивируются протеиназами (пепсином и трипсином) и устойчивы к нагреванию, что подтверждает их белковую или пептидную природу.

Бактериальные клетки, образующие бактериоцины, вместе с тем обладают механизмом защиты себя от действия этих белков. У *E. coli*, вырабатывающей колицин группы E, имеется плаزمид Col E, которая кодирует синтез антибактериальных белков колицинов. Эта же плаزمид вместе с тем кодирует и синтез специфических иммунных белков, которые защищают клетки *E. coli* от действия колицина того же иммунного типа.

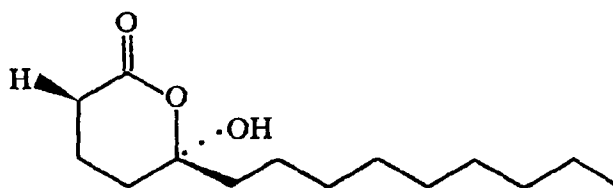
Некоторые бактериоцины (вибриоцин, пиоцины, колицины) способны ингибировать опухоли. Бактериоцины, вырабатываемые лактобациллами и лактококками, находят применение в пищевой промышленности: при производстве сухих колбас, ферментации зеленых олив, приготовлении йогуртов, сыров и других продуктов. В качестве средств борьбы с фитопатогенными организмами перспективно использовать непосредственно сами бактерии — продуценты бактериоцинов.

Антибиотики цианобактерий

В соответствии с современными взглядами к бактериям относятся все организмы, имеющие прокариотный тип организации клетки. Это дало основание отнести группу синезеленых водорослей к бактериям, которые получили название цианобактерий. К настоящему времени выделено более 300 видов чистых культур этих микроорганизмов, относящихся более чем к 20 родам.

Цианобактерии очень мало изучены с точки зрения образования ими антибиотических веществ. Известно, что эти микроорганизмы, обитающие как в пресных, так и в морских водах, способны выделять ряд токсических соединений, которые можно рассматривать в качестве антибиотических веществ.

Антибиотические вещества, продуцируемые цианобактериями, обобщенно называют **цианобактеринами**. Среди этих веществ можно назвать антибиотик **малинголид**, вырабатываемый морской цианобактерией *Lyngbya majuscula*. Он обладает антибактериальной активностью в отношении *Mycobacterium smegmatis* и некоторых грамположительных бактерий. В 1979 г. Д. Кардлина с соавторами установили структуру малинголида:



А. Веприцкий, Н. Титова и др. (1989) выделили два штамма цианобактерий, относящиеся к родам *Stratonstoc* и *Amorphonostoc*, способные продуцировать новые цианобактерины ЛУ-1-892 и ЛУ-2-893 соответственно. Эти цианобактерины активны в отношении ряда видов цианобактерий, но не обладают биологической активностью по отношению к грибам и бактериям. Надо полагать, что в будущем цианобактерии будут более активно изучаться как продуценты антибиотиков.

Образование D-аминокислот, входящих в состав полипептидных антибиотиков

Известно, что в состав многих антибиотиков-полипептидов бактериального происхождения (граммицидины, полимиксины, бацитрацины и др.), а также антибиотических веществ, образуемых стрептомицетами (актиномицины, эхиномицин, этамицин, валиномицин и др.), наряду с аминокислотами, имеющими L-конфигурацию, входят D-аминокислоты. К числу последних

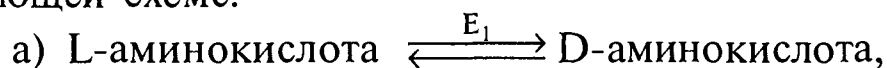
относятся глутаминовая и аспарагиновая кислоты, фенилаланин, орнитин, лейцин. D-аминокислоты включаются также в состав гликопептидов и тейхоевых кислот, входящих в клеточные стенки бактерий.

D-аминокислоты образуются при развитии организмов на средах, не содержащих указанных D-аминокислот. Более того, например, продуцент грамицидина С образует антибиотик при развитии бактерий на простой синтетической среде, где в качестве источника азота присутствует только янтарнокислый аммоний, а полимиксин М синтезируется бактериями при развитии их на среде, содержащей в качестве единственного источника азота лишь $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Аналогичное положение наблюдается и в случае образования полипептидных антибиотиков стрептомицетами. Внешение в субстрат D-аминокислот, входящих в состав образуемого микроорганизмом антибиотика, в ряде случаев тормозит развитие продуцентов и биосинтез антибиотика.

Каковы же основные пути биосинтеза D-аминокислот, входящих в состав полипептидных антибиотиков? Известны два механизма (и оба у микроорганизмов) образования D-аминокислот:

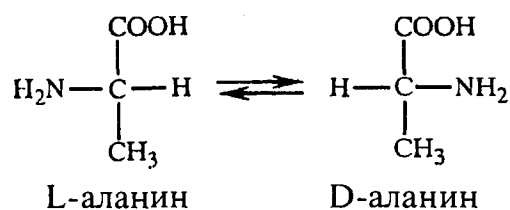
1) непосредственная рацемизация L-аминокислоты в D-аминокислоту под действием фермента рацемазы;

2) трансаминация (переаминирование) между D-аминокислотой и соответствующей α -кетокислотой с образованием других D-аминокислот. Реакция катализируется ферментами аминотрансферазами, которые образуются также микроорганизмами. Эти два процесса могут идти последовательно: второй за первым по следующей схеме:

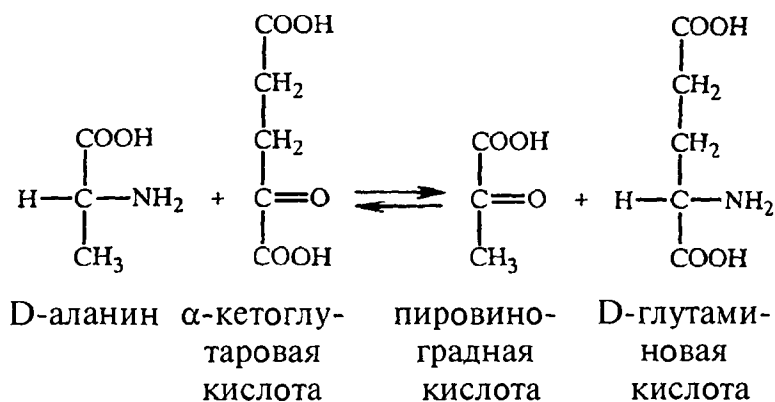


где E_1 = рацемаза, E_2 = аминотрансфераза.

Если в результате рацемизации образовалась лишь одна D-аминокислота, например D-аланин из L-аланина:



то в процессе трансаминации (переаминирования) с соответствующими α -кетокислотами может образоваться несколько D-аминокислот. Например, из α -кетоглутаровой кислоты и D-аланина могут образоваться пировиноградная и D-глутаминовая кислоты:



При изучении *B. licheniformis* установлено, что бесклеточные бактериальные экстракты исследуемого организма обладают аланин-рацемазной активностью.

Кроме того, *B. licheniformis*, а также *B. subtilis* и *B. anthracis* вырабатывают фермент аминотрансферазу (трансаминазу), способный катализировать реакцию переноса аминогруппы от D-аланина на соответствующие α-кетокислоты с образованием D-глутаминовой кислоты, D-аспарагиновой кислоты, D-аспарагина и D-орнитина. Трансаминация между D-глутаминовой кислотой и соответствующими α-кетокислотами приводит к синтезу D-орнитина, D-аспарагиновой кислоты, D-аспарагина и D-фенилаланина.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте антибиотики, образуемые бактериями.
2. Грамицидин С и условия его биосинтеза.
3. Характеристика полимиксинов, условия их образования.
4. Бацитрацины, условия их образования и свойства.
5. Характеристика низинов и их практическое применение.
6. Антибиотики цианобактерий.
7. Основные пути синтеза бактериями D-аминокислот, входящих в состав полипептидных антибиотиков.

Глава 8

АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ АКТИНОМИЦЕТАМИ

Наибольшее число антибиотиков (не менее 70%), широко применяемых на практике, относится к веществам, образуемым актиномицетами (порядок *Actinomycetales*). Этот порядок включает несколько родов: *Streptomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *Saccharopolyspora* и др. Продуцентом большинства известных к настоящему времени антибиотиков, синтезируемых актиномицетами, является род *Streptomyces*.

Антибиотики, продуцируемые актиномицетами, по химическому строению относятся к различным группам соединений: от относительно простых (саркомицин) до таких сложных структур, как хромопептиды (актиномицины), гликопептиды (блеомицины).

Выделение и изучение антибиотических веществ актиномицетного происхождения приняло очень широкие размеры. В результате настойчивых поисков получено много ценных препаратов, применяемых в химиотерапии, в сельскохозяйственной практике и в пищевой промышленности. Один из первых антибиотиков стрептомицетного происхождения — мицетин — открыт советскими учеными Н.А. Красильниковым и А.И. Коренько еще в 1939 г. К 1940 г. были описаны и сравнительно подробно изучены два антибиотических вещества, образуемых стрептомицетами: актиномицетин (М. Вельш, 1937) и мицетин.

Следовательно, к моменту получения очищенного пенициллина (1940) и обнаружения его замечательных лечебных свойств уже было известно, что и среди стрептомицетов имеются штаммы, способные образовывать антибиотические вещества, а многие стрептомицеты обладают сильными антагонистическими свойствами в отношении разнообразных микроорганизмов. Указанное обстоятельство, безусловно, не могло не привлечь внимания исследователей к этой группе микроорганизмов.

В 1941 г. в лаборатории З. Ваксмана был выделен антибиотик актиномицин, образуемый *Streptomyces antibioticus*. Спустя год под руководством З. Ваксмана был выделен стрептотрицин, образуемый *S. lavendulae*. Однако эти антибиотические вещества не привлекли к себе широкого внимания ученых и практиков, так как обладали сильными токсическими свойствами. Выделение и изучение этих антибиотиков явились преддверием к открытию З. Ваксманом и его сотрудниками в 1944 г. замечательного антибиотического препарата стрептомицина, образуемого культурой *S. griseus*.

Открытие стрептомицина и выяснение его ценных лечебных качеств послужили мощным толчком к исследованию стрептомицетов и поискам среди них продуцентов новых антибиотических веществ. Широкие поиски увенчались открытием таких ценных антибиотиков, как хлоромицетин (хлорамфеникол), неомицин, хлортетрациклин, тетрациклин и многие другие.

Изучение антибиотических свойств актиномицетов, их распространения в природе продолжается и до настоящего времени, обогащая науку и практику все новыми и новыми антибиотиками, находящими применение в различных областях медицины, сельского хозяйства и промышленности.

К настоящему времени описано большое число (более 16 000) антибиотиков, образуемых бактериями, грибами, водорослями, высшими растениями и животными.

Актиномицеты продолжают привлекать к себе большое внимание исследователей прежде всего как потенциальный источник продуцентов новых антибиотиков, обладающих антибактериальным, антигрибным и противоопухолевым действием. Кроме того, актиномицеты способны образовывать антибиотические вещества, ингибирующие ферменты, а также являющиеся иммуномодуляторами, гербицидами, инсектицидами. Они могут синтезировать и другие биологически активные соединения.

Известно, что стрептомицеты имеют одну существенную особенность: генетическую нестабильность популяций. Причем некоторые признаки популяционной неоднородности коррелируют с антибиотикообразованием. Среди таких признаков можно назвать чувствительность к антибиотикам, споруляцию, образование пигмента, а также электрокинетический потенциал, формирующийся поверхностным зарядом клетки.

Ценные антибиотики образуются многими видами рода *Streptomyces*, а также представителями *Nocardia*, *Actinomadura*, *Micromonospora* и других редко встречающихся родов актиномицетов.

Выделение новых антибиотиков, продуцируемых актиномицетами, и их изучение продолжаются.

Мы не имеем, естественно, возможности рассмотреть все антибиотики (их к настоящему времени известно более 6000), образуемые этой группой микроорганизмов. Поэтому здесь будут рассмотрены лишь те, которые имеют наиболее важное практическое значение.

Как уже отмечалось, одним из первых актиномицетных антибиотиков, завоевавших широкую известность, был стрептомицин, принадлежащий к семейству углеводовных антибиотиков, группе аминогликозидов.

Семейство углеводовных антибиотиков

Из семейства углеводовных антибиотиков мы рассмотрим аминогликозиды, или аминоциклитолы.

АМИНОГЛИКОЗИДНЫЕ АНТИБИОТИКИ, ИЛИ АМИНОЦИКЛИТОЛЫ

В группу аминогликозидных антибиотиков (аминоциклитолов) включают биологически активные соединения, содержащие в молекулах два или более аминсахара, которые связаны гликозидными связями с аминоциклитольным кольцом. К этим ан-

тибиотикам относятся стрептомицины, рибостамицин, неомицины, канамицины, тобрамицин, гентамицины, селдомицины, фортимицины и некоторые другие вещества. Известно более 100 антибиотиков, относящихся к этой группе соединений. Аминогликозиды имеют большое практическое значение. Несмотря на выделение многих новых антибиотиков, в том числе цефалоспоринов третьего и четвертого поколений, аминогликозиды до сих пор широко применяются в медицинской практике для лечения тяжелых инфекционных заболеваний, и в первую очередь различных форм туберкулеза.

Открытие новых аминогликозидных антибиотиков продолжается. Установлено, что аминогликозиды образуются не только определенными видами стрептомицетов, но и отдельными представителями родов *Micromonospora* (фортимицины, гентамицины), *Pseudomonas* и *Streptoverticillum* (сорбистины), нового рода актиномицетов — *Saccharopolyspora* (спорарицины), а также *Bacillus* (бутирозин).

Аминогликозидные антибиотики, исходя из их химического строения, делятся на несколько групп (см. классификацию антибиотиков, с. 35). Мы рассмотрим наиболее значимые аминогликозидные антибиотики, относящиеся к трем группам.

К 1-й группе относятся стрептомицин и родственные ему соединения.

Стрептомицин (Streptomycin)

Актиномицет, образующий стрептомицин, впервые выделен в лаборатории микробиологии Ратжерского университета в 1943 г.

Первое сообщение о выделении антибиотика было сделано А. Шатц, И. Буги и З. Ваксманом в январе 1944 г. Антибиотик получал название «стрептомицин» (от родового названия актиномицетов *Streptomyces*), а организм, образующий этот антибиотик, был определен как *S. griseus*.

Стрептомицин вырабатывают не только штаммы *S. griseus*, но и другие стрептомицеты: *S. bikiniensis*, *S. raneus*, *S. humidus*, *S. reticuli*, *S. griseocarneus*, *S. mashuensis*. Однако основным продуцентом стрептомицина признан *S. griseus*, на характеристике свойств которого мы и остановимся.

В результате изменчивости продуцента стрептомицина нередко появляются аспорогенные формы, т.е. формы, лишенные воздушного спороносного мицелия. Как правило, эти варианты или вообще неактивны, или образуют незначительное количество стрептомицина. Снижение продуцирования антибиотика наблюдается и у вариантов с усиленной споруляцией.

Можно с определенностью отметить, что изменчивость многих видов стрептомицетов — это результат генетической нестабильности названных микроорганизмов, обусловленный существенными перестройками ДНК, которые затрагивают многие гены, в том числе гены биосинтеза антибиотиков и гены устойчивости к ним.

Для стабилизации признаков, связанных с антибиотикообразованием, при хранении и поддержании штамма иногда в среды, на которых хранится и поддерживается продуцент антибиотика, добавляют вещества (антимутагены), способные стабилизировать процессы, приводящие к хромосомным перестройкам и регуляции экспрессии генов. К антимутагенам относится ряд разнообразных по химическому строению веществ. Среди них можно назвать пуриновые нуклеотиды, ионы марганца, L-метионин, гистидин, полиамины, кофеин и др.

Стрептомицин — это один из классических, преимущественно противотуберкулезных антибиотиков. К настоящему времени выделен ряд аминокгликозидов, превосходящих по своим свойствам стрептомицин и заменяющих его в медицинской практике. Однако условия образования, механизм биосинтеза и свойства этого антибиотика изучены очень подробно. Поэтому на примере стрептомицина целесообразно более полно рассмотреть основные факторы, влияющие на его биосинтез культурой *S. griseus*, методы выделения и свойства аминокгликозидов.

Условия образования и биосинтеза стрептомицина

З. Ваксман с сотрудниками в 1946 г. сообщил, что стрептомицин синтезируется при развитии *S. griseus* лишь в средах, содержащих в своем составе мясной экстракт, и рекомендовал для образования антибиотика следующую среду:

Компоненты	Количество в 1 л водопроводной воды, г
Глюкоза	10
Пептон	5
Мясной экстракт	5
Хлорид натрия	5

pH такой среды устанавливается в пределах 6,5–7,0.

Мясной экстракт З. Ваксман рассматривал не только как источник азота, но как продукт, содержащий какое-то «пробиотическое» вещество, без которого якобы антибиотик не вырабатывается.

Однако уже в том же 1946 г. было показано, что мясной экстракт можно с успехом заменить дрожжевым, а позднее появились работы, показавшие, что образование стрептомицина происходит в средах, где мясной экстракт заменен соевой мукой, или кукуруз-

ным экстрактом, или гидролизатами, полученными из этих веществ. Более того, было установлено, что синтез антибиотика может происходить и на простых по составу синтетических средах.

Таким образом, предположение З. Ваксмана и его коллег о возможности образования стрептомицина только в присутствии некоего «пробиотического» вещества, содержащегося в мясном экстракте, не подтвердилось.

Эти примеры показывают, что в самом начале изучения условий выработки стрептомицина исследователи столкнулись с влиянием на процесс биосинтеза антибиотика различных компонентов сред, и в первую очередь источников азота, углерода, а также концентрации фосфора.

Источники азота. Для развития стрептомицета и биосинтеза стрептомицина в синтетических средах наиболее благоприятны аммонийные соли. Нитраты в качестве единственных источников азота продуцентом стрептомицина не используются, но при добавлении к среде дрожжевого экстракта стрептомицет начинает их потреблять. По-видимому, невозможность использования стрептомицетом нитратов связана с отсутствием у него доноров водорода, что восполняется добавлением к среде дрожжевого автолизата.

Вместе с тем присутствие нитрата натрия в среде, содержащей кукурузный экстракт, приводит к изменению всего процесса обмена веществ стрептомицета. Так, концентрация KNO_3 , равная 0,25%, препятствует вовлечению в обмен веществ стрептомицета молочной кислоты, находящейся в кукурузном экстракте; при 0,5% KNO_3 кислота потребляется, а при 1% — она не только используется организмом, но и образуется им вновь.

Источники углерода. Наилучшим источником углерода для развития *S. griseus* и образования антибиотика, по данным большинства авторов, считается глюкоза. Стрептомицет хорошо растет в средах с глюкозой, фруктозой, галактозой, ксилозой, мальтозой, лактозой или крахмалом, но не растет в средах с арабинозой, рамнозой, сахарозой, рафинозой, сорбитом, дульцитом. Продуцент стрептомицина не может гидролизовать сахарозу и рафинозу.

Способность использовать тот или иной источник углерода и продуцировать антибиотическое вещество зависит от штамма стрептомицета.

Почти все штаммы, образующие стрептомицин, могут использовать животные жиры, растительные масла или жирные кислоты (олеиновая, пальмитиновая) в средах, не содержащих глюкозу. Масла способствуют увеличению биомассы стрептомицета, ускоряют потребление источников азота и вместе с тем замедляют использование глюкозы. Влияние масел зависит прежде всего от вида масла, состава среды и штамма стрептомицета. Путь

использования масла стрептомицетом, по-видимому, тот же, что и для других организмов: гидролиз до глицерина и жирных кислот с последующим β -окислением их.

Спирты, за исключением маннита и глицерина, непригодны для роста стрептомицета и синтеза антибиотика.

Из органических кислот молочная, пировиноградная и лимонная в синтетических средах стимулируют образование стрептомицина. Использование смеси яблочной и янтарной кислот в среде, содержащей основные аминокислоты, способствует значительному увеличению продуцирования антибиотика. Вместе с тем винная кислота, не повышая выхода стрептомицина, положительно влияет на рост стрептомицета.

Источники минерального питания и их роль в процессе биосинтеза стрептомицина. Жизнедеятельность продуцента стрептомицина и его биосинтетическая активность обеспечиваются наличием в среде таких компонентов, как фосфор, железо, кальций и другие минеральные вещества.

Фосфор. Фосфор имеет важное значение в развитии *S. griseus* и образовании антибиотика.

Увеличение концентрации фосфора в среде до определенного предела усиливает выработку стрептомицина, дальнейшее же повышение содержания фосфора, не оказывая заметного влияния на рост мицелия, снижает образование антибиотика. Избыток фосфора в среде влияет на биохимический состав цитоплазмы, изменяет цикл развития стрептомицета и нарушает некоторые физиологические функции клеток.

Значительное увеличение содержания неорганического источника фосфора ускоряет потребление углеводов и подавляет развитие стрептомицета, а следовательно, и выработку стрептомицина.

При избытке фосфора в среде, содержащей глюкозу, увеличивается накопление пировиноградной кислоты, но такой закономерности не наблюдается в случае использования крахмала. Зависимость образования стрептомицина от концентрации фосфора в среде может быть проиллюстрирована данными образования антибиотика при определенных концентрациях фосфорнокислого аммония в среде с пролином:

Концентрация (NH ₄) ₂ HPO ₄ , мг/мл	Стрептомицин, мкг/мл, на 8-е сутки	Концентрация (NH ₄) ₂ HPO ₄ , мг/мл	Стрептомицин, мкг/мл, на 8-е сутки
2,000	170	0,020	300
0,600	570	0,006	200
0,200	675	0,002	130
0,060	530	0,000	25

При недостатке в среде фосфора жизнедеятельность актиномицета значительно изменяется, что связано с нарушением усвоения углеводов, азота и с потребностями в кислороде. Все это ограничивает рост мицелия продуцента (он становится физиологически неполноценным), содержание фосфора в нем уменьшается и способность к биосинтезу антибиотика снижается. Таким образом, свойство мицелия образовывать антибиотик тесно связано с количеством фосфора в нем. При развитии стрептомицета в среде, содержащей глюкозу, мясной экстракт и пептон, происходит быстрое потребление неорганического фосфора: количество его за период развития культуры снижается со 118 до 1 мкг/мл.

Потребление фосфора стрептомицетом в большей мере зависит от исходной концентрации этого элемента в субстрате. Так, на среде с исходным количеством фосфора, равным 29 мкг/мл, к 48-му часу потребляется 21 мкг/мл, а при исходной концентрации, равной 128 мкг/мл, количество потребленного фосфора возрастает до 118 мкг/мл за тот же период. Эти данные указывают на то, что в зависимости от начальной концентрации фосфора в среде существенно меняется качество выросшего мицелия стрептомицета, а следовательно, и условия образования стрептомицина.

Изменения в углеводном и фосфорном питании, в свою очередь, вызывают изменения в нуклеиновом обмене культуры и в общем процессе развития продуцента стрептомицина.

Оптимальное содержание фосфора, равное 0,04–0,07 мг/мл, способствует хорошему росту и развитию стрептомицета и высокому уровню биосинтеза стрептомицина. Однако наиболее благоприятная для роста продуцента и образования стрептомицина концентрация фосфора в среде зависит от штамма стрептомицета, состава среды и способа ее приготовления.

Железо, цинк, медь, магний. Важное значение в процессе развития *S. griseus* и образования антибиотика имеют такие элементы, как железо, цинк, медь, магний и др.

Максимальный выход стрептомицина наблюдается при условии содержания $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в среде в количестве 0,0007–0,005%. Увеличение концентрации сернокислого железа до 0,05% приводит к подавлению биосинтеза антибиотика, снижению скорости потребления углеводов и к задержке развития стрептомицета. Добавление соответствующего количества фосфора к среде с избытком железа снимает неблагоприятное действие ионов железа на биосинтез стрептомицина. Вероятно, отрицательный эффект от избытка железа в среде определяется тем, что он связывает ионы фосфора.

Ионы магния играют важную роль в азотном обмене актиномицета, а также в реакциях фосфорилирования.

Что касается меди, то роль этого элемента в жизнедеятельности продуцента стрептомицина и образовании антибиотика не вполне ясна. Однако известно, что увеличение концентрации меди до 50 мг% существенно не влияет на образование стрептомицина, но угнетает рост стрептомицета.

Увеличение концентрации цинка и железа до 50 мг% сильно угнетает образование стрептомицина (до 50% по сравнению с контролем).

Хлорид натрия. В состав всех сред, используемых для образования стрептомицина, входит хлорид натрия NaCl. Было замечено, что без поваренной соли антибиотическая активность культуральной жидкости ниже активности этой жидкости, содержащей NaCl.

В присутствии хлорида натрия увеличивается проницаемость клеточной стенки и стрептомицин легче переходит в окружающую среду. Образующийся стрептомицин не полностью выделяется в среду: определенная часть его прочно связана с клеточными стенками мицелия стрептомицета и может быть извлечена при обработке мицелия кислотой, щелочью или солью. Для выяснения роли поваренной соли в процессе биосинтеза стрептомицина были проведены опыты по выращиванию *S. griseus* на средах с хлоридом натрия и без него, которые показали, что содержание антибиотика действительно несколько выше в среде с NaCl. Однако при кислотной обработке мицелия в целях извлечения связанного стрептомицина оказалось, что общий выход антибиотика выше на среде, не содержащей NaCl.

Следовательно, наличие хлорида натрия в среде не способствует биосинтезу стрептомицина, а лишь облегчает выделение образовавшегося антибиотика из мицелия в среду.

Аналогичную роль хлорид натрия играет в выделении из клеток микромонопора антибиотика сизомицина (см. с. 260).

Кальций. Как элемент минерального питания кальций сам по себе не оказывает существенного влияния на биосинтез стрептомицина, однако в зависимости от состава среды он может играть положительную или отрицательную роль. Так, при стерилизации сред, содержащих фосфаты, в присутствии ионов кальция обычно ионы фосфорной кислоты связываются с кальцием в виде нерастворимых соединений. Если в среде фосфор находится в ограниченном количестве, это снижает биосинтез стрептомицина, но при использовании сред с избыточным содержанием фосфатов внесение кальциевых солей перед стерилизацией может

перевести часть фосфора в нерастворимые кальциевые соединения, т.е. создадутся условия, благоприятные для биосинтеза антибиотика.

Кроме того, ионы кальция и магния регулируют значение рН среды при подкислении ее за счет остатков серной, фосфорной или других минеральных кислот при использовании аммонийных солей, например $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$.

Ионы Ca^{2+} активируют такие ферменты, как липазы, аденозинтрифосфатазы и некоторые другие. Они могут также ингибировать функции ферментов, активируемые магнием.

* * *

С учетом роли отдельных компонентов субстрата в образовании антибиотика был предложен ряд химически известных синтетических сред. Эти среды успешно используются для экспериментальных исследований продуцента стрептомицина, но пока еще не пригодны для промышленного получения антибиотика. Невозможность использования синтетических сред в промышленных условиях в основном связана с тем, что они, как правило, дороже натуральных и при развитии на них стрептомицета выход стрептомицина ниже.

Для промышленного получения антибиотика среда должна быть дешевой и вместе с тем обеспечивать высокий уровень биосинтеза препарата и относительно легкое его выделение. С этой целью эмпирически были предложены среды, в состав которых входят такие вещества, как соевая мука, кукурузный экстракт, сухая барда с нитратом натрия или другим неорганическим источником азота, жмыхи, земляные орехи, отходы пенициллинового производства и другие компоненты. Выбор основного компонента среды зависит от района, где производится антибиотик, и от сырья, которое может быть в данном случае наиболее подходящим для этих целей. Однако в большинстве случаев производство стрептомицина осуществляется в средах с соевой мукой примерно следующего состава (%): глюкоза — 2,0; соевая мука — 2,0; сульфат аммония — 0,3; фосфат калия однозамещенный — 0,05; хлорид натрия — 0,25; карбонат кальция — 0,3.

Изучение влияния отдельных фракций соевой муки на рост *S. griseus* и образование антибиотика показали, что существенную роль при этом играют жиры и зольная часть соевой муки. Белок сои и его кислотный гидролизат мало пригодны для биосинтеза стрептомицина (табл. 45, 46).

Таблица 45

Таблица 46

Влияние белка, золы и жиров соевой муки на биосинтез стрептомицина культурой *S. griseus* (штамм JIC-1)
(по Егорову, Удаловой, 1962)

Вариант опыта	Максимальное количество стрептомицина	
	мкг/мл	%
Натуральная соевая мука	1770	100
Обезжиренная соевая мука	552	31
Белок соевой муки	109	6
Белок + зола соевой муки	540	30
Белок + зола + жир	781	44

Влияние гидролизата белка сои в сочетании с золой и жирами соевой муки на образование стрептомицина
(по Егорову, Удаловой, 1962)

Вариант опыта	Максимальное количество стрептомицина	
	мкг/мл	%
Соевая мука (контроль)	1400	100
Гидролизат белка сои	166	11
Гидролизат белка + зола	513	35
Гидролизат белка + зола + жир	938	65

Температура. В развитии стрептомицета и биосинтезе стрептомицина большое значение имеет температура культивирования организма. Повышение температуры выше 30 °С практически прекращает образование антибиотика. Границы оптимума температуры для синтеза антибиотика определяются 27–29 °С.

Приведем данные о влиянии температуры культивирования на образование стрептомицина и время его максимального выхода:

Температура, °С	Максимальный выход стрептомицина, мкг/мл	Время максимального образования антибиотика, ч
25	1180	118
27	2041	118
29	2194	104
31	414	72

Оптимальную температуру для биосинтеза стрептомицина меняют в зависимости от штамма стрептомицета и состава среды.

рН среды. Лучшим начальным рН среды для развития стрептомицета является рН 7,0. Стрептомицин образуется при значении рН, находящемся между 7,5 и 8,5.

Аэрация. *S. griseus* — организм высокоаэробный, он поглощает значительное количество кислорода, которое зависит от состава среды и стадии его развития.

В ранний период развития стрептомицета потребление кислорода воздуха происходит интенсивно, а затем падает почти до нуля (рис. 28). Увеличение степени аэрации повышает выход стрептомицина.

Метаболизм у молодого и старого мицелия стрептомицета различен.

Молодой мицелий *S. griseus* содержит, как правило, в 2–3 раза больше нуклеиновых кислот, чем более старый мицелий.

При увеличении аэрации культуры повышается значение рН среды, т.е. быстрее разрушаются протеины.

Количество кислорода, потребленного в течение опыта, в несколько раз меньше величины, необходимой для полного окисления сахара,

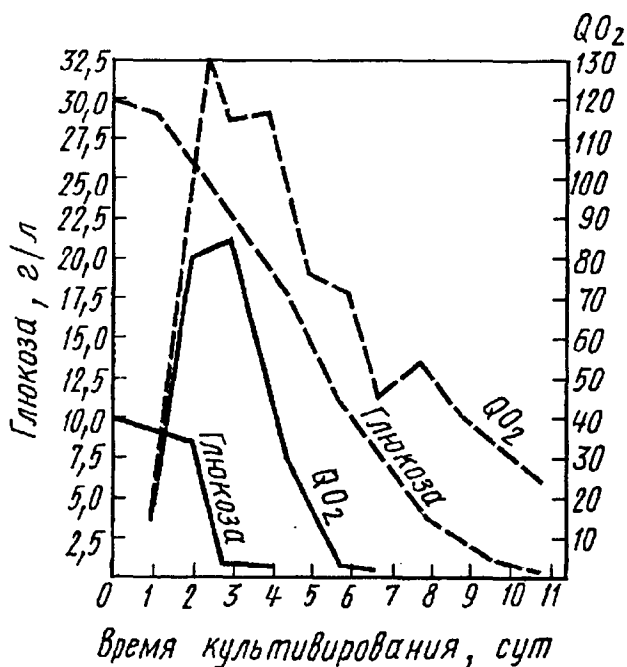


Рис. 28. Потребление кислорода (Q) культурой *Streptomyces griseus* в ходе ее развития в зависимости от концентрации глюкозы в среде (по Gottlieb, Anderson, 1948)

использованного за это время (табл. 47). По-видимому, только часть углеводов окисляется до конечных продуктов, а основная масса остается в организме в виде запасных питательных веществ или используется на построение различных клеточных структур организма.

Таблица 47

Степень окисления различных углеводов *Streptomyces griseus* (штамм ЛС-1) (по Горской, 1961)

Субстрат (0,2%)	Потребление в течение опыта		Количество O_2 , необходимое для полного окисления использованного углевода, $мм^3$	Полное окисление углеводов, %
	O_2 , $мм^3$	углеводов, мг		
Глюкоза	272	2,0	1500	18
Крахмал	264	2,3	1723	15
Лактоза	65	0,6	450	14

Итак, стрептомицин образуется в условиях определенной аэрации культуры стрептомицета.

Биосинтез антибиотиков, образуемых стрептомицетами, контролируется плазмидами (плазмидная ДНК), широко распространенными у этой группы микроорганизмов. В процессе биосинтеза стрептомицина культурами *S. griseus* и других стрептомицетов участвует примерно 20–30 генов.

Физиолого-биохимические особенности развития

Streptomyces griseus

Характеризуя общие закономерности в развитии *S. griseus* и биохимические процессы, происходящие при этом, можно отметить две реальные фазы развития стрептомицета. И. Дулани и Д. Перлман (1947) дают следующую схему двухфазного развития стрептомицета:

	Первая фаза	Вторая фаза
Мицелий	Быстрый рост	Постепенный автолиз
Глюкоза	Быстрое потребление	Использование оставшихся небольших количеств
pH	Постепенное повышение	Повышение до максимума
Стрептомицин	Медленное образование	Максимальная скорость образования
Растворимый углерод	Постепенное использование	Прекращение использования
Молочная кислота	Медленное образование и использование	Медленное использование
Кислород	Максимальное потребление	Понижение потребления до минимума
Растворимый азот	Интенсивное потребление	Увеличение концентрации
Неорганический фосфор	Максимальное потребление	Выделение в среду

Обобщая имеющиеся экспериментальные данные, можно дать следующую характеристику фаз развития продуцента антибиотика.

Первая фаза. Для фазы характерны быстрый рост и развитие стрептомицета с энергичным использованием основных компонентов субстрата и максимальным потреблением кислорода. Масса мицелия достигает максимума, цитоплазма клеток базофильная, с высоким содержанием РНК, ДНК на ранних стадиях развития отсутствует и обнаруживается только через 12 ч развития.

pH среды вначале несколько снижается, затем постепенно повышается. Образование стрептомицина незначительное.

Вторая фаза. Для этой фазы характерно медленное потребление оставшихся в среде питательных веществ. Рост стрептомицета замедляется, резко снижается потребление кислорода. Содержание РНК в мицелии падает, базофилия ядерного вещества повышается, содержание ДНК в нем увеличивается.

Основная масса мицелия подвергается автолизу, что приводит к увеличению содержания в среде аммиачного азота и неорганического фосфора. Во второй фазе максимальное образование

стрептомицина обычно достигается при максимуме биомассы. Иными словами, максимальное накопление антибиотика в культуральной жидкости происходит в период, когда в культуре автолитические процессы начинают преобладать над процессами роста (см. рис. 1).

Однако неверно считать, что выделение стрептомицина в окружающую среду связано с тем, что он освобождается из клеток мицелия в результате их автолиза. Если бы это было так, то следовало бы ожидать, что в процессе развития стрептомицета в его мицелии накапливается стрептомицин. Но прямые опыты показали, что количество антибиотика, связанное с клетками мицелия, в ходе развития организма мало меняется. Содержание стрептомицина в мицелии зависит от состояния мицелия.

Таким образом, можно считать вполне доказанным, что биосинтез стрептомицина осуществляется развивающимся мицелием во вторую фазу роста стрептомицета (в специфических условиях среды, характеризующейся, с одной стороны, истощением основных питательных компонентов, а с другой — обогащением субстрата продуктами жизнедеятельности стрептомицета и продуктами автолиза его клеток). Определение веществ, содержащихся в культуральной жидкости продуцента стрептомицина *S. griseus* в конце процесса биосинтеза антибиотика, показало, что в культуральной жидкости находятся минеральные (зольные) элементы, белки, нуклеиновые кислоты, жиры, стрептомицин, аминокислоты, полисахариды и другие вещества.

Ферментативная деятельность продуцента стрептомицина

Способность продуцента стрептомицина использовать сложные белковые и крахмалсодержащие соединения связана с его возможностью превращать эти соединения в более простые азот- и углеродсодержащие вещества с помощью мощного ферментного аппарата.

Изучение ферментативной системы *S. griseus* показало, что она включает фермент амилазу, образующийся как на среде с глюкозой, так и на среде с крахмалом. Однако на среде, содержащей крахмал, активность амилазы несколько выше, чем на среде с глюкозой.

Использование сложных белковых соединений, находящихся в растительных и животных продуктах (соевая мука, жмых, казеин и др.), обусловлено деятельностью активных протеолитических ферментов, которые образуются стрептомицетом в значительных количествах одновременно с биосинтезом стрептомицина.

Наряду с выработкой протеолитических (казеинолитических) ферментов *S. griseus* синтезирует фибринолитические вещества — специфические протеиназы, способные лизировать тромбы крови.

Образование протеолитических ферментов зависит от скорости роста стрептомицета, состава применяемой среды и от штамма продуцента стрептомицина. Так, в среде с крахмалом протеиназ вырабатывается больше, чем в среде с глюкозой. При наличии в среде 4%-й глюкозы протеолитическая активность культуральной жидкости стрептомицета в течение всего процесса развития остается на более высоком уровне, чем в среде с 1%-й глюкозой.

При глубинном выращивании *S. griseus* выделяет значительно больше протеиназ в среде с низким содержанием азота. Это, по всей вероятности, связано со специфической реакцией стрептомицета на понижение содержания усвояемых форм азота в среде. Кроме того, выделение протеиназ зависит от источника азота. В присутствии в среде белка образование протеиназ наиболее низкое, в среде с пептидами — высокое, в средах, содержащих аминокислоты, — еще выше.

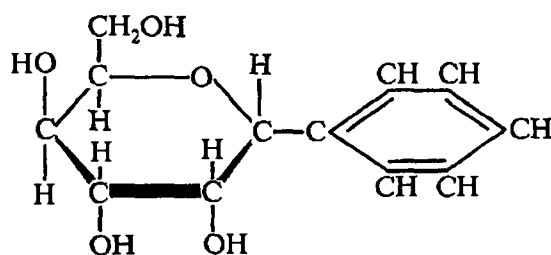
В процессе развития организма основная масса этих ферментов выделяется в окружающую среду.

Оптимальное значение pH среды для проявления активности протеолитических ферментов 8–8,2. Кислая реакция (pH 4,5–5,5), а также сильнощелочная (pH около 9) подавляют активность ферментов.

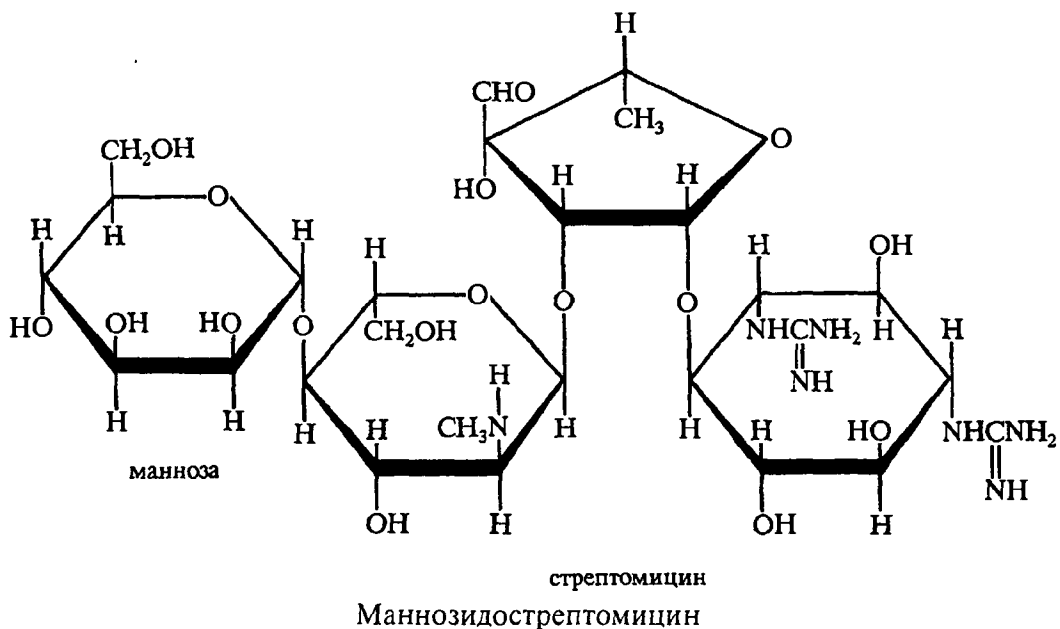
Катионы калия стимулируют рост актиномицета и образование протеиназ. Выделенные из культуральной жидкости *S. griseus* протеолитические ферменты содержат трипсин и пепсин. Из продуцента стрептомицина удалось получить протеиназу, способную гидролизовать почти все пептидные связи белков вплоть до свободных аминокислот. Необходимо отметить, что прямой зависимости между образованием стрептомицина и накоплением стрептомицетом гидролитических ферментов — протеиназ и амилаз — нет.

При выращивании стрептомицета на средах, содержащих мочевины, или на соевых средах без мочевины удается обнаружить фермент уреазу.

Культура *S. griseus* кроме указанных ферментов образует фенилманнозидазу, гидролизующую α -D-фенилманнозу:



Фенилманнозидаза в основном выделяется в среду, окружающую стрептомицет, но в небольших количествах может содержаться и в мицелии микроорганизма. Она способна также гидролизовать в культуре стрептомицета маннозидострептомицин с отделением от него маннозы:



Оптимальная кислотность (рН), необходимая для активности фермента фенилманнозидазы, 8,0 (рис. 29), температурный оптимум около 40 °С; при 50 °С фермент почти полностью инактив-

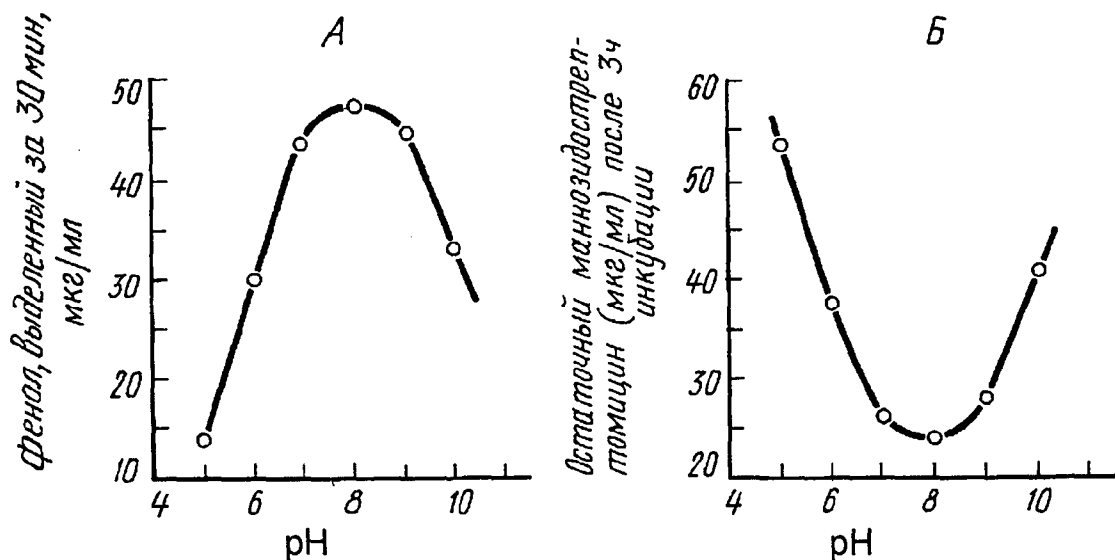


Рис. 29. Действие рН на гидролиз фенилманнозы (А) и маннозидострептомицина (Б) под действием фенилманнозидазы (по Hockenhull et al., 1954)

вируется (рис. 30). Фермент чувствителен к условиям аэрации: ухудшение аэрации культуры заметно снижает его активность.

Способность фенилманнозидазы осуществлять гидролиз маннозидострептомицина существенно влияет на выход стрептомицина в процессе развития стрептомицета.

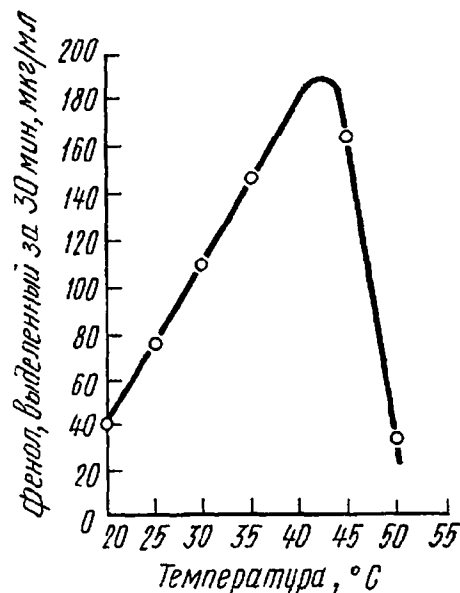


Рис. 30. Влияние температуры на активность фенилманнозидазы (по Hockenhull et. al., 1954)

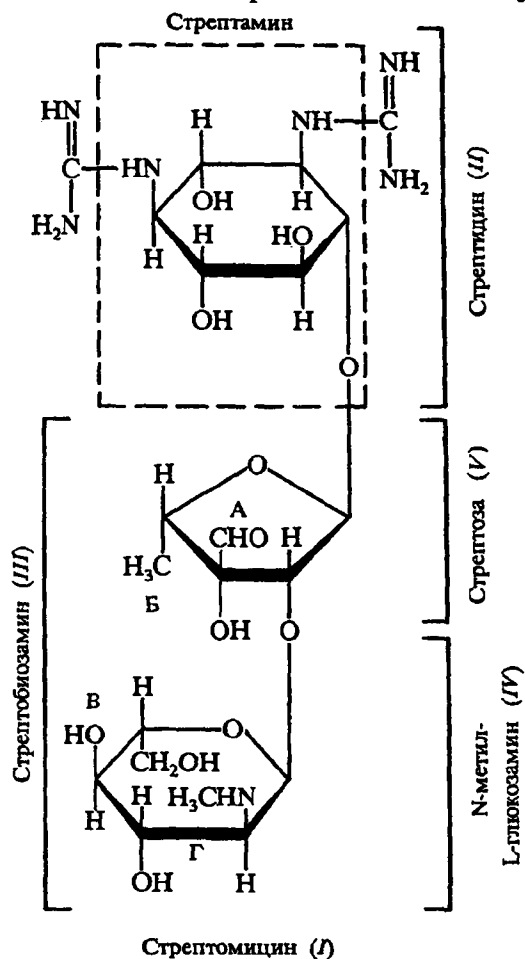
Процесс превращения маннозидострептомицина в стрептомицин может осуществляться в аэробных и в анаэробных условиях. Но так как анаэробизм снижает активность фермента, то, по-видимому, и процесс превращения маннозидной формы стрептомицина в стрептомицин будет затруднен. При биосинтезе антибиотика маннозидострептомицин не является предшественником стрептомицина.

У *S. griseus* открыт фермент трансамидиназа, который может переносить группы мочевины от аргинина или канаванина к орнитину или гидроксиламину. Специфическая активность трансамидиназы, выделенной из мицелия стрептомицета, прямо пропорциональна скорости образования стрептомицина микроорганизмом.

В 1956 г. была описана система дегуанидаз у продуцента стрептомицина, проявляющая активность при рН 7,5. Эта ферментная система способна отщеплять гуанидиновые группировки от L-аргинина, гуанидоуксусной, гуанидопропионовой и гуанидомасляной кислот, а также от стрептидина и стрептомицина. По-видимому, эта система принимает участие в разрушении стрептомицина, которое иногда происходит в конце развития продуцента антибиотика.

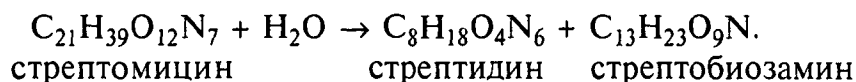
Изучение путей биосинтеза стрептомицина

Формула стрептомицина выражается следующей структурой:



- А: CHO → CH₂OH в дигидрострептомицине
 Б: CH₃ → CH₂OH в гидроксистрептомицине
 В: Н → манноза в маннозидострептомицине
 Г: CH₃ → Н в N-деметилстрептомицине

При гидролизе стрептомицина разбавленными кислотами он распадается на стрептидин и стрептобиозамин:

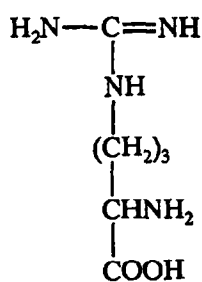


Стрептидин (II) — 1,3-дигуанидино-2,4,5,6-тетраоксициклогексан — сильное основание, не обладающее антибиотической активностью. Стрептобиозамин (III) — своеобразный дисахарид, в его составе имеется азотсодержащая часть — N-метил-L-глюкозамин (IV) и часть, не содержащая азота, — стрептоза (V).

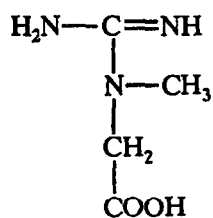
Установлена пространственная конфигурация молекулы стрептомицина (I), остаток стрептобиозамина присоединен к 4-му углеродному атому стрептидина гликозидной связью.

Рассматривая химическую структуру стрептомицина, нетрудно заметить, что стрептидиновая часть сильно насыщена азотом, в ней отношение азота к углероду в 2,5 раза выше, чем в белках (в белках это отношение равно примерно 0,30, в стрептидине — 0,75, во всей молекуле стрептомицина — 0,33). Эти данные позволяют рассматривать стрептидин как своеобразный коллектор избыточного азота, накапливаемого в процессе жизнедеятельности стрептомицета.

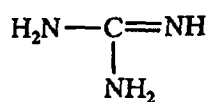
Исходя из этой гипотезы нами еще в 1949 г. было сделано предположение, что потребление в процессе жизнедеятельности стрептомицета веществ, перегруженных азотом по сравнению с белками и содержащих азот в виде гуанидиновых группировок, должно повышать выход стрептомицина. В качестве таких веществ были взяты соединения, включающие гуанидиновую группировку: аргинин (VI), N : C = 0,66, креатин (VII), N : C = 0,75, гуанидин (VIII), N : C = 3, а также мочевины (IX), N : C = 2. Кроме того, был использован инозит (X) — соединение, входящее в молекулу стрептидина и являющееся циклогекситоловым кольцом его:



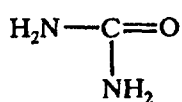
Аргинин (VI)



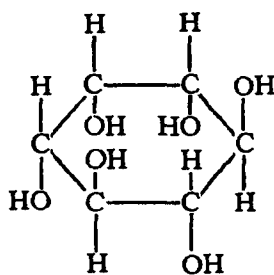
Креатин (VII)



Гуанидин (VIII)



Мочевина (IX)



Инозит (X)

Результаты опытов, проведенных на синтетической среде с малоактивным штаммом *S. griseus* ВНИИП-10, показали, что при добавлении к среде 0,05% L-аргининмоногидрохлорида биосинтез стрептомицина возрастает более чем в 2,3 раза. Но если аргинин добавлять одновременно с инозитом, то биосинтез антибиотика увеличивается почти в 3 раза. Усиление образования стрептомицина происходит и в том случае, если в среду добавить креатин, гуанидин или мочевины, равноценные аргинину по количеству азота. Во всех случаях лучший стимулирующий эффект наблюдался при добавлении к среде названных веществ вместе с инозитом.

Таким образом, добавляя к среде для культивирования *S. griseus* обычные (немеченые) гуанидинсодержащие соединения (аргинин, гуанидин), мочевины и инозит, удалось показать, что они значительно повышают выход стрептомицина.

Последующими исследованиями с применением в опытах меченых соединений были расшифрованы основные пути биогенеза молекулы стрептомицина. Прежде всего было показано, что все углеродные атомы молекулы антибиотика за исключением атомов углерода гуанидиновых групп образуются за счет глюкозы. При культивировании *S. griseus* на среде с соевой мукой и меченой глюкозой было установлено, что радиоактивная (^{14}C) глюкоза включается в молекулу стрептомицина. Разложение полученного таким образом стрептомицина на составляющие его группировки показало, что радиоактивность наблюдается в стрептаmine, стрептозе и в N-метил-L-глюкозамине (табл. 48).

Глютамин и D-глюкозамин — источники аминокрупп стрептамина. D-стрептоза образуется из D-глюкозы в результате ряда

Таблица 48

Распределение меченой ^{14}C глюкозы в стрептомицине
(по Hunter, Hockenhull, 1955)

Вещество	Специфическая активность	
	мкг/мл	мкг/г углерода
Глюкоза	9,10	126
Стрептомицин	29,00	116
Стрептидин	9,90	104
Стрептамин	8,80	123
CaCO ₃ (из гаунидиновых групп)	0,55	45
N-метил-L-глюкозамин	10,10	122
Стрептоза	9,20	128

Примечание. Меченая глюкоза добавлена к среде с соевой мукой и глюкозой через 60 ч после посева актиномицета.

ее превращений. N-метил-L-глюкозамин в молекуле стрептомицина образуется также из D-глюкозы.

При применении D-1-¹⁴C-глюкозы основная часть меченой глюкозы включалась в углеродную цепь аминсахара по первому углероду. При использовании D-6-¹⁴C-глюкозы накопление метки наблюдалось в 6-м углеродном атоме аминсахара. Таким образом, можно предполагать, что возможный механизм превращения асимметричных углеродов D-глюкозы — один из многочисленных способов эпимеризации. Применение меченого метионина (¹⁴CH₃-L-метионин) показало, что N-метил группы глюкозамина синтезируется из L-метионина.

Углерод гуанидиновых групп стрептомицина образуется из углерода CO₂. При использовании радиоактивного CO₂ было выяснено, что почти весь углерод CO₂ включается в гуанидиновые боковые цепочки:

Вещество	Специфическая активность, мкг/мл
Стрептомицина сульфат	2,91
Стрептамина сульфат	3,06
Стрептоза + N-метил-L-глюкозамин	0
Стрептидина сульфат	0,028
CaCO ₃ из гуанидиновых боковых цепей	1,56

При этом было установлено, что более интенсивное включение радиоактивного углерода CO₂ происходит в том случае, если CO₂ добавляется через 2 или 3 сут после посева стрептомицета.

При добавлении к среде хлоргидрата L-аргинина (по 200 мг на колбу) заметно снижается включение ¹⁴C в молекулу стрептомицина, хотя выход стрептомицина значительно не увеличивается. Последнее подтверждает наши выводы о том, что присутствие аргинина в богатых по составу средах может не так заметно стимулировать биосинтез антибиотика.

По-видимому, аргинин играет роль донора гуанидиновых групп или групп мочевины при биосинтезе стрептомицина. Возможно, что L-аргинин — промежуточное соединение при биосинтезе гуанидиновой части молекулы стрептомицина, что вполне согласуется с нашими представлениями.

В опытах с отмытым мицелием стрептомицета показано, что вещества, содержащие гуанидиновые группировки (L-аргинин, креатин, креатинин, гуанидин) или легко превращающиеся в такие соединения (цитруллин, орнитин), переводятся клетками *S. griseus* в соединение, имеющее по крайней мере одну гуанидиновую группировку. Это соединение затем используется продуцентом в процессе биосинтеза стрептомицина.

Гуанидиновые группы L-аргинина, меченные по углероду, принимают непосредственное участие в биосинтезе молекулы стрептомицина. Вся радиоактивность стрептидина локализуется в гуанидиновых группировках (табл. 49).

Таблица 49

Распределение ^{14}C в отдельных частях молекулы стрептомицина, синтезированной *S. griseus* в присутствии L-(^{14}C -гуанидина)-аргинина (no Horner, 1964)

Специфическая активность, с. р. м. $\times 10^{-5}$ мкмоль *					
Стрептомицин	Стрептидин	Гуанидиновые группы	Стрептомицин	Стрептидин	Гуанидиновые группы
2,1	1,9	2,2	1,0	1,0	1,0
1,5	1,3	1,4	0,7	0,0	0,6

* с. р. м. — count per min (число импульсов в 1 мин).

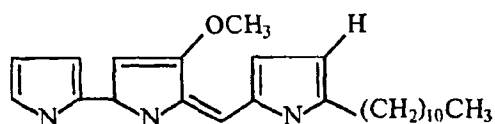
По-видимому, процесс образования гуанидиновых групп стрептомицина сводится к тому, что под действием ферментов трансамидиназ амидиновая группа $-\text{C}-\text{NH}_2$ переносится донором

$$\begin{array}{c} \parallel \\ \text{NH} \end{array}$$

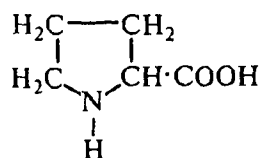
L-аргинина на молекулу акцептора.

По данным ряда авторов, у продуцента стрептомицина обнаружена трансамидиназная активность, непосредственно связанная с биосинтезом антибиотика. Трансамидиназную активность имеют лишь те штаммы стрептомицетов, которые способны синтезировать стрептомицин или гидроксистрептомицин.

Подобная ситуация наблюдается при биосинтезе некоторых пирольных производных антибиотиков, например ундецилпродигиозина, продуцируемого определенными штаммами стрептомицетов и имеющего следующее строение:



Одним из предшественников биосинтеза этого антибиотика является пролин:



У мутанта *S. coelicolor* — одного из продуцентов названного антибиотика с нарушенным процессом катаболизма пролина — происходит существенное снижение образования ундецилпродигиозина. Показано (Dummond et al., 1995), что биосинтез продигозина служит потенциальной «ловушкой» для пролина. Ины-

ми словами, если при развитии продуцента антибиотика не происходит использование в метаболизме пролина и он остается невостребованным и находится в избытке, то указанная аминокислота идет на биосинтез ундецилпродигиозина, повышая его выход. И наоборот, при снижении образования пролина и его интенсивном включении в конструктивные процессы стрептомицета наблюдается снижение биосинтеза антибиотика.

Участие инозита (мезоинозита) в биосинтезе молекулы стрептомицина установлено прямыми опытами; использование в опытах инозита, равномерно меченого ^{14}C , который добавлялся к 96-часовой культуре *S. griseus*, показало, что в стрептомицине, образовавшемся за 24 ч, основное количество ^{14}C концентрируется в циклогекситоловом кольце стрептидина. В гуанидиновых цепочках ^{14}C полностью отсутствовал (табл. 50).

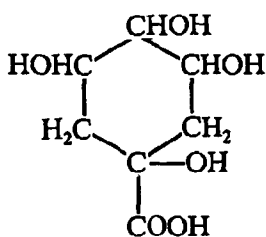
Таблица 50

Распределение ^{14}C мезоинозита в стрептомицине после введения в среду меченого инозита
(no Horner, 1964)

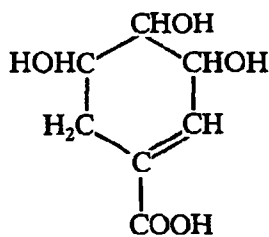
Специфическая активность, с. р. м. $\times 10^{-5}$ мкмоль					
Стрептомицин	Стрептидин	Гуанидиновые группы	Стрептомицин	Стрептидин	Гуанидиновые группы
0,45	0,50	0	1,08	1,15	0
0,55	0,60	0	2,83	2,85	0

Эти выводы подтверждаются данными ряда исследователей, которые также показали, что инозит и особенно инозит в комбинации с аргинином увеличивают выход стрептомицина. Следовательно, можно предполагать, что инозит — предшественник стрептидина.

Установлено, что хинная и шикимовая кислоты:



Хинная кислота



Шикимовая кислота

подобно инозиту также стимулируют биосинтез стрептомицина (табл. 51).

Повышение биосинтеза стрептомицина при добавке аргинина к синтетической среде происходит и у высокопродуктивного штамма стрептомицета ЛС-1. Однако это повышение по сравнению с контролем меньше, чем у слабоактивного продуцента. Стимулирование биосинтеза стрептомицина происходит за счет

Влияние хинной и шикимовой кислот (100 мг%)
на рост *S. griseus* (штамм ЛС-1) и биосинтез стрептомицина
(по Галаниной, 1966)

Добавленное вещество	Биомасса, мг%	Антибиотик, мкг/мл	Продуктивность мицелия, мкг/мг
Хинная кислота	690	2168	313
Шикимовая кислота	724	2010	280
Инозит	692	2144	311

катодной фракции азотсодержащей части кукурузного экстракта, состоящей преимущественно из основных аминокислот: аргинина, гистидина и лизина. Смесь указанных кислот, взятая в тех же соотношениях, что и в кукурузном экстракте, обладает почти таким же действием. Аргинин и гистидин увеличивают выход стрептомицина у стрептомицета (штамм ЛС-1) на 50–100% при развитии его на синтетической среде с сульфатом аммония.

Гидролизат белка мицелия стрептомицета, интенсивно синтезирующего антибиотик, содержит значительно меньше основных аминокислот (особенно аргинина), чем гидролизат белка мицелия с низкой способностью к синтезу антибиотика. Аргинин используется преимущественно на построение молекулы стрептомицина, а не на построение белка мицелия.

Кислотный гидролизат белка сои, являющийся единственным источником азота в среде, способствует образованию определенного, хотя и не очень высокого по сравнению с соевой мукой количества стрептомицина. При удалении из гидролизата гексоновых оснований (аргинина, лизина и гистидина) биосинтез антибиотика при вполне нормальном росте стрептомицета снижается примерно на 50%. Фракции, содержащие основания и пролин, наиболее благоприятны для биосинтеза антибиотика, а фракции моноаминокислот — для роста стрептрмицета.

При использовании высокоактивного штамма продуцента стрептомицина фракция основных аминокислот кислотного гидролизата белка сои более благоприятно влияет на биосинтез стрептомицина, чем фракция моноаминокислот (по Егорову, 1959):

Вариант опыта	Максимальное количество стрептомицина, мкг/мл
Гидролизат белка сои	179
Фракция моноаминокислот	342
Фракция основных аминокислот	754

По влиянию на процесс образования стрептомицина аминокислоты можно разделить на три группы.

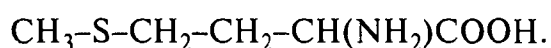
Первая группа. Аминокислоты, не влияющие на рост стрептомицета, но стимулирующие биосинтез антибиотика (аргинин, гистидин, лизин, глицин, α -аланин, валин, фенилаланин, изолейцин).

Вторая группа. Аминокислоты, не влияющие на образование антибиотика (аспарагиновая кислота, серин, треонин, метионин, тирозин, лейцин).

Третья группа. Аминокислоты, подавляющие рост стрептомицета и тормозящие биосинтез стрептомицина (цистин, триптофан).

Энзиматический экстракт, выделенный из разрушенного лизоцимом мицелия *S. griseus*, способен образовывать глюкозамин в опытах *in vitro*. В этом экстракте обнаружена уреазная активность, чем, по-видимому, объясняется стимулирующее влияние мочевины как донора аминогрупп в синтезе глюкозамина.

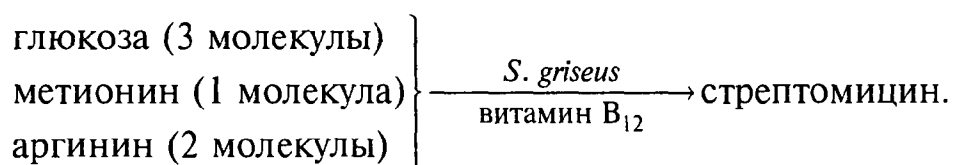
Образование N-метильной группы в глюкозамине связано с процессом метилирования. Известно, что основным донором метильной группы при биосинтезе многих биологически активных веществ является аминокислота метионин:



Вместе с тем данные показывают, что витамин В₁₂ стимулирует процесс биосинтеза ряда веществ, содержащих метильную группу. Витамин В₁₂ в сочетании с метионином способствует повышению выхода стрептомицина культурой *S. griseus* (штамм ЛС-1) до 25% (табл. 52).

Анализируя экспериментальные результаты, можно констатировать, что установлены последовательные этапы образования стрептидина, выяснены основные пути синтеза стрептозы.

Обобщая данные по биосинтезу молекулы стрептомицина культурой *S. griseus*, можно предложить следующую схему:



При изучении путей биосинтеза ряда антибиотических веществ широко применяются мутанты микроорганизмов с измененными свойствами, связанными с блокированием некоторых звеньев в цепи образования молекулы антибиотика. Такой подход к изучению биосинтеза антибиотиков дает возможность вскрывать и познавать системы регуляции биосинтетической активности микроорганизмов.

При изучении биогенеза стрептомицина были использованы различные мутанты *S. griseus*: неактивные (не способные образовывать

Влияние метионина и витамина В₁₂ на рост *S. griseus* (штамм ЛС-1)
и образование стрептомицина

(по Галаниной, 1966)

Среда	Биомасса, мг%	Стрептомицин, мкг/мл	Продуктивность	
			мкг/мг	% к контролю
Синтетическая среда (контроль)	650	2130	328	100
То же + метионин	705	2032	288	88
» + витамин В ₁₂	692	2616	377	115
» + метионин + витамин В ₁₂	720	2960	410	125

антибиотик) и малоактивные варианты высокопродуктивного штамма *S. griseus*.

Совместное культивирование неактивного мутанта 1200 и малоактивного мутанта 1211 способствует восстановлению нарушенной в процессе мутагенеза биосинтетической активности у мутанта 1200 стрептомицета (по Пензиковой и др., 1971):

Вариант опыта	Образование стрептомицета на 6-е сутки развития, мкг/мл
Штамм 1200	0
Штамм 1211	200-600
Штамм 1200 + штамм 1211	2500-6000
Штамм 1211 + фильтрат культуральной жидкости штамма 1200	200-600
Штамм 1200 + фильтрат культуральной жидкости штамма 1211	1500-4000
То же, но фильтрат прокипячен	1500-3700

Фильтраты использовались из суточной культуры и добавлялись к суточной культуре актиномицетов.

Данные показывают, что у неактивного мутанта 1200 биосинтез стрептомицина осуществляется под влиянием какого-то вещества (или веществ), содержащегося в культуральной жидкости малоактивного мутанта 1211; это вещество неферментной природы, т.е. при кипячении оно не инактивируется.

Стимулирующий эффект со стороны штамма 1211 наблюдается в том случае, если 24-48-часовая культуральная жидкость добавляется к односуточному мицелию стрептомицета (штамм 1200).

Используя метод совместного культивирования активных и неактивных мутантов продуцента стрептомицина, А.С. Хохлов с сотрудниками (Л.Н. Анисимовой, П.П. Решетовым, И.И. Товаро-

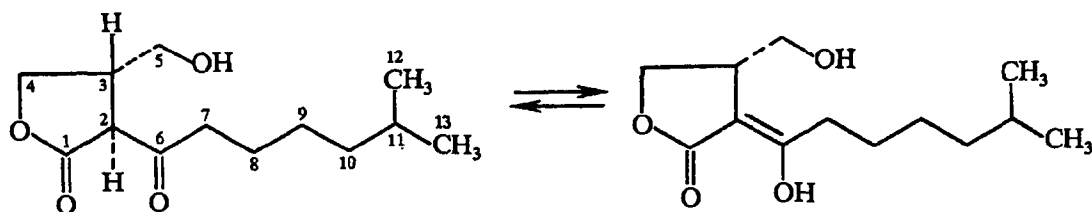
вой и др.) еще в первой половине 60-х гг. XX столетия впервые открыли и подробно изучили так называемый А-фактор, а затем и другие биорегуляторы метаболизма стрептомицетов.

А-фактор специфически стимулирует биосинтез стрептомицина антибиотически неактивным мутантом, принимает участие в образовании стрептидиновой части молекулы стрептомицина и оказывает влияние на процесс спорообразования, восстанавливая споруляющую стрептомицету. Добавление стимулирующего фактора к мутанту, не образующему стрептомицин, способствует началу процесса трансамидинирования

Трансамидиназная активность мицелия предшествует биосинтезу стрептомицина примерно на 10 ч. По-видимому, действие активатора связано с индукцией трансамидиназы.

А-фактор выделен из культуральной жидкости *S. griseus* (штамм 751); ему дана первичная характеристика, определены молекулярная масса (342) и эмпирическая формула ($C_{13}H_{22}O_4$).

В 1976 г. Е.М. Клейнер с сотрудниками установили структурную формулу А-фактора, обеспечивающего нормальное развитие *S. griseus* и биосинтез им стрептомицина, а в 1977 г. осуществили химический синтез рацемического А-фактора и его гомологов. Те же авторы показали, что синтезированный биорегулятор обладает такой же биологической активностью, как и природный фактор. Два гомолога А-фактора имеют следующее строение:



А-фактор представляет собой 2S-изокаприлоил-3S-оксиметил-γ-бутиролактон. Стрептомицет одновременно синтезирует два гомолога. А-фактор у стрептомицетов — это своеобразный ауторегулятор метаболизма, он не только стимулирует биосинтез стрептомицина у недостающих по А-фактору мутантов *S. griseus*, но и принимает участие в выработке стрептомицина активными продуцентами этого антибиотика.

Механизм его действия связан с дерепрессией определенных участков ДНК стрептомицетов, осуществляющих запуск разнообразных процессов, необходимых в конечном счете как для морфогенеза, так и для биосинтеза антибиотика.

Нарушение образования А-фактора влияет на процессы, связанные с биосинтезом молекулы стрептомицина: резко снижается активность амидинотрансферазы — фермента, участвующего в образовании стрептомицина.

В цитоплазме *S. griseus* обнаружен белок, связывающий А-фактор (Katsuhide et al., 1989). У других видов стрептомицетов, не образующих стрептомицин, обнаружить такой белок не удалось.

К настоящему времени у разных родов актиномицетов (*Streptomyces*, *Nocardia* и родственных им актиномицетов) установлено более десяти регуляторов развития — аналогов или гомологов А-фактора. Причем у разных видов актиномицетов гены, ответственные за биосинтез А-фактора, локализованы или на хромосоме (*S. coelicolor*), или на плазмиде (*S. griseus*).

Ауторегуляторы, подобные А-фактору стрептомицетов, обнаружены у представителей других видов микроорганизмов, которые способны регулировать различные процессы.

Получен мутант продуцента стрептомицина, блокированный по биосинтезу стрептидина (такие мутанты называют идиотрофами). Выработка антибиотика этим мутантом происходит лишь в том случае, если к среде добавлен стрептидин. С увеличением концентрации добавленного стрептидина синтез стрептомицина возрастает (по Анисовой, Коваленко, Корницкой и др., 1976):

Количество добавленного стрептидина, мкг/мл	Образование стрептомицина на 5-е сутки, мкг/мл
250	62
500	120
1000	350

Это указывает на то, что стрептидин целиком включается в молекулу стрептомицина, т.е. является ее предшественником.

В культуральной жидкости стрептомицета, развивающегося без А-фактора, синтезируется другое вещество регуляторного характера, способное индуцировать переход развития микроорганизма в стадию активного образования стрептомицина. Получен ряд мутантов *S. griseus* с блоками биосинтеза стрептидина на разных этапах. Выделены мутанты продуцента стрептомицина, блокированные по биосинтезу стрептобиозамина. Добавление стрептобиозамина в среду, где развиваются полученные мутанты, способствовало увеличению выработки стрептомицина в 3–6 раз. Стрептобиозамин используется на относительно поздних стадиях развития стрептомицета. Аналогичные приемы, широко применяемые при изучении процессов биосинтеза антибиотиков, получили название мутосинтеза, или мутационного синтеза (подробнее см. с. 409–410).

Эти результаты показывают, что в процессе образования стрептомицина участвует ряд регуляторных механизмов, выявление которых с помощью мутантных штаммов актиномицета поможет вскрыть истинные пути механизма биосинтеза молекулы стрептомицина.

Промышленное получение стрептомицина

Производство стрептомицина началось в конце 1946 г., и в течение первого года было выпущено около 1000 кг, а уже через два года — около 36 тонн. К настоящему времени производство этого антибиотика составляет не менее 300 т в год.

Увеличение производства антибиотика осуществлялось не только за счет расширения и увеличения числа промышленных предприятий, но и благодаря таким мероприятиям, как: 1) получение наиболее активных штаммов стрептомицета — продуцента стрептомицина; 2) подбор наиболее благоприятных сред и других условий культивирования продуцента, обеспечивающих высокий биосинтез стрептомицина; 3) разработка наиболее рациональных методов выделения и очистки антибиотика.

Получение наиболее активных штаммов стрептомицета — продуцента стрептомицина. Селекция наиболее продуктивных штаммов *S. griseus* — одна из первостепенных задач в деле увеличения выхода стрептомицина. Если раньше только что выделенные штаммы продуцента стрептомицина образовывали не более 50–100 мкг/мл антибиотика, то теперь получены штаммы, которые вырабатывают до 20 000 мкг/мл стрептомицина.

В промышленных условиях используют штаммы *S. griseus*, способные синтезировать до 10–20 тыс. мкг/мл антибиотика. Таким образом, только за счет селекции антибиотическая продуктивность этих штаммов по сравнению с исходными повысилась в 100–200 раз.

Важную роль в селекции продуцентов стрептомицина играют индуцированный мутагенез и ступенчатый отбор. Для получения мутантов широко применяют мутагенные факторы: рентгеновское и ультрафиолетовое излучения.

Обычно для получения мутантов с повышенным образованием стрептомицина используется метод многократного облучения спор стрептомицета ультрафиолетовым светом с доведением общей дозы до 10 000–20 000 эрг/мм² с последующим применением видимого света.

В результате были получены новые штаммы, сохраняющие высокую антибиотическую активность:

Штамм	Средняя активность, мкг/мл
ЛС-1	3000
«Новый 66»	4000
Новый вариант штамма «Новый 66»	4500

Подбор наиболее подходящей среды и установление режима развития стрептомицета. Эти условия играют существенную роль в увеличении выхода стрептомицина. Большинство заводов, производящих стрептомицин, работают на так называемых соевых средах, в состав которых входят соевая мука, гидрол, аммонийные соли и некоторые другие компоненты. На этих средах и при современных условиях развития стрептомицета удается достичь высокого выхода стрептомицина. Важно отметить, что каждому вновь выделенному в результате селекции штамму стрептомицета должны соответствовать определенная среда и свой режим для развития стрептомицета.

Метод выделения и очистки стрептомицина. С помощью этого метода определяют как количество получаемого антибиотика, так и его качество. Чем лучше очищен препарат от балластных веществ, тем выше его миллиграммовая активность и выше лечебные качества.

Благодаря использованию совершенных методов выделения и очистки стрептомицина удается получить препараты, содержащие до 800 мкг/мг и более стрептомицина с выходом антибиотика до 95–97%.

Выделение стрептомицина из культуральной жидкости

Стрептомицин — сильно полярное органическое основание. По структуре стрептомицин (см. с. 230) представляет собой сложную молекулу с большим числом гидрофильных и функциональных групп. Гуанидиновые группы в стрептидиновой части молекулы и метилиминная группа в N-метилглюкозаминной части молекулы антибиотика обуславливают его сильные основные свойства.

Стрептомицин в виде свободного основания или в виде солей неорганических кислот хорошо растворим в воде. Однако соли неорганических кислот стрептомицина нерастворимы почти во всех органических растворителях. Это обстоятельство имеет важное значение при разработке метода выделения антибиотика. Так, попытки экстрагировать стрептомицин из водных растворов при рН от 2 до 9 бутиловым спиртом или другими известными не смешивающимися с водой растворителями не увенчались успехом. Поэтому метод экстракции данного антибиотика не нашел применения.

Основная масса антибиотика выделяется в культуральную жидкость. Однако часть стрептомицина остается в мицелии и на его поверхности. Поэтому культуральную жидкость вместе с биомассой обрабатывают минеральной кислотой, для того чтобы весь антибиотик перевести в раствор. После этого мицелий отделяют

с помощью фильтр-прессов или центрифуг, а свободную от мицелия культуральную жидкость обрабатывают щавелевой кислотой для удаления белков и органических оснований, а также ионов металлов (кальция, железа, магния и др.). Из полученных таким образом растворов выделяют стрептомицин.

Метод адсорбции на активированном угле. Метод основан на том, что при кислой реакции раствора (рН 2–4) стрептомицин не адсорбируется на частицах активированного угля, в то время как ряд примесей при таком значении рН адсорбируется. Стрептомицин садится на уголь при нейтральном или слабощелочном значении рН.

Концентрирование стрептомицина методом адсорбции на угле проводят следующим способом. Культуральную жидкость подкисляют до рН 2–4 и смешивают с активированным углем. Затем уголь отделяют, а обесцвеченную жидкость нейтрализуют щелочью до рН 7–7,5 и снова смешивают с новой порцией активированного угля, который после этого автоматически подается на фильтр-пресс. Остатки неактивной жидкости отделяют, а адсорбированный на угле стрептомицин промывают при нейтральной реакции водой и нейтральным спиртом для удаления растворимых в спирту примесей.

Десорбцию (элюцию) стрептомицина с угля осуществляют с помощью кислого спирта, приготовленного с соляной кислотой. В этих условиях многие примеси остаются адсорбированными на угле. После элюции к раствору добавляют сухой серный эфир — в осадок выпадает солянокислая соль стрептомицина.

Существуют и другие модификации адсорбционного метода выделения стрептомицина.

Метод с применением ионообменных смол. Стрептомицин и другие аминогликозиды выделяют из культуральной жидкости, как правило, сорбционным методом с использованием карбоксильных катионитов. Метод основан на использовании катионообменных смол (катионитов) типа сополимеров акриловой или метакриловой кислот и дивинилбензола. Раствор стрептомицина пропускают через ряд колонн, заполненных катионитом. Стрептомицин садится на смолу. Адсорбированный антибиотик обычно вытесняют водными растворами минеральных кислот. В растворе содержится высококонцентрированный и весьма очищенный препарат стрептомицина.

Дальнейшая очистка препаратов стрептомицина осуществляется разными методами. Один из наиболее эффективных методов очистки антибиотика — хроматографический с использованием оксида алюминия или ионообменных смол. Нередко применяют хлорид кальция с последующей перекристаллизацией.

Метод превращения стрептомицина в хлоркальциевый комплекс позволяет полностью освободиться от примесей маннозидострептомицина; последний как нежелательный компонент обычно появляется (до 5%) при развитии *S. griseus*. Стрептомицин образует комплексную соль с CaCl_2 , а маннозидострептомицин этой соли не образует.

Стабильность стрептомицина

Стабильность стрептомицина зависит от чистоты препарата, влажности, температуры, кислотности растворителя.

Установлено, что химически чистый стрептомицин устойчив как в сухом состоянии, так и в виде растворов. Соли стрептомицина при хранении их при комнатной температуре инактивируются лишь в незначительной степени, и притом на протяжении нескольких лет. Даже при температуре 50 °С соли стрептомицина сохраняются в течение длительного времени. Максимум стабильности растворов гидрохлорида и сульфата стрептомицина находится при значении рН в пределах от 3,0 до 7,0 при температуре от 7 до 25 °С.

Соли стрептомицина, поступающие в продажу, содержат менее 3% влаги и устойчивы при хранении в условиях комнатной температуры в течение длительного времени — до трех лет, считая со дня их выпуска, а растворы сульфата стрептомицина — до 1,5 года.

Зависимость антибиотической активности стрептомицина от рН среды и ее состава

Антибиотическая активность стрептомицина в большой степени зависит от рН среды и ее состава. В кислых средах действие стрептомицина значительно снижается. В щелочных условиях среды проявляется максимальная биологическая активность антибиотика. Так, активность при рН 5,8 примерно в 20–80 раз меньше, чем при рН 8,0.

Данные, представленные в табл. 53, показывают, что для подавления развития определенного количества клеток какого-либо чувствительного к стрептомицину микроба в условиях слабокислой среды необходимо в 4 раза больше, а для *Salmonella typhi* — почти в 70 раз больше антибиотика по сравнению с количеством стрептомицина, действующим при щелочных условиях (рН 8,0).

Для проявления максимальной антимицробной активности стрептомицина оптимальное значение рН 7,5–8,0.

Присутствие некоторых веществ в среде иногда значительно влияет на антибиотическую активность стрептомицина. Так, если к мясопептонному бульону прибавить 0,5–3% хлорида натрия,

Влияние рН среды на антибиотические свойства стрептомицина
(no Abraham, Duthie, 1946)

Микроорганизм	Бактериостатическая концентрация стрептомицина, мкг/мл, при разном значении рН среды		
	6,0	7,4	8,0
<i>Escherichia coli</i>	150	25,0	3
<i>Salmonella typhi</i>	200	12,0	3
<i>Proteus vulgaris</i>	100	25,0	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	25,0	12
<i>Streptococcus pyogenes</i>	5	2,5	1

хлорида калия или сульфата натрия, то *E. coli* даже при наличии в среде 10 мкг/мл стрептомицина будет развиваться, тогда как без добавки этих веществ для подавления роста бактерии достаточно 0,3 мкг/мл антибиотика.

Иными словами, присутствие в среде вышеназванных солей снижает антибактериальную активность стрептомицина в 33 раза.

При наличии в среде поваренной соли уменьшаются скорость и степень диффузии стрептомицина, а также снижается адсорбция антибиотика бактериальной клеткой.

Ряд органических соединений, присутствующих в среде, снижает антибактериальные свойства стрептомицина. К ним относятся нуклеиновые кислоты, пептон, сыворотка крови, аминокислоты, глюкоза, некоторые соли органических и неорганических кислот. Например, добавление к среде солей пировиноградной или фумаровой кислот в концентрации 1% создает условия, при которых *E. coli* развивается в присутствии 10 мкг/мл стрептомицина, а если концентрацию солей повысить до 3%, то рост бактерий наблюдается и при 150 мкг/мл антибиотика. Защитное действие этих и некоторых других кислот специфично. Стрептомицин в этих условиях не разрушается, но возрастает устойчивость бактерий к нему. У *E. coli* такая устойчивость проявляется в большой степени, в то время как у *Staph. aureus* эти кислоты почти не вызывают защитных свойств.

Сильно снижается антибиотическая активность в присутствии цистеина и гидроксиламина. Так, цистеин полностью инактивирует стрептомицин в течение нескольких часов. В анаэробных условиях также наблюдается снижение антибиотических свойств стрептомицина в отношении таких организмов, как *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* и некоторых других. По всей вероятности, ослабление действия стрептомицина в данных условиях в определенной степени связано с образованием кислот и, следовательно, с понижением значения рН среды.

Подавление антибиотического действия стрептомицина *in vitro* происходит также под действием вещества, образуемого в культурах *Pseudomonas aeruginosa*. Это вещество оказалось ингибитором неомицина и дигидрострептомицина. Влияние ингибитора не связано с разрушением молекулы стрептомицина. В опытах на животных ингибитор не проявляет своего действия на активность стрептомицина.

Таким образом, антибиотические свойства стрептомицина в большей степени определяются кислотностью среды и ее составом. Поэтому определение чувствительности микроорганизмов к действию названного антибиотика или его количественное определение биологическими методами необходимо проводить при строго определенных условиях среды, способствующих наивысшему проявлению антибиотических свойств стрептомицина.

Антибиотические свойства стрептомицина

По отношению к стрептомицину все микроорганизмы условно можно разделить на три группы.

1. Весьма чувствительные микроорганизмы, которые подавляются в большинстве случаев при концентрации стрептомицина 10 мкг/мл. Сюда можно отнести организмы родов *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Staphylococcus* и некоторые другие.

2. Умеренно чувствительные микроорганизмы, для подавления которых *in vitro* необходима концентрация стрептомицина в пределах 10–100 мкг/мл. К этой группе относят многие бактерии из родов *Enterobacter*, *Corynebacterium*, *Proteus*, *Streptococcus*, *Vibrio*.

3. Устойчивые формы микробов, для подавления которых необходима концентрация антибиотика, превышающая 100 мкг/мл. К этой группе относятся роды *Bacteroides*, *Clostridium*, некоторые виды *Proteus*, многие виды грибов, дрожжей, вирусы.

Итак, различные организмы неодинаково реагируют на присутствие в среде стрептомицина. Степень антимикробного действия антибиотика неодинакова и в отношении разных видов организмов (табл. 54).

Наряду с тем, что стрептомицин подавляет рост многих видов микроорганизмов, к нему довольно легко появляется устойчивость; возникают формы бактерий, резистентные к стрептомицину. Повышение устойчивости к стрептомицину в 1000 раз возникает у золотистого стафилококка всего лишь через три пассажа на бульоне с возрастающими концентрациями антибиотика, а у *Salmonella typhi* повышение устойчивости в 22 600 раз наблюдалось после 14 пассажей.

Устойчивые к стрептомицину формы бактерий образуются также *in vivo*. Приобретенная устойчивость к антибиотику сохраняется у

Антибиотическая активность стрептомицина *in vitro*

Микроорганизм	Концентрация стрептомицина, мкг/мл, вызывающая подавление		
	наиболее чувствительных штаммов	наиболее устойчивых штаммов	большинства штаммов
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,300	1000	25
<i>Bacillus anthracis</i>	0,250	10	5
<i>B. cereus</i>	0,830	2	1
<i>B. megatherium</i>	0,250	4	2
<i>B. subtilis</i>	0,056	128	25
<i>Candida albicans</i>	—	—	Устойчивы
<i>Clostridium botulinum</i>	—	—	»
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,400	200	20
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,500	50	25
<i>Eschenchia coli</i>	0,015	> 1000	25
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,100	12,5	5
<i>Proteus vulgaris</i>	1,000	> 1000	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,100	1000	50
<i>Salmonella typhi</i>	0,004	20	5
<i>Shigella dysenteriae</i>	2,000	8	5

организмов довольно длительное время. С возникновением устойчивости появляются некоторые изменения в характере обмена веществ. Так, у резистентного к стрептомицину хромогенного микроорганизма резко изменяется окраска. Стрептомициноустойчивая форма синегнойной палочки теряет способность образовывать пигмент, изменяются и некоторые другие особенности обмена. Однако у устойчивых и чувствительных к стрептомицину штаммов бактерий заметных различий в вирулентности не наблюдается.

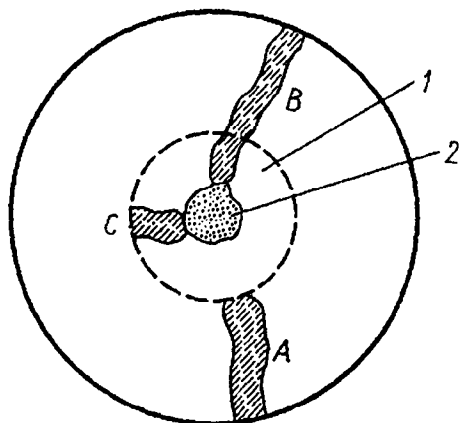
В ряде случаев под действием стрептомицина в опытах *in vitro* возникают не только устойчивые к нему штаммы, но и зависимые от антибиотика формы, способные развиваться только в его присутствии. Описаны случаи, когда штаммы менингококка, *Mycob. ranae* и другие микроорганизмы развиваются лишь на среде, содержащей от 100 до 150 мкг/мл стрептомицина.

Стрептомициноустойчивые и зависимые от стрептомицина штаммы обычно получают из чувствительных форм микроорганизмов. Соотношение между чувствительными, устойчивыми и зависимыми от стрептомицина штаммами показано на рис. 31.

Токсические и лечебные свойства стрептомицина

Токсичность стрептомицина сравнительно невелика. Для человека массой 60 кг токсическая доза этого антибиотика составляет около 6 г. Обычно в клинике больному одновременно вводят

около 1 г препарата. Курсовая доза антибиотика в среднем составляет 50 г, а при лечении больных туберкулезом — 60–90 г. Эти дозы не вызывают побочных реакций. Однако длительное



лечение больных большими дозами стрептомицина вызывает токсическое действие на VIII пару черепно-мозговых нервов, что приводит к расстройству (иногда очень сильному) равновесия.

Рис. 31. Развитие чувствительного к стрептомицину (А), стрептомицинустойчивого (В) и стрептомицинзависимого (С) штаммов:
1 — зона диффузии стрептомицина, 2 — колония *Streptomyces griseus*

Нередко расстройство равновесия сопровождается частичной или полной потерей слуха

Стрептомицин не разрушается в организме, а лишь выводится из него. Этот антибиотик может накапливаться в перилимфе, с чем, по-видимому, и связано нарушение слухового аппарата.

Развитие вестибулярных нарушений и глухоты определяется не только длительностью периода лечения, но и дозой антибиотика, методами его введения, а также степенью очистки препарата.

Токсичность менее очищенных препаратов, применявшихся в первый период получения стрептомицина, была более высокой, что связано с наличием в препаратах гистаминоподобных веществ, которые сами по себе довольно токсичны. Стрептомицин в малых дозах невротического действия не оказывает, поэтому использование антибиотика в небольших дозах в сочетании с другими препаратами, по существу, снимает токсическое действие стрептомицина.

Есть указания, что стрептомицин может оказывать определенное действие на эндокринную систему. Иногда при введении стрептомицина у больных наблюдается анафилактический шок. Хотя эти тяжелые осложнения, имеющие аллергический механизм, встречаются редко, о них необходимо знать.

Различные нарушения, связанные с токсичностью стрептомицина, не могут идти ни в какое сравнение с тем огромным лечебным эффектом, который имеет этот антибиотик. В основном антибиотик применяется для лечения заболеваний, вызываемых грамотрицательными и кислотоустойчивыми формами бактерий, и прежде всего возбудителями разных форм туберкулеза. Туберкулез представляет серьезную проблему даже для развитых стран. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, в мире насчитывается около 7 млн больных с открытой формой туберкулеза, причем 25% из этого числа составляют жители раз-

витых стран, 75% — развивающихся. Ежегодно туберкулезом заболевают около 3,5 млн человек и более полумиллиона погибают от него (Торлина, 1989).

В России заболеваемость туберкулезом с 1992 г. неуклонно растет. Показатель заболеваемости возрос с 30,6 в 1991 г. до 42,7 на 100 000 населения в 1996 г., когда было выявлено более 63 000 больных. Показатель смертности за это время увеличился в 2 раза (Онищенко, 1997).

Что касается бывшего СССР, то некоторые районы также вызывают серьезную тревогу. В самых туберкулезных районах (аулы Прикаспия, Северного Казахстана, Приаралья) наиболее распространенный род занятий — животноводство, и заразиться этой болезнью можно не только от больного человека, но и от животных (коров, свиней, верблюдов и др.).

Антибиотик необходимо вводить больному не менее 3–4 раз в сутки. Стрептомицин совершенно не всасывается из желудочно-кишечного тракта. При приеме его *per os* он не обнаруживается ни в крови, ни в моче больного. Однако в этом случае антибиотик оказывает сильный антибактериальный эффект на микрофлору кишечника.

Для того чтобы стрептомицин попадал в кровь больного, его необходимо вводить подкожно или внутримышечно.

Положительные результаты получены при лечении стрептомицином таких заболеваний, как туляремия, чума, коклюш и некоторые другие. Но наибольший эффект стрептомицина проявляется при лечении туберкулезных заболеваний (туберкулез верхних дыхательных путей, менингитный туберкулез, милиарный и инфильтратный туберкулез легких, туберкулез кожи и др.).

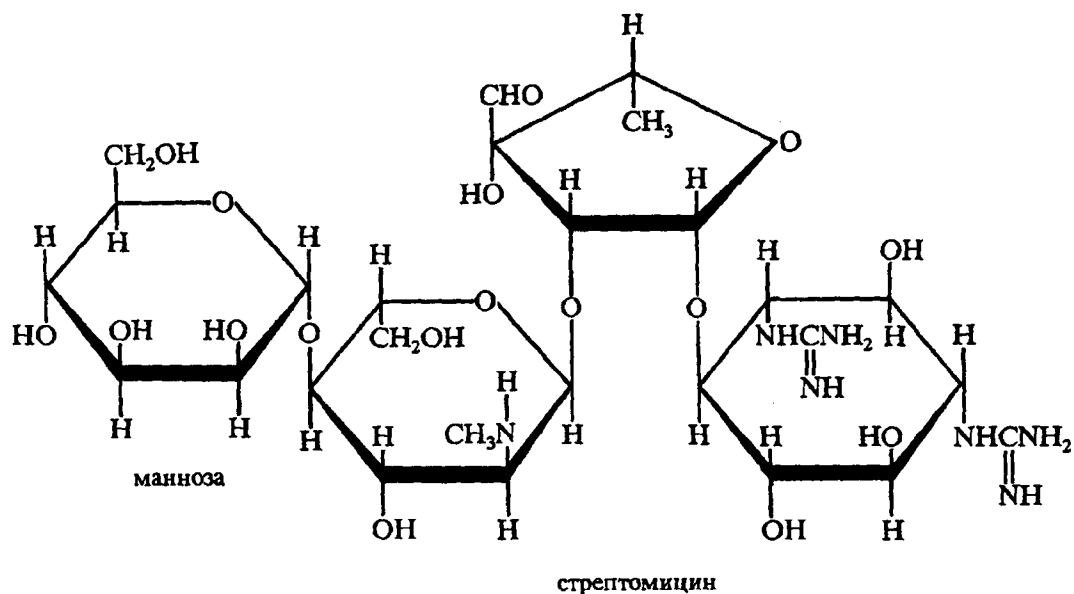
Следует подчеркнуть, что, пожалуй, ни в одной из областей педиатрии не достигнуты такие большие успехи в результате применения антибиотиков, как при лечении туберкулезного менингита. Применение стрептомицина в корне изменило течение и исход этого тяжелого заболевания. Если до использования стрептомицина смертность при туберкулезном менингите составляла 100%, то с появлением стрептомицина при своевременно начатом лечении значительная часть больных выживает. Обычно при лечении этого заболевания стрептомицин применяется в сочетании с изониазидом (гидразид изоникотиновой кислоты), а при лечении туберкулеза он используется в комбинации с ПАСК (п-аминосалициловая кислота), фтивазидом, изониазидом, промизолом.

Использование стрептомицина особенно эффективно при туберкулезе верхних дыхательных путей, заболеваниях менингеальных и других серозных и слизистых оболочек.

При всех видах туберкулеза наибольший эффект получается при использовании стрептомицина в ранней или острой фазе процесса, а наименьший — при обширных деструктивных изменениях в пораженных органах.

Маннозидострептомицин (Mannosidostreptomycin)

Маннозидострептомицин выделен в 1947 г. из культуры стрептомицета, образующего стрептомицин, методом противоточного распределения. По химическому строению антибиотик очень близок стрептомицину, но отличается от него наличием в молекуле маннозы:



Молекула маннозидострептомицина состоит из остатка стрептомицина и D-маннозы, причем манноза присоединена к четвертому атому углерода N-метил-L-глюкозаминного остатка стрептомицина.

Маннозидострептомицин образуется при определенных условиях развития *S. griseus*. Его антибактериальная активность значительно ниже, чем у стрептомицина (табл. 55).

Таблица 55

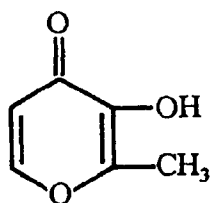
Антибиотическая активность стрептомицина и маннозидострептомицина
(по Шемякину и др., 1961)

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл		Отношение активности стрептомицина и маннозидострептомицина
	трихлоргидрата стрептомицина	трихлоргидрата маннозидострептомицина	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,53	5,70	0,27
<i>Salmonella schottmülleri</i>	8,42	13,05	0,62
<i>S. typhi</i>	9,94	12,20	0,81
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	1,38	6,80	0,20
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1,01	3,73	0,27
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,50	7,80	0,19

Культуры *S. griseus*, образующие стрептомицин, содержат фермент, способный превращать маннозидострептомицин в стрептомицин. При соответствующем контроле процесса развития актиномицета — продуцента стрептомицина можно добиться минимального образования маннозидострептомицина, так как последний — менее активный и нежелательный препарат.

Дигидрострептомицин (Dihydrostreptomycin)

При каталитическом гидрировании стрептомицин присоединяет два атома водорода и переходит в дигидрострептомицин (см. формулу I (А) на с. 230). Дигидрострептомицин по химиотерапевтическому и фармакологическому действию близок к стрептомицину. Соединение приобрело значение после того, как было установлено, что оно менее токсично в отношении вестибулярных расстройств, чем стрептомицин. Дигидрострептомицин при обработке щелочью не образует мальтола, стрептомицин же в этих условиях образует мальтол:



Дигидрострептомицин производят в промышленных условиях в виде сульфата или гидрохлорида. До 1957 г. этот антибиотик получали только методом каталитического гидрирования стрептомицина. В 1957 г. японскими исследователями А. Имамура, М. Хори, С. Татсуока и др. было установлено, что *Streptomyces humidus* продуцирует антибиотик, идентичный дигидрострептомицину.

В качестве лечебного препарата применяют парааминосалициловую соль дигидрострептомицина (пасомицин). Пасомицин используют при лечении различных форм туберкулеза, гнойных процессов и других заболеваний.

Другими практически ценными препаратами дигидрострептомицина являются пантомицин (пантотеновокислая соль дигидрострептомицина) и аскорбиновокислая соль дигидрострептомицина.

* * *

Во 2-ю группу аминогликозидов входят 4,5-дизамещенные дезоксистрептаминовые антибиотики. К аминогликозидным антибиотикам относятся 4,5-дизамещенные дезоксистрептаминовые соединения, куда входят неомицины и паромомицины.

Неомицины (Neomycins)

В 1949 г. З. Ваксман и Х. Лешевалье из культуры *Streptomyces fradiae*, изолированной из почвенного образца, выделили новый широкоспектрный антибиотик неомицин. Было установлено, что он состоит из смеси антибиотиков, которая получила название неомицинового комплекса. Комплекс включает неомицин А (неамин), неомицины В, С, D, Е и F. Неамин не обнаруживает антибиотических свойств в опытах *in vitro*.

Продуцент неомицина *S. fradiae* при росте на натуральных средах неопределенного состава или на синтетических средах имеет желтовато-коричневый цвет, но растворимого пигмента не образует. При развитии на синтетических средах вначале образуется белый воздушный мицелий, который затем окрашивается в светлый красновато-коричневый цвет.

Неомицин продуцируется при культивировании стрептомицета на разных по составу средах. Антибиотик вырабатывается при развитии *S. fradiae* на синтетических средах, однако более

высокий выход его наблюдается при росте стрептомицета на средах с соевой мукой (рис. 32).

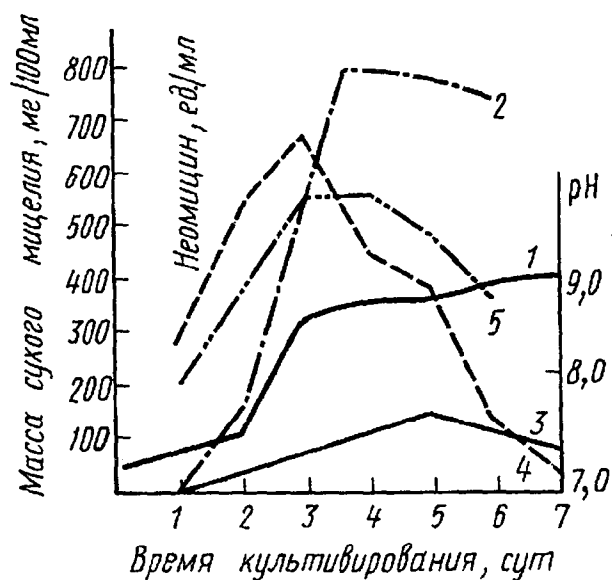


Рис. 32. Соотношение между ростом *Streptomyces fradiae*, образованием неомицина и изменением pH культуры на натуральной и синтетической средах (Villemin et al., 1953):

1 — pH, 2 — неомицин на натуральной среде, 3 — неомицин на синтетической среде, 4 — мицелий на синтетической среде, 5 — мицелий на натуральной среде

На синтетической среде актиномицет развивается лучше, чем на среде, содержащей соевую муку. Но биосинтез неомицина на синтетической среде почти в 8 раз ниже, чем на натуральной среде неопределенного состава.

На среде с повышенным содержанием соевой муки, глюкозы и крахмала биосинтез неомицина составляет до 8,8 мг/мл. Некоторые ростовые вещества способствуют увеличению выхода неомицина на 50%. К таким веществам относятся ауксины и α -нафтилуксусная кислота, растворенные в смеси, состоящей из 90,5% этанола, 5% метанола и 4,5% воды. Наиболее эффективная доза ауксинов составляет семь частей на миллион, внесенная в среду перед стерилизацией.

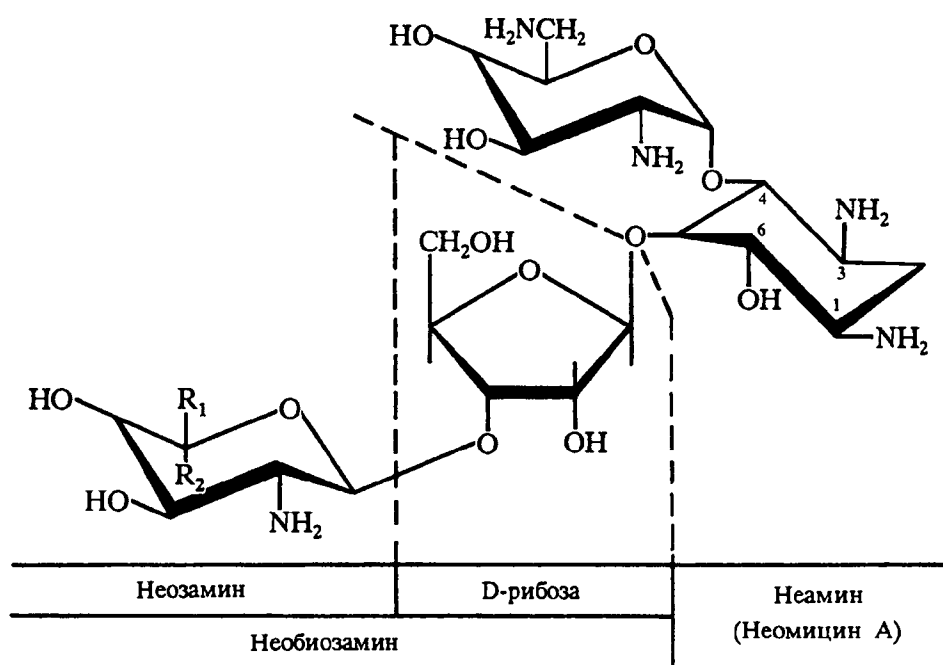
Стимулирующий эффект ауксинов проявляется в том случае, если процесс продолжается до 138–162 ч; в ранние сроки развития микроорганизма этот эффект не проявляется.

В процессе образования антибиотика существенную роль играет цинк, оптимальная концентрация которого в среде 1 мг/л, поэтому использование дистиллированной воды для приготовления сред отрицательно действует на выход неомицина (рис. 33).

Степень аэрации культуры при биосинтезе неомицина должна быть несколько ниже, чем при выработке стрептомицина. *S. fradiae* наряду с образованием неомицинов выделяет антибиотик фрадицин ($C_{30}H_{34}N_4O_3$), подавляющий развитие грибов, но неактивный в отношении бактерий. Кроме *S. fradiae* неомицин образует и *S. albogriseolus*, но он не выделяет фрадицина.

Неомицины — основания, хорошо растворимые в воде и нерастворимые в органических растворителях. Наибольшая антибиотическая активность их проявляется при щелочной реакции среды.

Установлены структуры неомицина А, неомицина В и неомицина С:



Неомицин В: $R_1 = H$; $R_2 = CH_2NH_2$

Неомицин С: $R_1 = CH_2NH_2$; $R_2 = H$

Неомицины не теряют антимикробных свойств при длительном (до двух лет) хранении как в виде растворов, так и в твердом состоянии. Антибиотик активен в отношении многих грамположительных и грамотрицательных бактерий. Его антимикробный спектр сходен со спектром стрептомицина, однако действие отличается. Так, неомицин подавляет развитие устойчивых к стрептомицину штаммов

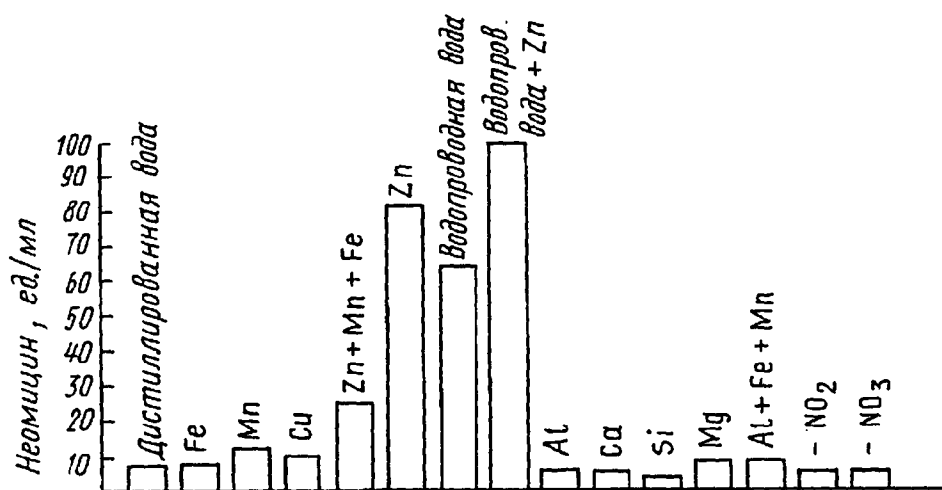


Рис. 33. Влияние следов ионов различных металлов и окисленных форм азота на образование неомицина в среде с пептоном (по Waksman, 1953)

Mycobacterium tuberculosis, малоактивен в отношении большинства видов *Clostridium*, *Streptococcus*, грибов, а также вирусов и протозоа. Ниже приведен антимикробный спектр неомицина:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,5–100
<i>S. faecalis</i>	10–100
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,4–10
<i>Escherichia coli</i>	1,0–10
<i>Haemophilus influenzae</i>	1,0–10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,0–200
<i>Salmonella</i> sp.	0,5–10
<i>Shigella</i> sp.	0,2–10
<i>Bacillus anthracis</i>	0,5–10

Характерно, что чувствительные к неомицину микроорганизмы приобретают устойчивость к нему в меньшей степени, чем к стрептомицину. Антибиотический эффект неомицина в отношении многих видов бактерий выше, чем у стрептомицина (табл. 56).

Результаты, приведенные в табл. 56, прежде всего показывают, что стрептомицин в концентрации 5 мкг/мл и неомицин в количестве 3 мкг/мл в отношении *E. coli* выступают как бактериостатические антибиотики. Бактерицидные свойства этих веществ проявляются при более высокой концентрации. Эти данные свидетельствуют и о том, что неомицин даже в меньших концентрациях, чем стрептомицин, проявляет более сильное антимикробное действие в отношении *E. coli*.

Терапевтические свойства неомицина более высоки, чем стрептомицина. Например, если для предохранения от гибели мышей,

**Бактериостатические и бактериоцидные свойства неомидина и стрептомицина
в отношении *Escherichia coli*
(no Waksman, 1953)**

Концентрация антибиотика, мкг/мл бульона	Число жизнеспособных клеток, млн, на 1 мл после инкубации в течение	
	14 ч	28 ч
Без антибиотика	800	700
Стрептомицин, 5	80	40
То же, 20	0	0
Неомицин, 3	0,005	1,5
То же, 15	0	0

Примечание. Инокулят содержит 180 000 клеток *E. coli* в 1 мл бульона; жизнеспособные клетки определялись чашечным методом.

зараженных золотистым стафилококком, требуется 50 мкг стрептомицина на одну мышь, то неомицина при тех же условиях нужно всего лишь 3,5 мкг. При лечении заболевания, экспериментально вызванного культурой паратифозной палочки (*Salmonella schottmülleri*), с помощью стрептомицина и неомицина выяснилось, что для получения лечебного эффекта при паратифозной инфекции стрептомицина требуется в 5 раз больше, чем неомицина (табл. 57).

Неомицин нашел применение в медицинской практике. Он используется в качестве местного препарата в дерматологии, хирургии, оториноларингологии (для лечения заболеваний наружного и среднего уха, различных инфекций полости рта), при лечении некоторых заболеваний глаз, а также для борьбы со стафилококковым носительством среди медицинского персонала родильных домов.

Однако при использовании неомицина в клинике следует иметь в виду его токсичность. О токсических свойствах неомицина опубликовано много работ. Данные по токсичности значительно колеблются, что связано с различным составом и степенью чистоты препаратов.

Для мышей при подкожном введении LD₅₀ доза неомицина составляет 278 мг/кг, а при внутривенном введении — 55,16 мг/кг.

Таблица 57

Лечебные свойства стрептомицина и неомицина, выявленные в опытах на животных при лечении заболевания, вызванного паратифозной палочкой

Стрептомицин		Неомицин	
Доза на мышь, ед.	Выживаемость, %	Доза на мышь, ед.	Выживаемость, %
75	0	25	0
100	27	50	90
200	86	75	100
400	100		

Применение неомицина вызывает глухоту и другие побочные явления, однако эти расстройства, как правило, обратимы и при прекращении введения антибиотика исчезают. Для организма человека неомицин более токсичен, чем стрептомицин.

К этой же группе относятся паромомицины, выделенные из культуры *S. rimosus* subsp. *paromomycines*. Эти антибиотики близки по структуре и антибактериальным свойствам к неомицинам.

* * *

3-я группа аминогликозидов включает 4-6-дизамещенные дезоксистрептаминовые антибиотики (канамицины, тобрамицин, гентамицины, сизомицин, фортимицины).

Канамицины (Kanamycins)

В 1957 г. Х. Умегава с сотрудниками описал антибиотик канамицин, образуемый *Streptomyces kanamyceticus*. Позднее было установлено, что этот стрептомицет образует три антибиотика: канамицин А, канамицин В и канамицин С.

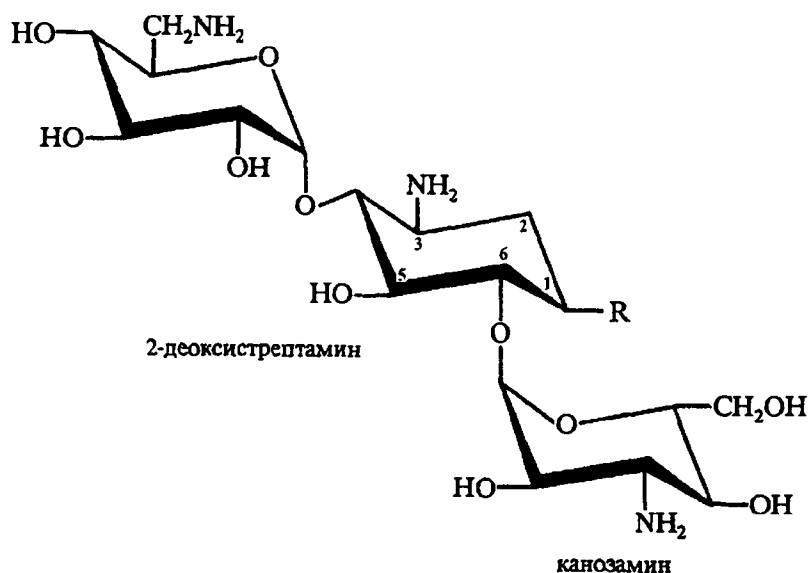
По биологическим свойствам канамицин А сходен со стрептомицином и неомицинами. Его антибиотическая активность в отношении *Mycob. tuberculosis* близка к стрептомицину, однако канамицин более активен в отношении *E. coli*.

Канамицин в организме животных проявляет противовирусную активность в отношении вируса Западного Нила. Эта активность, по-видимому, связана с тем, что антибиотик индуцирует биосинтез интерферона. Ниже приведен антимикробный спектр канамицина:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Staphilococcus aureus</i>	0,5–5,0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1,0–25
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,4–10
<i>Bacillus anthracis</i>	0,5–5,0
<i>Escherichia coli</i>	0,5–10
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,2–1,0
<i>Salmonella</i> sp.	2,0–10
<i>Vibro cholerae</i>	0,3–3,0

Положительным свойством канамицина А является то, что устойчивость к нему у большинства чувствительных организмов развивается гораздо медленнее, чем к стрептомицину. Токсичность его ниже, чем у стрептомицина, и значительно ниже, чем у неомицинов.

Строение канамицина А, выясненное в 1958 г., может быть представлено следующей структурной формулой:



Канамицин А: $R = -NH_2$

Амикацин: $R = -NHCOCH(OH)(CH_2)_2NH_2$

Благодаря своим положительным свойствам канамицин А применяется в медицине в качестве противотуберкулезного препарата, для борьбы со стафилококковыми заболеваниями, а также для лечения сибирской язвы, гонореи и других инфекций, не поддающихся лечению другими антибиотиками

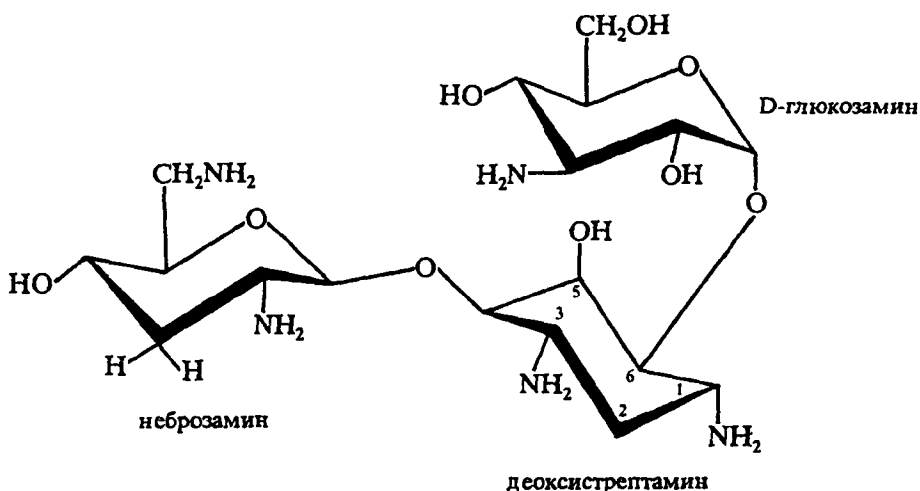
В 1972 г. получена химическая модификация канамицина — а м и к а ц и н — полусинтетический антибиотик, подавляющий рост патогенных бактерий, чувствительных и резистентных к канамицину, гентамицину и некоторым другим аминогликозидам.

В 1983 г. амикацин получен в результате биологической трансформации канамицина А с использованием ацилирующей системы *Vacillus circulans* — продуцента аминогликозидного антибиотика бутирозина.

Среди полусинтетических канамицинов представляет интерес и другой препарат — д и б е к а ц и н (3,4-дидеоксиканамицин В), подавляющий развитие устойчивых к аминогликозидным антибиотикам штаммов микроорганизмов, в том числе *Pseudomonas aeruginosa*.

Тобрамицин (Tobramycin)

В 1967 г. К. Хиггенс и Р. Кастнер (С. Higgens and R. Kastner) из культуры *Streptomyces tenebrarius* выделили комплекс антибиотиков, среди которых был компонент, названный тобрамицином. В состав молекулы тобрамицина входит деоксистрептамин, аминодокси-*D*-глюкоза и диаминотридеокси-*D*-гексоза (неброзамин):



По спектру антимикробного действия тобрамицин аналогичен гентамицину. Он биологически активен в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Стрептококки устойчивы к тобрамицину, как и к другим аминогликозидным антибиотикам. Резистентность стрептококков к аминогликозидам, по-видимому, связана с отсутствием у этих бактерий функциональных переносчиков антибиотиков через цитоплазматическую мембрану. Приведем антимикробный спектр тобрамицина:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,05–1,5
<i>S. faecalis</i>	3,00–25,0
<i>Escherichia coli</i>	0,3–5,0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,3–5,0
<i>Klebsiella</i> sbsp.	0,2–3,5
<i>Proteus mirabilis</i>	0,3–6,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,2–25,0
<i>Salmonella</i> sbsp.	0,3–10,0
<i>Serratia marcescens</i>	0,5–10,0

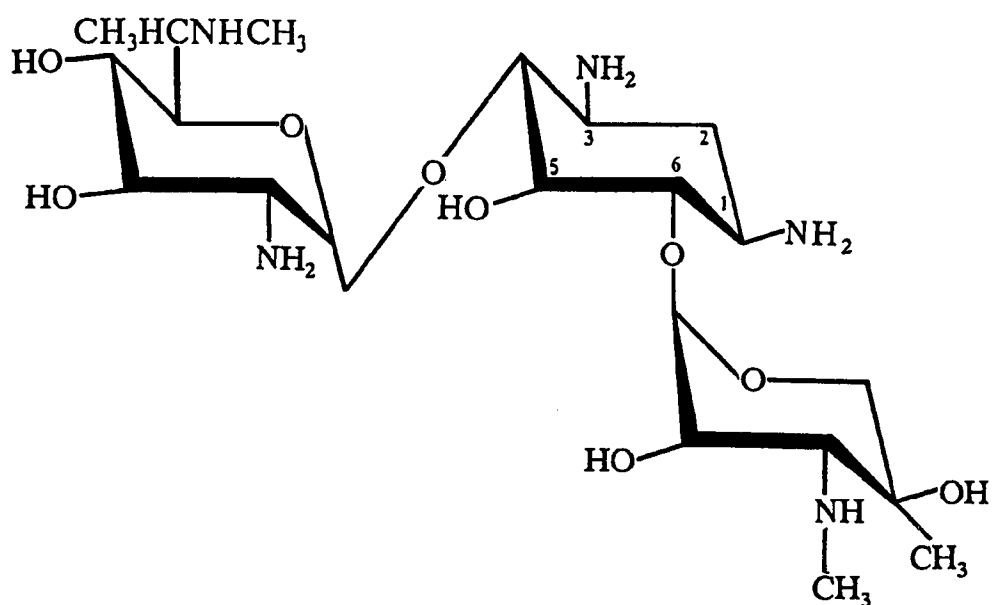
Тобрамицин находит применение в медицинской практике. Он высокоэффективен при лечении мочевыводящих путей, сепсиса, септического эндокардита, перитонита и других заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями. Этот антибиотик вводится больным внутримышечно или внутривенно.

Как и другие аминогликозиды, тобрамицин при длительном применении вызывает побочные явления, связанные с нефро- и ототоксическим действием.

Гентамицины (Gentamycins)

Гентамицины А, С₁, С_{1а}, С₂ и др. (описано 17 вариантов) образуются культурой *Mycrotonospora purpurea*. Комплекс антибио-

тиков обладает широким спектром биологического действия; он подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, в том числе *Proteus*, *Pseudomonas*, не оказывает действия на грибы. Гентамицин проявляет и антивирусную активность. В основе этой активности лежит способность антибиотика вызывать обратимое подавление клеточных ферментов, параллельно с чем ингибируется и репродукция вируса. Устойчивость к гентамицинам проявляется относительно медленно и скачкообразно. Этот антибиотик наиболее часто используется в медицинской практике при лечении тяжелых гнойных инфекций. Наиболее ценным препаратом является его пролонгированная форма (г е н т а ц и к о л), приготавливаемая на полимерной основе (на коллагене). Гентамицин С₁ имеет следующее строение:



Полусинтетическим соединением гентамицина является нетилмицин. Многие штаммы *Pseudomonas*, *Serratia*, *Klebsiella*, устойчивые к гентамицину, чувствительны к нетилмицину. Этот антибиотик проявляет высокую эффективность при лечении различных инфекций, вызываемых грамположительными и грамотрицательными бактериями (заболевания мочевыводящих путей, бронхов, стафилококковых и синегнойных инфекций).

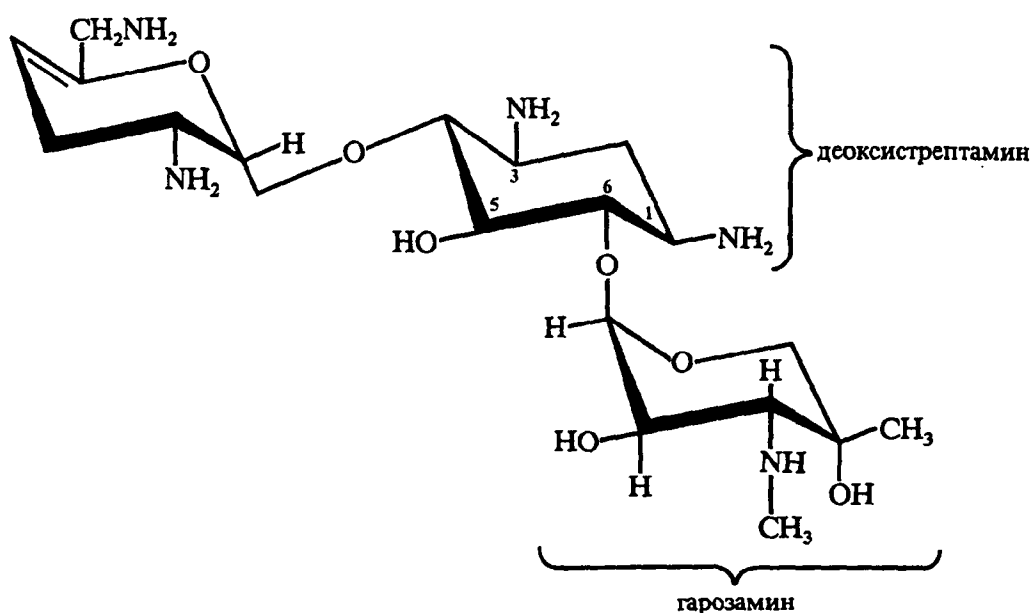
Сизомицин (Sisomycin)

Сизомицин — один из перспективных антибиотиков, относящихся к группе аминогликозидов. Он образуется культурой *Mycrotonospora inyoensis* и обладает широким спектром антимикробного действия. Подобно стрептомицину, сизомицин наибольшую активность проявляет в щелочных условиях. Наивысшая антибиотическая активность этого соединения обнаруживается в отношении штаммов *Serratia* sp. и индол-позитивных штаммов

Proteus sp. Высокой чувствительностью к сизомицину обладают штаммы *Pseudomonas aeruginosa*.

В процессе развития *Micromonospora* сизомицин локализуется в клетках. Насыщение клеток продуцента антибиотиком приводит к прекращению биосинтеза сизомицина. Добавление к культуральной жидкости 0,1 М NaCl на 2–4-е сутки роста способствует значительному выходу сизомицина из клеток *Micromonospora*.

По строению сизомицин относится к группе гентамицина и имеет следующую структуру:



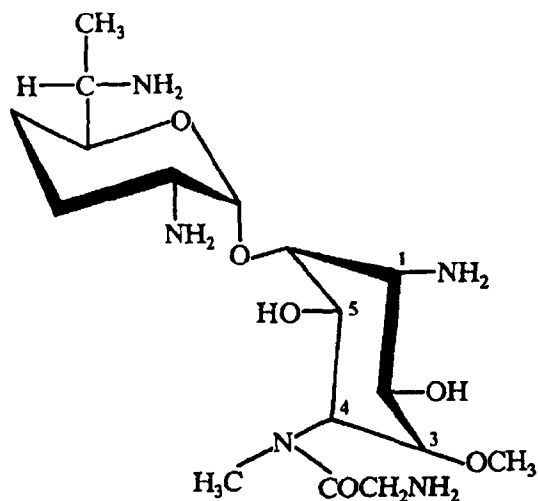
Ниже приведен антимикробный спектр сизомицина:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,4–0,5
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,06–0,3
<i>Escherichia coli</i>	0,5–4,0
<i>Proteus vulgaris</i>	0,5–4,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,3–25,0
<i>Serratia</i> sp.	0,5–12,0

Антибиотическая активность сизомицина аналогична антимикробной активности гигромицина, однако последний менее активен в отношении ряда микроорганизмов.

Фортимицины (Fortimycins)

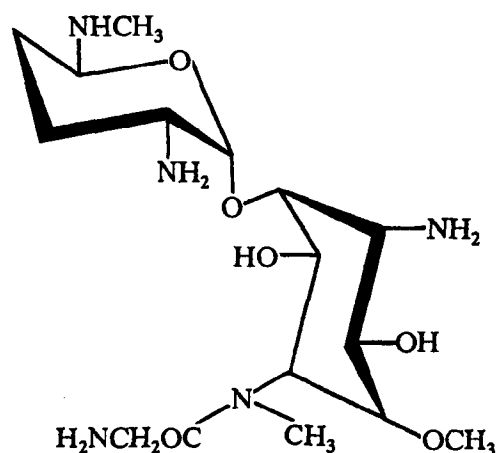
В 1976 г. из культуры *Micromonospora olivoasterospora*, изолированной из почв окрестностей города Хиросимы, выделены антибиотики фортимицин А и фортимицин В, из которых первый обладает наибольшей антибиотической активностью. Фортимицин А имеет следующую структуру:



Он подавляет рост большинства грамотрицательных патогенных бактерий, устойчивых к другим аминогликозидам.

К группе фортимицинов относится спорарицин — аминогликозид, образуемый новым и редким видом актиномицетов *Saccharopolyspora hirsuta* subsp. *kobensis*, выделенным в 1979 г. Строение спорарицина А аналогично строению фортимицина А.

К антибиотикам фортимицинам относятся саннамицин А и саннамицин В, образуемые культурой нового вида стрептомицета *S. sannanensis*. Ниже представлено строение саннамицина А:



Все аминогликозидные антибиотики объединяет не только близкое строение, но и механизм биологического действия, связанный с нарушением считывания генетического кода.

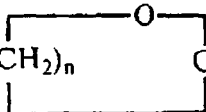
В заключение следует отметить, что при широком и активном использовании в медицинской практике антибиотиков, относящихся к группе аминогликозидов (наряду со стрептомицином и группой неомицинов в терапии активно применяются и другие антибиотики-аминогликозиды, в том числе амикацин, тобрамицин, нетилмицин, гентамицин), наблюдаются побочные явления. Как уже указывалось, при использовании в высоких концентрациях стрептомицина в течение длительного времени у больных могут проявляться нарушения равновесия, частичная или полная потеря слуха. Причем это свойство ототоксичности названной

группы антибиотиков связано с избирательным проникновением их в жидкости внутреннего уха. Установлено, что интенсивность токсического эффекта связана с концентрацией антибиотиков в перилимфе.

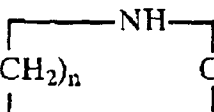
Особенность всех аминогликозидных антибиотиков — их способность накапливаться в почках. Это обстоятельство связано с тем, что в организме больного аминогликозиды не подвергаются метаболическому воздействию, а выделяются из организма лишь в результате почечной экскреции. Период полувыведения антибиотиков этой группы составляет от 4 до 14 дней. Указанная особенность аминогликозидов обеспечивает длительное сохранение их в крови больного. Однако это обстоятельство вызывает развитие нефротоксикоза. Показано, что диета, богатая кальцием, существенно уменьшает нефротоксическое действие аминогликозидных антибиотиков. Все это, естественно, представляет серьезную проблему при использовании аминогликозидных антибиотиков в медицинской практике.

Семейство макроциклических лактонов (лактамов)

В это семейство антибиотиков включаются макроциклические лактоны, содержащие в молекулах лактонные структуры (кольца) общего строения

$(\text{CH}_2)_n$  $\text{C}=\text{O}$. Сюда относятся макролиды,

макротетралиды. В названное семейство входят также макроциклические лактамы, имеющие в молекулах лактамные структуры

$(\text{CH}_2)_n$  $\text{C}=\text{O}$, например рифомицины.

МАКРОЛИДЫ

Антибактериальные продукты метаболизма представителей различных групп микроорганизмов, имеющие слабощелочные свойства и относительно большую молекулярную массу, были названы Вудвардом в 1957 г. макролидами.

Для молекул антибиотиков-макролидов характерно макроциклическое лактонное кольцо, связанное с одним или несколькими углеводными остатками, которые обычно являются аминосахарами. Лактонное кольцо этих природных антибиотиков состоит из 12, 14, 16 и 17 членов.

В группу макролидных антибиотиков входит более 50 соединений, из которых наиболее хорошо изучены эритромицин, кар-

бомицин, пикромицин, метимицин, спирамицин, олеандомицин, розамицин, джозамицин и др.

Большинство макролидных антибиотиков образуют стрептомицеты. Однако некоторые из этих соединений (розамицин, мегаломицин А) выделены из *Micromonospora*, эритромицин продуцируется представителем рода *Saccharopolyspora*, метимицин — стрептомицетом и нокардия, патулолиды — представителями рода *Penicillium*.

Группа макролидных антибиотиков в основном подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также микоплазм. Многие соединения этой группы оказывают бактериостатическое действие в отношении форм бактерий, устойчивых к таким широко используемым антибиотикам, как стрептомицин, пенициллин, тетрациклины, что имеет существенное практическое значение.

Некоторые макролиды подавляют развитие *Pseudomonas ruosuauea* (синегнойной палочки) в условиях *in vivo*, не оказывая действия на этот организм *in vitro*.

Макролидные антибиотики уже в течение ряда десятилетий широко используются в медицинской практике в качестве резервных препаратов. Например, если у больного проявляются аллергические реакции к пенициллинам, то такому больному предлагают макролиды.

Эти антибиотики привлекли к себе внимание практических врачей как препараты с большей биологической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий и хорошими фармакологическими свойствами. Особый интерес вызывают эритромицин и его химические модификации.

Среди макролидных антибиотиков есть соединения с иммуносупрессорными свойствами. Так, описан новый макролидный антибиотик К-506, образуемый культурой *Streptomyces tsukubaensis* (Siekierka et al., 1989), который является иммуносупрессором. По этим свойствам антибиотик К-506 близок циклоспорину А, но в 10–100 раз активнее его.

Условно макролидные антибиотики по числу членов лактонного кольца можно разделить на четыре группы: 12-, 14-, 16- и 17-членные (табл. 58).

Группа 12-членных макролидных антибиотиков обнаружена лишь в последние годы. Они продуцируются мицелиальным грибом *Penicillium urticae* и называются патулолидами. В эту же группу входит антибиотик метимицин, вырабатываемый соответствующими видами стрептомицетов и нокардия. К 14-членным антибиотикам относятся эритромицин, олеандомицин и совсем недавно полученные антибиотики альбоциклин, мегаломицин и

Основные подгруппы природных макролидных антибиотиков
(описано более 50 соединений)

Число членов в лактонном кольце	Антибиотики	Продуценты
12	Метимицин Патулолиды	<i>Streptomyces eurocidicus</i> , <i>Nocardia gardneri</i> <i>Penicillium urticae</i>
14	Альбоциклин Ланкамицин Мегаломицин А Олеандомицин Пикромицин Эритромицин	<i>Streptomyces</i> sp. <i>S. violaceoniger</i> , <i>S. spinichromogenes</i> <i>Micromonospora</i> <i>S. antibioticus</i> <i>S. felleus</i> , <i>S. zoomyceticus</i> <i>Saccharopolyspora erythrae</i>
16	Авермектины Карбомицины (магнамицины) Лейкомицины Маридомицин Неутрамицин Розамицин Реломицин Спирамицин Тилозин и др.	<i>Streptomyces avermitilis</i> <i>S. halstedii</i> <i>S. kitasatoensis</i> <i>S. gygroscopicus</i> <i>S. rimosus</i> <i>Micromonospora rosaria</i> <i>S. gygroscopicus</i> <i>S. ambofaciens</i> <i>S. fradiae</i>
17	Ланкацидины	<i>Streptomyces griseofuscus</i> , <i>S. violaceoniger</i>

ланкамицин. К 16-членным макролидам относятся спирамицин, тилозин, розамицин, карбомицин и др. Из *Micromonospora* выделен штамм, способней синтезировать комплекс новых 16-членных макролидных антибиотиков, названных и з е н а м и ц и н а м и. Некоторые из них идентичны препаратам, полученным в результате химической модификации тилозина. В перспективе 16-членные соединения могут представлять наибольший практический интерес. К 17-членным макролидам относятся ланкацидины.

Микроорганизмы, чувствительные к макролидным антибиотикам, образуют устойчивые к ним формы. Для появления резистентных форм обычно требуется небольшое число пересевов чувствительных к антибиотику бактерий в среды с постепенно возрастающим количеством макролида. Широкое распространение форм бактерий, устойчивых к макролидным антибиотикам, отрицательно сказывается на эффективности терапии.

Установлены два основных механизма резистентности бактерий к макролидам. Первый обусловлен метилированием участка связывания антибиотика с 50 S субъединицей рибосомы, что приводит к затруднению контакта макролида с бактериальной рибосомой. Второй механизм связан с активным выведением (эффлюксом) антибиотика из микробной клетки. Высокий уровень

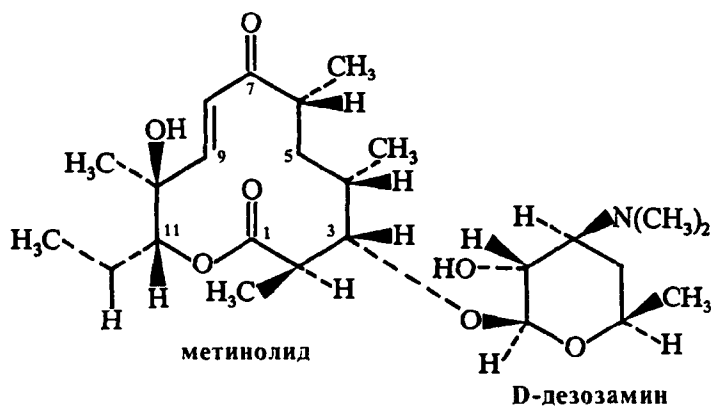
резистентности микроорганизмов, связанный с эффлюксом, наблюдается к 14- и 15-членным (полусинтетическим) макролидам.

Антибиотики-макролиды (эритромицин, олеандомицин, магнамицин, спирамицин, тилозин и др.) обладают высокой бактериостатической активностью.

Ниже рассмотрены некоторые представители макролидов.

Метимицин (Methymycin)

Метимицин относится к 12-членным макролидам и имеет следующее строение:



Антибиотик продуцируется стрептомицетом (*Streptomyces eurocidicus*) и *Nocardia gardner*. Подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Эритромицины (Erythromycins)

В группу эритромицинов входят 14-членные макролидные антибиотики, близкие по строению и свойствам. Сюда относятся эритромицин А (илотицин), эритромицины В и С.

Впервые эритромицин А (илотицин) был получен из культуральной жидкости *S. erythreus*, выделенного из образца почв Филиппин Мак Гуире и др. в 1952 г. Эритромицин В в кристаллической форме был описан в 1954 г. также как продукт жизнедеятельности *S. erythreus*.

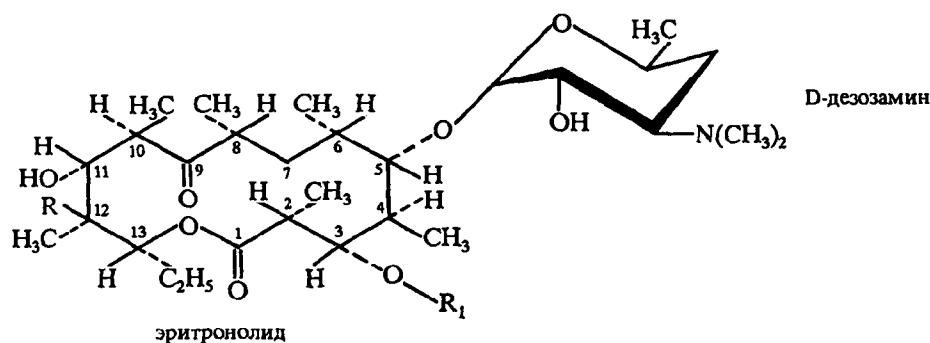
После извлечения из маточного раствора эритромицинов А и В в нем был обнаружен третий антибиотик — эритромицин С. Возможно, что эритромицин В следует рассматривать в качестве предшественника биосинтеза эритромицина А.

Эти формы антибиотиков разделяются методом бумажной хроматографии.

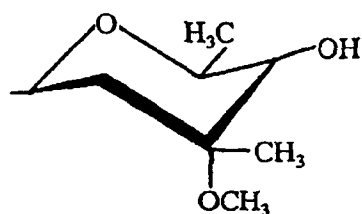
Свойства эритромицина В идентичны свойствам эритромицина А, однако антибактериальная активность первого на 15–25% ниже активности второго и вместе с тем эритромицин В обладает почти в 2 раза более высокой токсичностью.

В настоящее время продуцент эритромицинов отнесен к новому роду актиномицетов *Saccharopolyspora* и называется *Saccharopolyspora erythraea*.

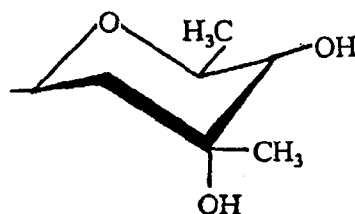
Эритромицины имеют следующее строение:



Эритромицин А: R = OH; R₁ = L-кладинозил
 Эритромицин В: R = H; R₁ = L-кладинозил
 Эритромицин С: R = OH; R₁ = L-микарозил



L-кладинозил



L-микарозил

Эритромицин В отличается от эритромицина А тем, что в положении 12 находится Н вместо ОН эритромицина А. Эритромицин С отличается от эритромицина А тем, что содержит вместо кладинозы остаток другого нейтрального углевода — микарозы.

Условия биосинтеза эритромицина

Эритромицин образуется только биологическим путем в результате биосинтеза. Методом селекции *Saccharopolyspora erythraea* получены высокоактивные штаммы продуцента. Условия биосинтеза эритромицина, как и других антибиотиков, зависят от состава питательных сред, различных специфических стимуляторов биосинтеза, температуры и аэрации культуры.

В качестве среды для образования эритромицина может быть использована кукурузная среда (%):

Кукурузный экстракт	0,50
Сульфат аммония	0,30
Глюкоза	2,00
Хлорид натрия	0,25
Карбонат кальция	0,50
Жир кашалота	0,30

Влияние температуры культивирования различных штаммов *S. erythraea* на процесс биосинтеза антибиотика зависит от состава среды и от свойств штамма. Так, на соевой или арахисовой

среде развитие актиномицета по сравнению с кукурузной средой несколько замедляется. На первых двух средах повышение температуры культивирования до 34 °С приводит к некоторому усилению биосинтеза эритромицина. Такое же повышение температуры при культивировании актиномицета на кукурузной среде снижает уровень биосинтеза антибиотика. Различные штаммы также неодинаково реагируют на изменение температуры культивирования актиномицета на одной и той же среде (табл. 59).

Таблица 59

Влияние температуры культивирования разных штаммов *S. erythraea* на биосинтез эритромицина

Среда	Штамм № 58100		Штамм № 8594		Штамм № 2577	
	Концентрация эритромицина в среде, мкг/мл (%*), при температуре культивирования, °С					
	28	34	28	34	28	34
Арахисовая	430	525 (122,1)	463 (100,7)	467	—	—
Соевая	485	655 (135,0)	552 (108,0)	596	860 (95,6)	822
Кукурузная	465	305 (65,3)	—	—	—	—

* Отношение содержания эритромицина при 34 °С к содержанию эритромицина при 28 °С.

Лактонная часть молекулы эритромицина (см. формулу эритромицина А) состоит из метилированной углеродной цепи, структура которой указывает на возможное участие пропионовой кислоты в биосинтезе этого антибиотика. Действительно, добавление к среде пропионата, пропилового спирта или пропионамида повышает образование эритромицина. Этому способствуют также добавки к среде уксусной и муравьиной кислот. При добавке ацетата максимум выхода антибиотика повышается на 27%, в случае формиата — на 84%, а в случае пропионата — на 129% по сравнению с результатами, полученными на средах без добавления этих солей. Усиление биосинтеза антибиотика не сопровождается увеличением накопления биомассы актиномицета, что указывает на специфическое действие названных веществ в процессе биосинтеза эритромицина. Одними из стартовых компонентов биосинтеза молекулы эритромицина являются пропионил-КоА и метилмалонил-КоА. Их источниками в процессе развития актиномицета могут быть углеводы, низшие спирты, жирные кислоты, аминокислоты (валин, треонин, метионин, изолейцин).

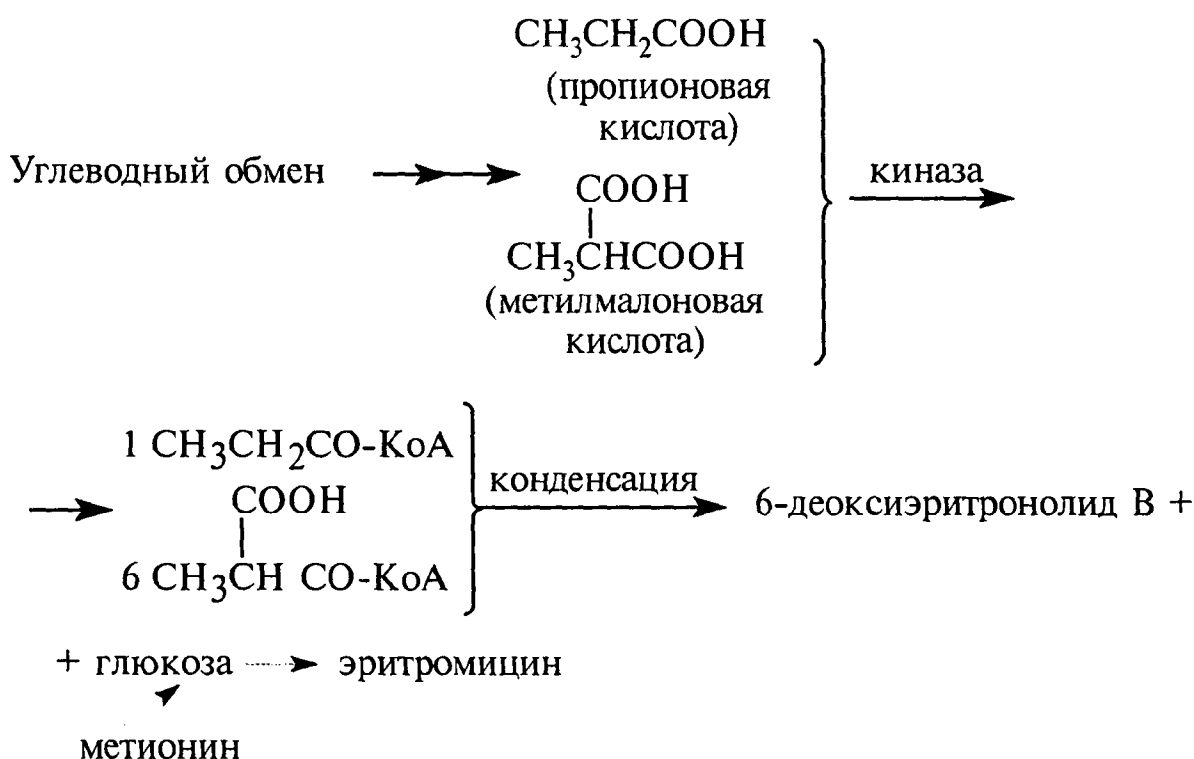
Биосинтез молекулы эритромицина культурой *S. erythraea* связан с образованием специфической киназы, активирующей про-

пионовую и метилмалоновую кислоты, участвующие в синтезе эритронолида — продукта конденсации пропионил-КоА и метилмалонил-КоА.

Синтез эритронолида происходит в результате конденсации одной молекулы пропионил-КоА и шести — метилмалонил-КоА. Таким образом, 14-членный агликон эритромицина образуется в процессе окисления его промежуточного соединения (интермедиата) 6-деоксиэритронолида В.

Синтез сахаров осуществляется в результате превращения глюкозы; метионин служит донатором метильных групп обоих сахаров (дезозамина и кладинозы).

Ниже приведена схема биосинтеза молекулы эритромицина:



В процессе развития *S. erythraea* биосинтез антибиотика обусловлен бесперебойным течением окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты в уксусную. При торможении окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты подавляется окисление ацетальдегида (CH_3CHO) в уксусную кислоту (CH_3COOH), в результате чего биосинтез эритромицина почти полностью прекращается.

Существенное значение для развития актиномицета и биосинтеза эритромицина имеет концентрация фосфора. Избыток фосфора в среде оказывает заметное действие как на развитие микроорганизма, так и на процесс образования антибиотика, но только в том случае, если избыток фосфора имеется в период интенсивного роста актиномицета (между 24 и 48 ч). Избыток его во второй фазе развития микроорганизма заметного влияния не оказывает.

Характер действия избытка фосфора на образование эритромицина зависит от состава среды. Так, на соевой среде избыток фосфора снижает интенсивность биосинтеза антибиотика. На кукурузной среде с сульфатом аммония избыток фосфора приостанавливает развитие актиномицета и полностью подавляет образование эритромицина. Ухудшение аэрации культуры усиливает подавляющее действие избытка фосфора на биосинтез антибиотика.

Избыток железа в среде ухудшает биосинтез эритромицина. Например, 20 мг% железа на кукурузной среде снижает образование антибиотика до 62%. По-видимому, подавляющее влияние железа на биосинтез эритромицина связано с образованием из ненасыщенных масел перекисных веществ, нарушающих окислительно-восстановительные условия в среде. Это подтверждается тем, что добавление метиленового синего снимает токсическое действие железа на развитие продуцента эритромицина и частично восстанавливает способность организма к биосинтезу антибиотика.

Антимикробный спектр и механизм действия

Эритромицин проявляет антибиотическую активность в отношении грамположительных и грамотрицательных кокков, некоторых грамположительных бактерий, бруцелл и ряда простейших:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,01–1,0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,001–0,1
<i>S. pneumoniae</i>	0,003–0,4
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,04–6,0
<i>Clostridium perfringens</i>	0,20–0,7
<i>Escherichia coli</i>	100
<i>Salmonella</i> sp.	100

Механизм биологического действия рассматриваемых антибиотиков обусловлен подавлением трансляции в процессе биосинтеза молекулы белка, связанного с 50 S субъединицами рибосом. В присутствии полиуридиновой кислоты как матрикса эритромицин подавляет синтез ди- и трипептидов.

Применение эритромицина

Эритромицин следует отнести к одному из наиболее ценных химиотерапевтических препаратов. Ценным свойством этого антибиотика является его высокая биологическая активность в отношении внутриклеточных инфекций.

Эритромицин находит широкое применение в клинической практике при лечении многих инфекций, вызываемых стафилококками, стрептококками и пневмококками, *Mycoplasma pneumoniae*, а также скарлатины, тонзиллитов, сепсиса, раневых инфекций, дифтерии, ожогов и других заболеваний.

Эритромицин хорошо всасывается из желудочно-кишечного тракта, поэтому возможно применение его в виде таблеток, капсул. Для этого используют антибиотик в форме основания. В случае тяжелого течения заболевания эритромицин в форме фосфорной соли применяют внутривенно. Антибиотик не вызывает серьезных побочных реакций. Иногда при его приеме в виде таблеток могут появиться тошнота, рвота, понос.

Химическая модификация эритромицина

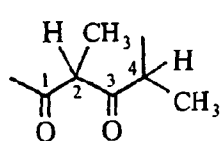
Азалиды. В результате многолетних исследований удалось ввести в макроциклическое лактонное кольцо эритромицина (в 9-м положении) азаметильную группу и получить соединение азитромицин, обладающее принципиально новыми свойствами. Таким образом, получен первый полусинтетический эритромицин с нечетным числом (15) атомов углерода и азотом в макроциклическом кольце.

Азитромицин (сумамед) — первый представитель новой группы антибиотиков, получившей название азалидов.

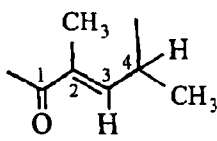
Механизм антибактериального действия азитромицина сходен с механизмом действия макролидов. Он также подавляет биосинтез белка в результате связывания с 50 S субъединицами рибосом. Однако константа связывания азитромицина с рибосомами примерно в 8 раз выше, чем у эритромицина. Грамотрицательные бактерии более чувствительны к названному антибиотику, чем к природным макролидам. Азитромицин проявляет высокую антимикробную активность по отношению к энтеробактериям (эшерихиям, сальмонеллам, энтеробактеру). Этот антибиотик способен накапливаться внутри эукариотических клеток, что имеет существенное значение для лечения инфекций с внутриклеточной локализацией, вызываемых представителями родов *Campylobacter*, *Chlamydia*, *Legionella*, *Mycoplasma*. Азитромицин отличается более высокой по сравнению с эритромицином стабильностью в кислой среде. Благодаря уникальной структуре он обладает нацеленным транспортом к очагу инфекции.

Имея своеобразные физико-химические, фармакокинетические характеристики и спектр антимикробной активности, азитромицин является весьма ценным препаратом для лечения большого числа распространенных инфекционных заболеваний.

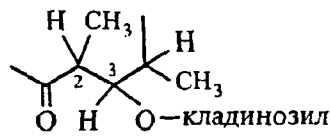
Кеталиды и ангидролиды. Новые активные соединения (кеталиды и ангидролиды) получены при модификации молекулы природного эритромицина. Кеталиды получены в результате замещения кладинозила в положении 3 атомом кислорода. У ангидролидов также отсутствует кладинозил, а между атомами углерода в положениях 2 и 3 макролактонного кольца имеется двойная связь. Ниже представлены новые химические модификации эритромицина:



Кеталид



Ангидролид



Фрагмент
эритромицина

Эти модифицированные эритромицины проявляют антибактериальную активность в отношении резистентных к природным макролидам форм микроорганизмов (устойчивых к эритромицину штаммов *Streptococcus pneumoniae*, *S. pyogenes* и др.)

Они проявляют высокую антибиотическую активность в отношении энтерококков (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*), *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* и других микроорганизмов.

Все это указывает на то, что кеталиды и ангидролиды — перспективные антибиотики для лечения инфекций дыхательных путей.

К полусинтетическим эритромицинам (14-членным) относятся также кларитромицин и рокситромицин.

Олеандомицин (Oleandomycin)

Streptomyces antibioticus в аэробных условиях культуры образует антибиотик олеандомицин, впервые описанный в 1954 г. Это 14-членный макролид.

Специфическими компонентами среды при биосинтезе олеандомицина культурой *S. antibioticus* являются пропиловый спирт и жирные кислоты (жир кашалота). Пропиловый спирт и жир усиливают биосинтез антибиотика более чем в 3 раза по сравнению с контролем. Избыток фосфора в среде тормозит рост стрептомицета и снижает биосинтез олеандомицина.

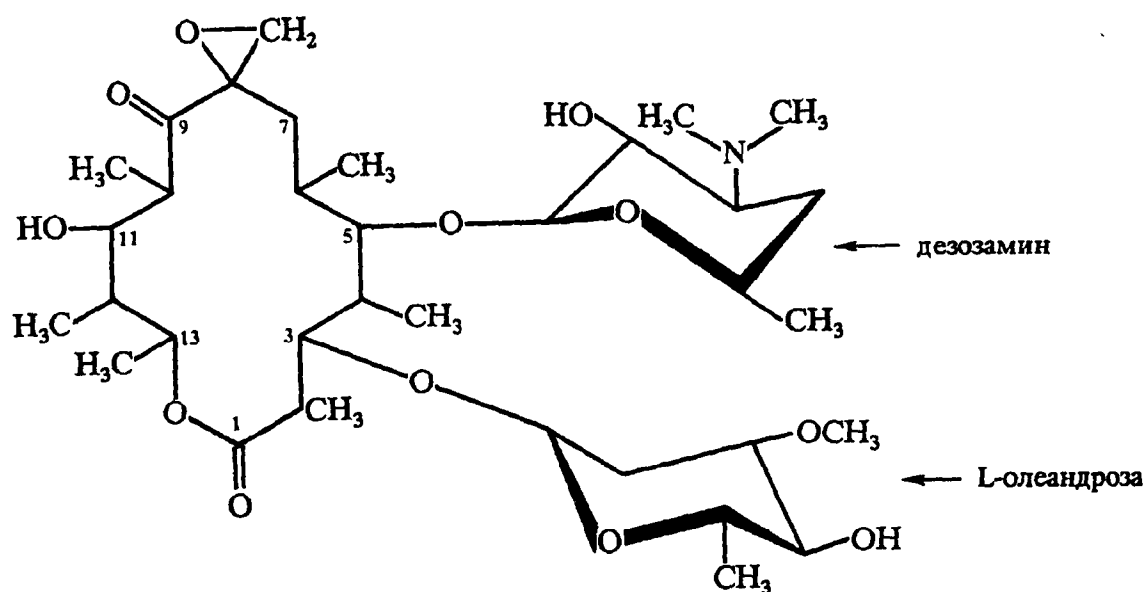
Олеандомицин действует преимущественно против грамположительных бактерий, микобактерий, риккетсий, но неактивен в отношении грамотрицательных бактерий (за исключением некоторых видов). Этот антибиотик в отличие от эритромицина не действует на внутриклеточных возбудителей инфекции.

По спектру биологического действия олеандомицин аналогичен эритромицину, но менее активен. Олеандомицин обладает

биологической активностью в отношении бактерий, устойчивых к пенициллину, стрептомицину, тетрациклинам и другим антибиотикам. Он также подавляет развитие многих штаммов бактерий, устойчивых к эритромицину.

Олеандомицин применяют при лечении пневмоний, гнойных плевритов, тонзиллитов, ларингитов, скарлатины, гонореи, раневых инфекций. У больных, принимающих олеандомицин, побочные реакции редки.

В клинической практике олеандомицин используется в виде хлоргидрата или в смеси с другими антибиотиками (пенициллином, тетрациклинами). Олеандомицин имеет следующее строение:



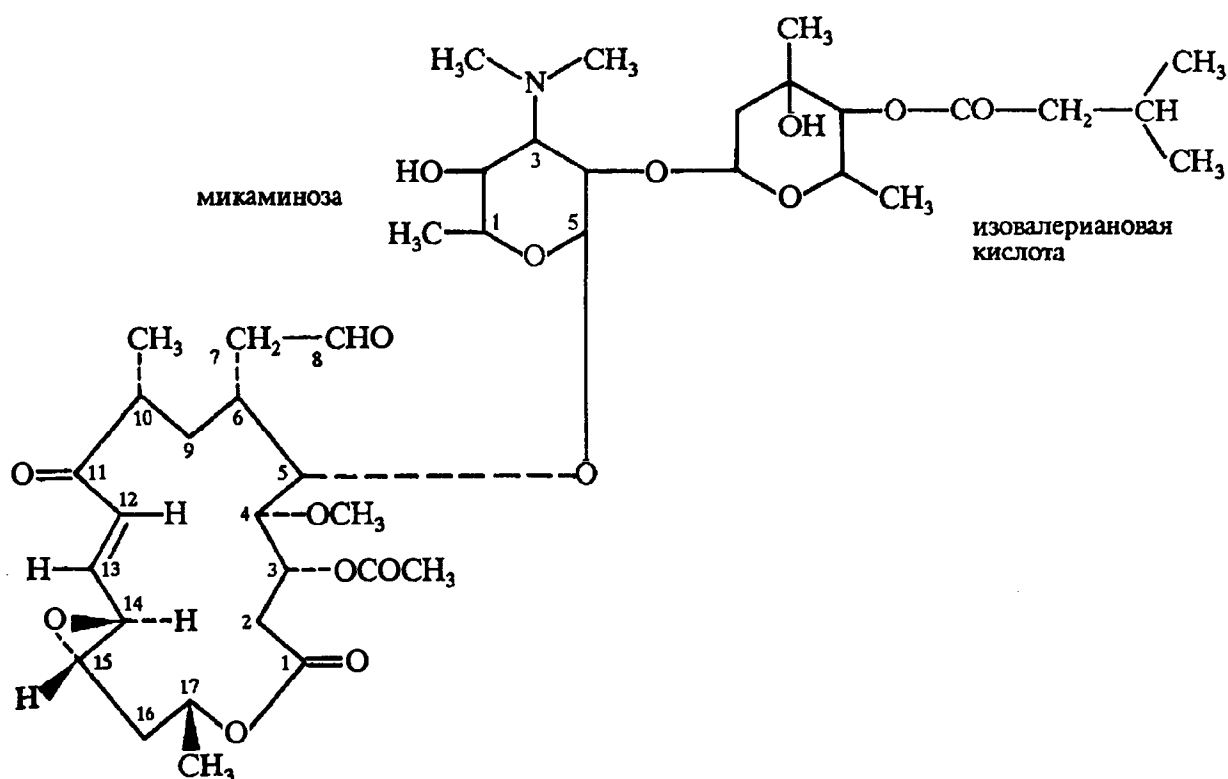
Карбомицин (Carbomycin)

Карбомицин (магнамицин) выделен из культуры стрептомицета *Streptomyces halstedii* в 1952 г. Он относится к 16-членным макролидам.

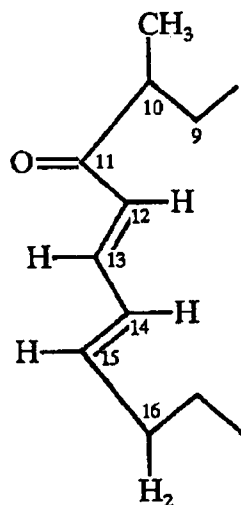
Стрептомицет образует также компонент В (карбомицин В) — вещество, близкое по свойствам карбомицину. Этот антибиотик подавляет развитие многих грамположительных бактерий, иногда он активен и в отношении некоторых видов грамотрицательных бактерий. Бактерии под действием карбомицина приобретают устойчивость к нему, которая, однако, развивается довольно медленно и ступенчато. Микроорганизмы, устойчивые к пенициллину, тетрациклиновым антибиотикам, полимиксину В и др., остаются чувствительными к карбомицину.

Карбомицин применяется в медицинской практике при лечении заболеваний дыхательных путей, мочеполовых органов, а также некоторых кожных заболеваний; обычно антибиотик принимают по 2 г в течение 5–10 сут.

Структурная формула карбомицина А установлена Р. Вудвардом в 1957 г.:



В отличие от карбомицина А карбомицин В содержит на один атом кислорода меньше, а поэтому связь между 14-м и 15-м атомами углерода двойная:



Вся остальная структура такая же, как и у карбомицина. Р. Вудвард высказал предположение, что карбомицин В — предшественник карбомицина А.

Спирамицин (Spiramycin)

Спирамицин был выделен в 1954 г из культуральной жидкости *Streptomyces ambofaciens*. По химическому строению он относится к 16-членным макролидным антибиотикам:

наиболее эффективны авермектины группы В (В₁ и В₂). На основе авермектинов группы В создано несколько антипаразитарных препаратов: а б а м е к т и н, состоящий из 80% авермектина В_{1а} и 20% авермектина В_{1б}, и и в е р м е к т и н — дигидрированное производное авермектина В₁.

Продуцент авермектинов хорошо растет на натуральных средах, содержащих спиртовую барду, пептонизированное молоко, дрожжевой автолизат, и продуцирует антибиотики на достаточно высоком уровне. Источниками углерода могут быть глюкоза, манноза, декстрин, кукурузный крахмал. Натуральные компоненты среды обеспечивают стрептомицет азотом.

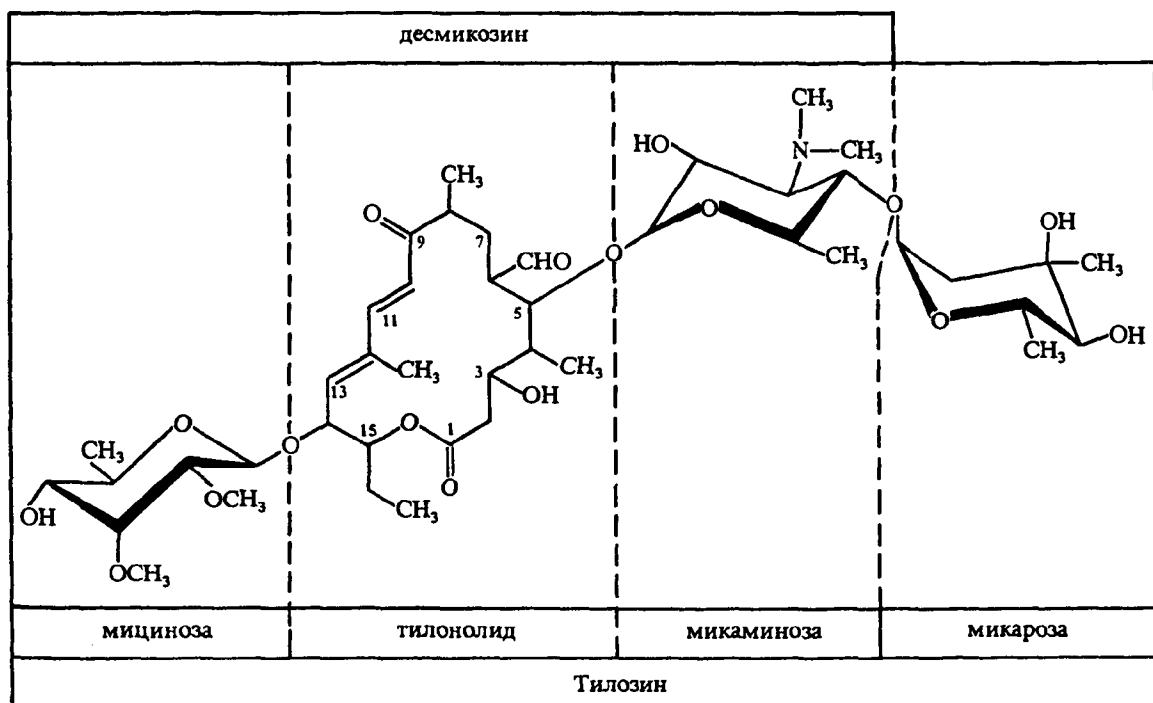
Высокий уровень биосинтеза авермектинов происходит в среде, в которой соотношение С : N = 20–23. Внесение в среду дополнительных источников азота (аммонийного или аминного) приводит к снижению образования комплекса названных антибиотиков и уменьшению доли авермектина группы В.

При развитии стрептомицета в благоприятных условиях в комплексе антибиотиков авермектины группы В₁ составляют в зависимости от компонентов среды около 35% от суммы всех образующихся антибиотиков.

Биосинтез агликона авермектина идет с участием ацетата, пропионата и метионина. Последний служит донатором метильных групп. Дисахарид образуется из глюкозы.

Тилозин (Tylosin)

Тилозин образует культура *Streptomyces fradiae*. Первое описание тилозина сделал Ж. Мак Туир в 1961 г. Строение его было установлено в 1970 г. Антибиотик (16-членный макролид) имеет следующую структуру:



При кислотном гидролизе от молекулы тилозина отщепляется сахар микароза, в результате чего образуется новый антибиотик десмикозин.

Два антибиотических вещества — тилозин и десмикозин — обладают аналогичными антибиотическими спектрами. Они подавляют развитие грамположительных и некоторых грамотрицательных бактерий. Резистентность чувствительных микроорганизмов к тилозину проявляется примерно так же, как к эритромицину и пенициллину. Между тилозином и десмикозином установлена перекрестная устойчивость.

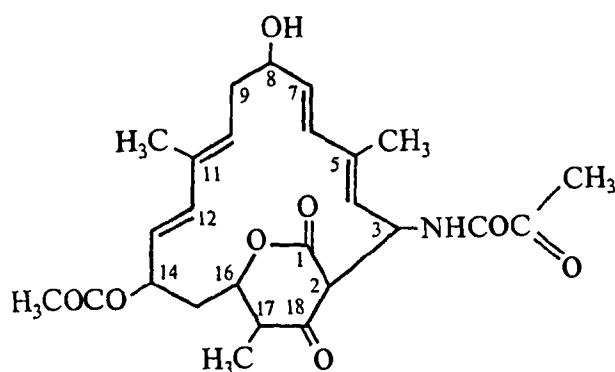
Тилозин подавляет развитие *Micrococcus pyogenes* subsp. *aureus* в концентрации 1,56 мкг/мл. Наибольшая биологическая активность тилозина и десмикозина проявляется при слабощелочной реакции среды (рН 8,0). Антибиотики активны и в опытах *in vivo*. Так, при подкожном введении мышам указанных препаратов в концентрации 1,8–7,4 мг/кг они проявляют лечебное действие в отношении *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus pyogenes* subsp. *aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*.

Тилозин не используется в медицинской практике, но имеет перспективу применения в ветеринарии. Он применяется для консервирования продуктов и в качестве добавок к кормам животных.

Ланкацидины (Lankacidins)

К 17-членным макролидным антибиотикам относятся ланкацидины.

Ланкацидины продуцируются определенным штаммом *Streptomyces violaceoniger*, описанным Гауманном и др. в 1960 г. Данкацидин А имеет следующее строение:



Ланкацидины проявляют высокую антимикробную активность против грамположительных бактерий, микоплазм, *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae* др. бактерий. Ланкацидины А и С наиболее активны при рН 6,0.

Механизм действия макролидных антибиотиков связан с подавлением у чувствительных к ним микроорганизмов РНК-зависимого синтеза белка в результате активации процесса разобще-

ния пептидил-тРНК и рибосом. Эти антибиотики нарушают связь с 50 S субъединицами рибосомы и блокируют ее, в результате чего ослабляются транспептидация и транслокация.

ПОЛИЕНЫ

В группу полиеновых антибиотиков входит большое число противогрибных соединений, образуемых стрептомицетами. Особенностью их строения является наличие в макроциклическом лактонном кольце сопряженных двойных связей. К полиенам относятся нистатин, амфотерицин В, микогептин, леворин и другие соединения.

Нистатин (Nystatin)

Нистатин образуется культурой *Streptomyces noursei*. Впервые он был выделен в 1950 г. И. Хазеном и Р. Брауном.

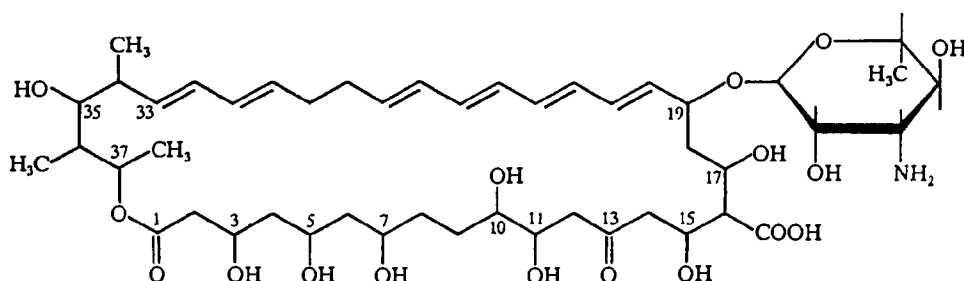
Продуцент нистатина хорошо развивается на средах, содержащих кукурузный экстракт, соевую муку, аммонийные соли (нитраты не использует), крахмал или глюкозу (сахарозу, лактозу, гидрол не потребляет), мел.

Для приготовления посевного материала используют молодые споры стрептомицета, которые развиваются в течение 30–40 ч. В ферментеры вносят посевной мицелий в объеме примерно 10%. Процесс развития стрептомицета и образование нистатина в ферментерах продолжается 80–90 ч при температуре 28 °С.

Развитие микроорганизма и процесс биосинтеза нистатина существенно зависят от концентрации неорганического фосфора в среде. Оптимальная концентрация фосфора при развитии стрептомицета в среде с кукурузным экстрактом 5–6 мг%. Стрептомицет хорошо растет и образует антибиотик на синтетических средах.

В процессе развития стрептомицета нистатин в основной массе накапливается в мицелии. Из обезвоженного мицелия антибиотик экстрагируют метанолом. В ходе биосинтеза образуется комплекс, состоящий из двух биологически активных тетраенов: нистатина А₁ (примерно 73–85%) и нистатина А₂ (около 27–15% от общего количества антибиотика).

Окончательную структуру нистатина установили Чонг и Рикардс в 1970 г. Ниже приведена структурная формула нистатина А₁:



Молекула нистатина содержит макроциклическое лактонное кольцо, названное нистатинолом, соединенное по С₁₉ гликозидной связью с дезоксиаминосахаром (микозамином). Предполагается, что биологическая активность нистатина обусловлена наличием лактонной структуры и конъюгированных ненасыщенных двойных связей.

Нистатин нерастворим в воде, плохо растворим в метаноле, этаноле, бутаноле и диоксане. Хорошо растворим в диметилформамиде, диметилсульфоксиде, пропиленгликоле.

Антибиотик обладает противогрибным действием и не проявляет антибактериальной активности. Ниже приведен антигрибной спектр нистатина:

Гриб	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Alternaria</i> spp.:	1,56
<i>Aspergillus fumigatus</i>	6,25
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	1,60
<i>Candida albicans</i>	3,13
<i>Endomycopsis eibuligera</i>	3,10
<i>Geotrichum lactis</i>	6,20
<i>Histoplasma capsulatum</i>	1,60
<i>Penicillium notatum</i>	3,10
<i>Rhizopus nigricans</i>	3,10
<i>Trichophyton mentagraphytes</i>	6,25

Механизм антимикробного действия этого антибиотика связан с нарушением клеточной мембраны грибов, содержащих холестерол или эргостерол. Антибиотик образует с последним каналы мембран путем комплексообразования, что индуцирует потерю клетками грибов низкомолекулярных соединений. Эргостерол в цитоплазматической мембране грибов контролирует текучесть и целостность мембраны и ее биологические функции.

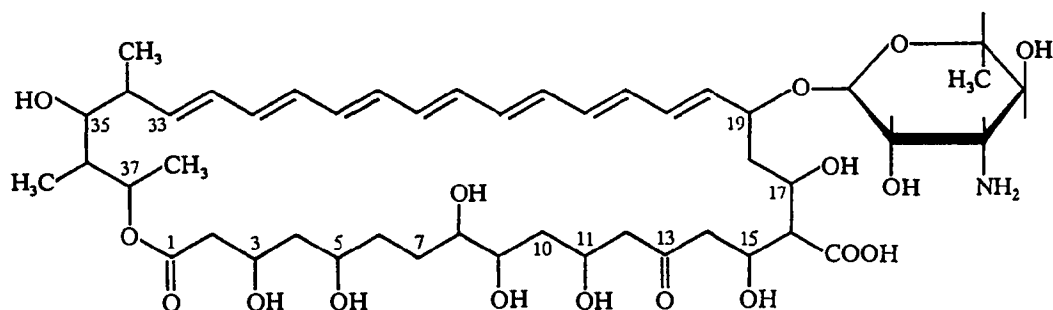
Резистентность к нистатину связана или с отсутствием эргостерола, или с очень низким его содержанием в клетках.

Нистатин может быть использован в медицинской практике для лечения заболеваний, вызываемых *Candida*.

Амфотерицин В (Amphotericin B)

Амфотерицин В продуцируется *Streptomyces nodosus*. Стрептомицет наряду с амфотерицином В, относящимся к подгруппе неароматических гептаенов, вырабатывает также тетраеновый антибиотик амфотерицин А.

Амфотерицин В имеет следующее строение:

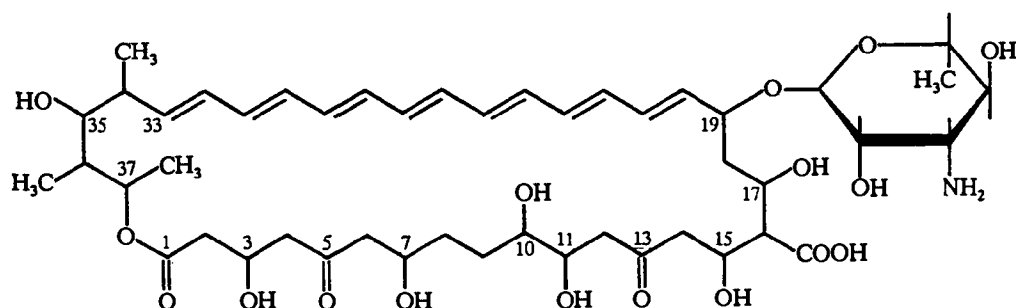


Этот антибиотик подавляет рост дрожжеподобных грибов, дермофитов, мицелиальных грибов, возбудителей глубоких микозов (кокцидиоидоза, гистоплазмоза), а также трихомонад, лямблий, амёб.

Он длительное время применяется в клинике в качестве мощного фунгицидного препарата и рассматривается специалистами как «золотой стандарт». Механизм его биологического действия связан с непосредственным нарушением функции мембран грибной клетки, содержащей эргостерол или холестерол. Амфотерицин В проявляет нефротоксичность, возможны дисфункции нервной системы, что в определенной степени ограничивает его применение в клинике.

Микогептин (Mycogheptin)

Микогептин образуется мутовчатый актиномицетом, относящимся к роду *Streptoverticillum* (*S. mycoheptinum*). Он получен ленинградскими микробиологами В.А. Цыгановым и Ю.Е. Коневым в 1965 г. Микогептин имеет следующее строение:



Актиномицет в процессе жизнедеятельности вырабатывает два полиена: пентаен и гептаен. Первый менее активен, и его синтезируется в 2–3 раза больше, чем гептаена.

Микогептин подавляет рост большого числа грибов, в частности дрожжеподобных грибов рода *Candida*, криптококков*, аспергилл, пеницилл.

* Криптококки (*Cryptococcus*) — патогенные для человека грибы, которые образуют полисахариды, нередко связанные с капсулой. Эти полисахариды проявляют иммунологическую активность.

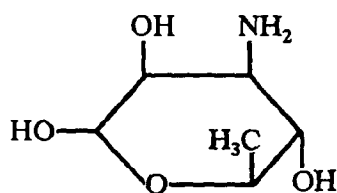
Ценное свойство этого антибиотика — способность подавлять рост *Coccidioides immitis*, являющегося возбудителем кокцидиоидоза — одного из наиболее опасных грибных заболеваний. Антибиотик подавляет рост дерматофитов и трихомонад (простейших). Микогептин, как и другие полиены, — фунгистатик. Он обладает высокой эффективностью при лечении микозов, более эффективен при оральном способе введения, чем амфотерицин В.

Леворин (Levorin)

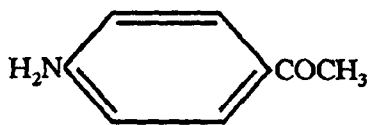
Леворин образуется в процессе развития *Streptomyces levoris*. Стрептомицет — продуцент этого антибиотика — выделен из почвы в 1956 г. В.А. Цыгановым и др.

Леворин относится к группе полиеновых ароматических макролидов, его макролактонное кольцо состоит из полиенового хромофора с семью сопряженными двойными связями (гептаен).

Молекула леворина содержит аminosахар микозамин и ароматический кетон п-аминоацетофенон:



Микозамин



п-Аминоацетофенон

Показано, что п-аминоацетофенон синтезируется в процессе развития стрептомицета из глюкозы, а непосредственным промежуточным соединением его образования является п-аминобензойная кислота. Синтез последней идет через метаболический путь превращения ароматических аминокислот, в частности тирозина.

Уровень связанного с мицелием стрептомицета п-аминоацетофенона в монокультуре *S. levoris* значительно ниже, чем при развитии этого стрептомицета в смешанной культуре с *Candida utilis*. Выход леворина в аналогичном случае также гораздо выше. При внесении в среду п-аминобензойной кислоты биосинтез леворина возрастает незначительно, но повышается синтез свободного аминацетофенона. Добавление предшественника макролидного кольца леворина (ацетата или пропионата) одновременно с п-аминобензойной кислотой увеличивает выход леворина в большей степени, чем добавление каждого из названных веществ в отдельности.

S. levoris в процессе развития образует комплекс антибиотиков, состоящий из пяти гептаенов. Методом противоточного распределения комплекс леворина был разделен на два близких антибиотика — леворин А и леворин В.

Основной компонент промышленного препарата — леворин А — состоит из четырех близких по свойствам гептаеновых антибиотиков: А₀, А₁, А₂ и А₃.

В процессе селекции продуцента леворина был получен штамм стрептомицета с повышенной антибиотической активностью. При этом оказалось, что в мицелии указанного штамма синтезируется второй антибиотик неполиеновой природы — левористатин.

Наиболее благоприятными условиями для образования леворина являются среды, содержащие соевую муку или хлопковый жмых. Добавка цитрата в количестве 5–9 мг/л в 24- и 48-часовую культуру стрептомицета стимулирует биосинтез антибиотика в среднем на 30–40%.

Наряду с другими антибиотиками (нистатином, амфотерицином В, кандицидином, трихомицином) леворин обладает высокой противогрибной активностью, подавляя развитие дрожжей и дрожжеподобных организмов; менее активен он в отношении мицелиальных грибов.

Леворин применяют при заболеваниях, вызываемых дрожжеподобными грибами (при межпальцевых эрозиях, поражениях складок кожи, слизистых оболочек рта, при кандидозе желудочно-кишечного тракта). Для лечения наружных заболеваний леворин употребляют в виде мазей, при лечении желудочно-кишечного тракта — в виде таблеток или капсул. В ряде случаев леворин используют для ингаляций.

МАКРОТЕТРАЛИДЫ (MACROTETRALIDS)

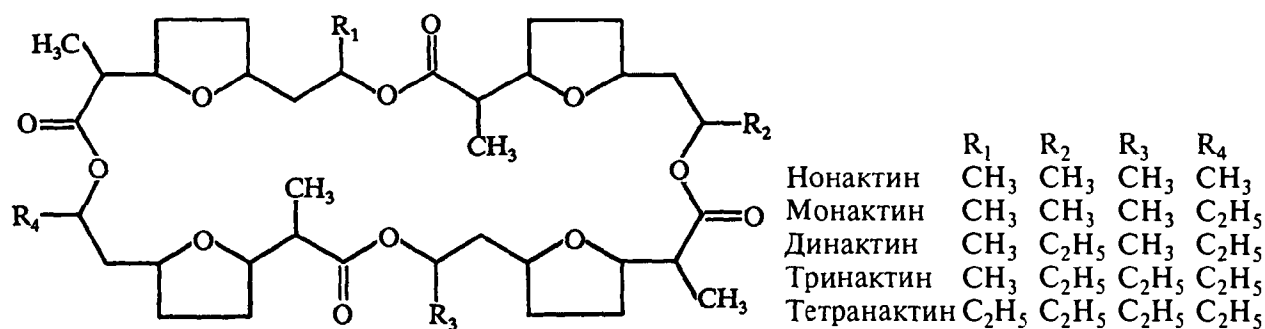
В группу антибиотиков макротетралидов входят вещества, которые представляют собой крупные (32-членные) циклы, включающие четыре простые, четыре сложноэфирные связи и четыре тетрагидрофурановых кольца (см. строение). Биологическое действие этих антибиотиков аналогично действию грамицидинов и ванкомицина.

Первый представитель этой группы антибиотических веществ был выделен Р. Корбазом с соавторами в 1955 г. из мицелия *Streptomyces viridochromogenes* и назван н о н а к т и н о м (авторам не удалось обнаружить его антимикробных свойств, так как соединение не растворяется в воде).

При установлении структуры нонактина было показано, что мицелий актиномицета-продуцента содержит несколько гомологич-

ных соединений, в которых один или несколько метильных радикалов заменены на этильные.

Строение антибиотиков группы макротетралидов можно представить следующей общей формулой:



Макротетралиды относятся к циклическим полиэфирам. Это нейтральные, оптически неактивные бесцветные кристаллические гидрофобные вещества, хорошо растворимые в органических растворителях (ацетон, спирты, эфиры, хлороформ) и почти нерастворимые в воде. Последнее свойство затрудняет определение их антимикробного действия и служит препятствием, несмотря на низкую токсичность, для медицинского применения этой группы антибиотиков.

Описано около 20 видов стрептомицетов, образующих в процессе развития макротетралиды, среди которых основными про-

Таблица 60

Антибактериальная активность нонактина и его аналогов

Макротетралид	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
Нонактин	0,95	0,96
Монактин	0,08	0,12
Динактин	0,005	0,04
Тринактин	0,04	0,04

дукентами можно назвать *S. viridochromogenes*, *S. griseus*, *S. chryzomallus*.

При правильном подборе растворителей группы этих антибиотиков они проявляют антимикробную и цитостатическую активность. Они, в частности, подавляют развитие стафилококков (в том числе устойчивых к

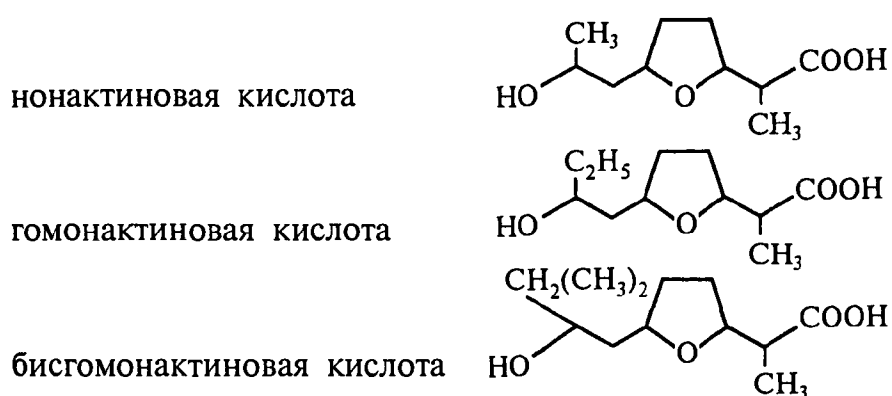
пенициллину, стрептомицину, эритромицину), гемолитического стрептококка, микобактерий и некоторых других организмов. Антибиотическая активность наименьшая у нонактина и повышается с увеличением числа этильных радикалов у других гомологов (табл. 60).

Вместе с тем макротетралиды обладают инсектицидной активностью, что позволило применять их для обработки рисовых плантаций в Японии.

По механизму биологического действия макротетралиды относятся к мембраноактивным соединениям, нарушающим проницаемость мембран, они способствуют транспорту определенных ионов в клетку, аккумулируя там катионы, и, как следствие, могут индуцировать набухание митохондрий, нарушать окислительное фосфорилирование. Они вызывают индукцию гидролиза АТФ, стимулируют процессы дыхания.

Первичным звеном механизма биологического действия макротетралидов является нарушение направленного транспорта катионов мембранами клетки. По всей вероятности, макротетралиды выполняют функцию регуляторов концентрации ионов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} в клетках продуцентов этих антибиотиков.

В процессе развития *S. chrysomallus* subsp. *macrotetralidi* в лаг-период в клетках стрептомицета обнаруживаются вещества нактиновой природы — олигомеры нактиновых кислот, являющиеся ближайшими предшественниками биосинтеза макротетралидов. К ним относятся:



Эти соединения обладают ионоформными свойствами, невысокой антибиотической активностью. В начальной фазе роста стрептомицета количество названных олигомеров в клетках остается практически постоянным. В клетках стрептомицета происходит активное взаимодействие между олигомерами нактиновых кислот и неорганическими катионами (Na^+ , K^+ и Ca^{2+}). Олигомеры регулируют ионный состав клеток, снижая или повышая внутриклеточное содержание катионов.

Образование молекулы макротетралида в клетках *Streptomyces griseus* происходит так же, как и биосинтез макролидных антибиотиков, тетрациклинов, т.е. через поликетидный механизм (см. схему на с. 284).

В последние годы разработаны методы химического синтеза нонактина с высоким выходом конечного продукта (Ли, Ким, 1995).

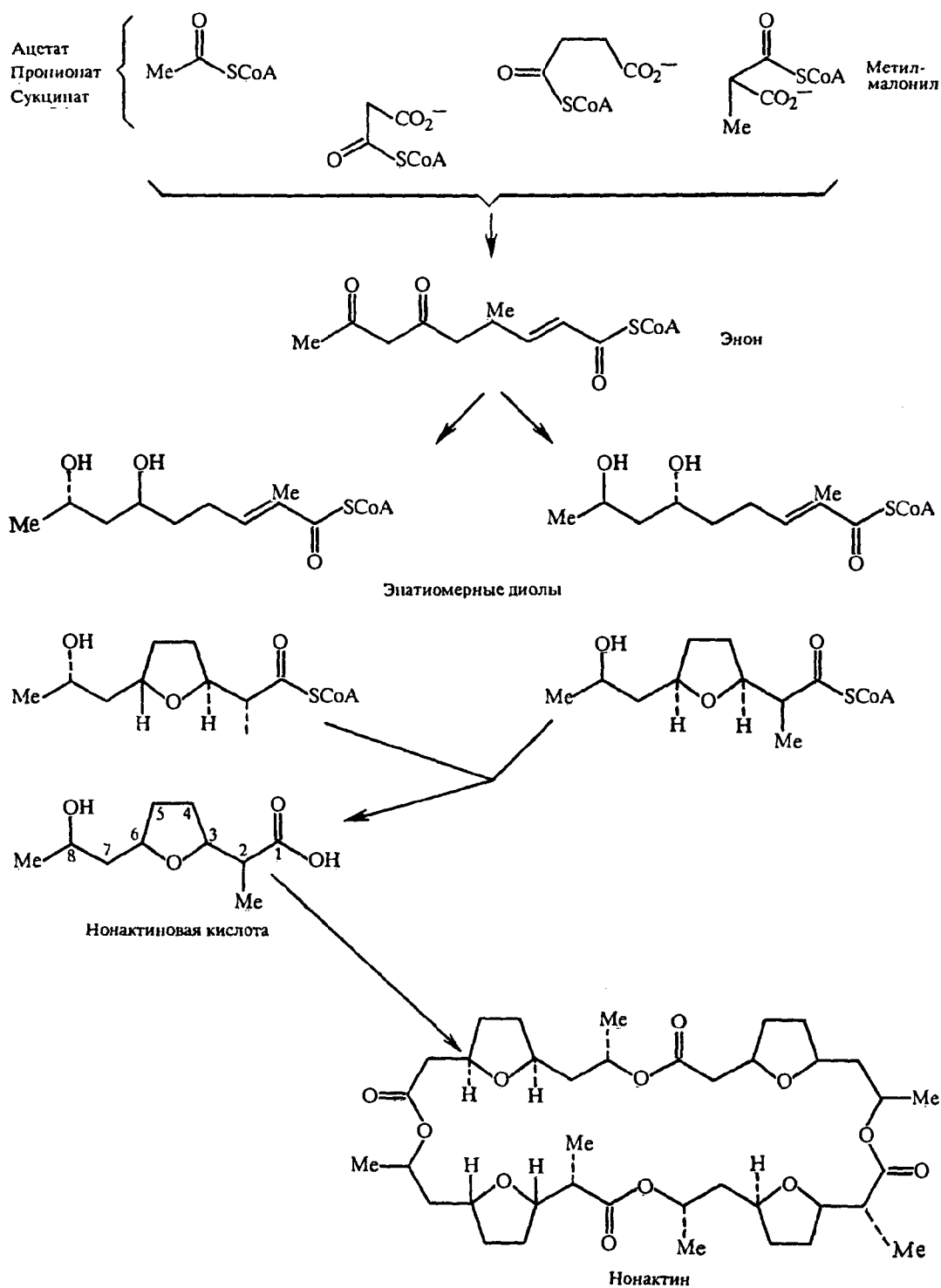


Схема биосинтеза молекулы макротетралида
(no Ashworth et al., 1989)

Макротетралиды — активные ионофоры, используемые в качестве инструмента при изучении проницаемости искусственных и естественных мембран. Специфическая структура этих соединений определяет их способность образовывать комплексы с рядом однозарядных катионов: аммонием, калием, натрием, таллием, рубидием, цезием при большой избирательности к ионам аммония.

Транспорт через искусственные и естественные мембраны одновалентных ионов с участием макротетралидов происходит с различной степенью эффективности: $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+$.

Это свойство, а также плохая растворимость макротетралидов в воде послужили основой для использования их при производстве аммонийселективных электродов, в искусственные мембраны которых макротетралиды включают в качестве специфических датчиков. Гомологичные отличия при этом значения не имеют.

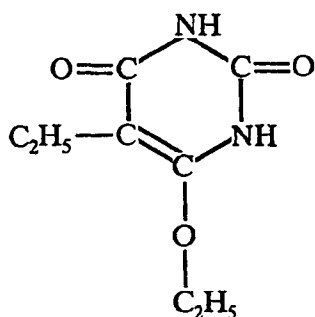
РИФАМИЦИНЫ (RIFAMYCINS)

Рифамицины относятся к группе макролактамных антибиотиков, которые вырабатываются стрептомицетами (стрептоварицины), нокардиями (рифамицины), микромоноспорами (галомицин), а также высшими растениями (майтанзин).

Из культуры *Nocardia mediterranei* n. sp. в 1959 г. П. Сенси с соавторами выделили противобактериальный антибиотик р и ф а м и ц и н. По современной номенклатуре производитель рифамицинов относится к *Amycolatopsis (Nocardia) mediterranei*.

При развитии актиномицета в натуральной среде, содержащей кукурузный экстракт, соевую муку и другие компоненты, одновременно образуется не менее пяти антибиотиков — рифамицины А, В, С, D и Е. Эта смесь антибиотических веществ, которая весьма нестабильна, получила название рифамицинового комплекса. В комплексе наиболее стабильный компонент — рифамицин В (кислота).

Мутант, полученный из исходной культуры *A. mediterranei*, способен синтезировать преимущественно рифамицины С и D. Если к питательной среде, в которой развивается мутант, добавить барбитал (диэтилбарбитурат натрия)

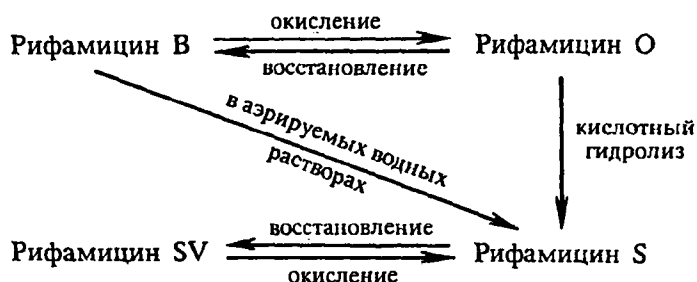


в концентрации 0,2%, то продуцируется почти чистый рифамицин В.

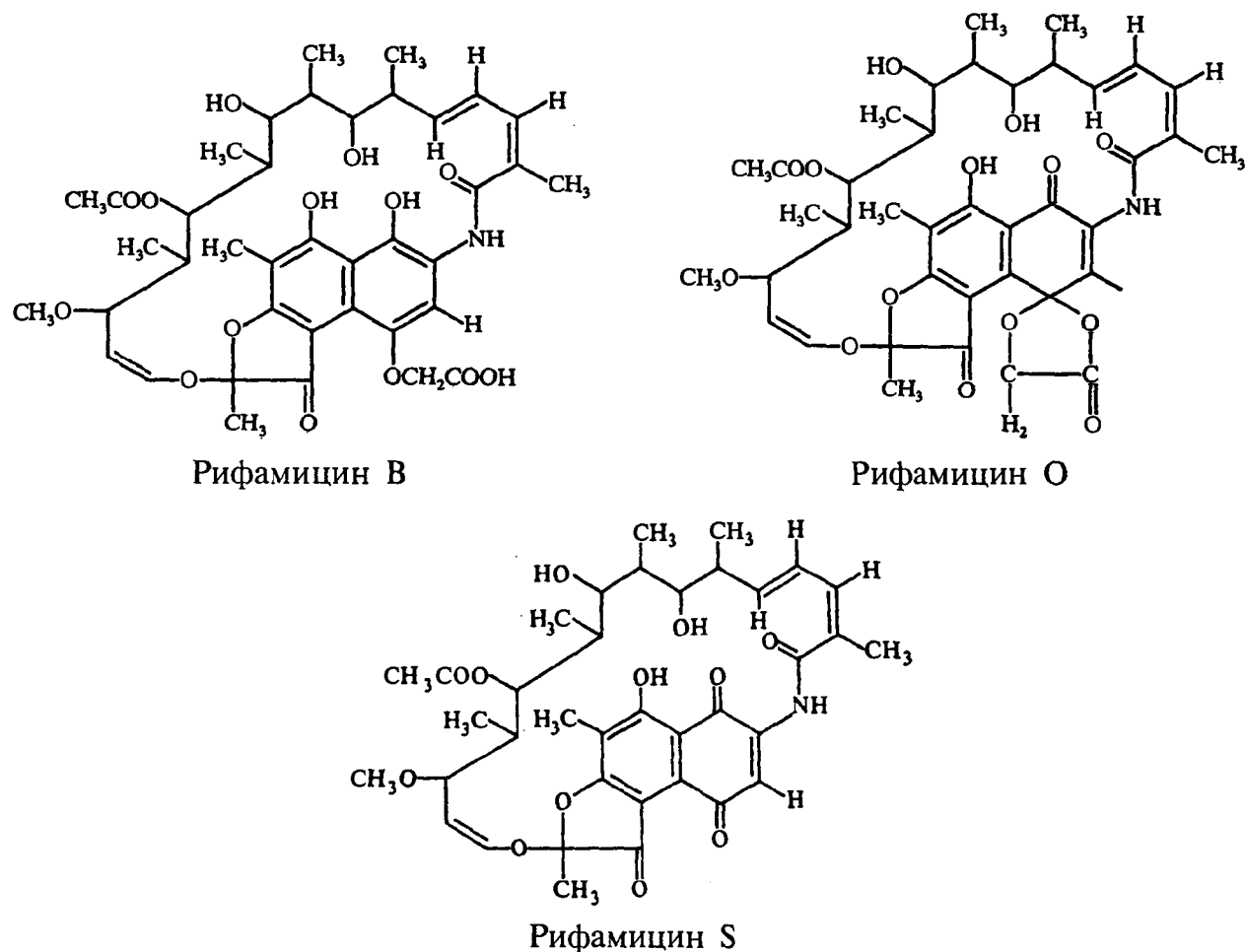
Водный раствор рифамицина В в условиях аэрации превращается в новое производное — рифамицин S; последний обладает значительно большей биологической активностью *in vivo* и *in vitro*, чем рифамицин В. Промежуточным продуктом «активации» рифамицина В будет рифамицин О, который под влиянием ряда восстанавливающих веществ (аскорбиновая кислота и др.) может вновь превращаться в рифамицин В.

Рифамицин S — высокоактивный препарат по отношению к грамположительным бактериям и *Mycobacterium tuberculosis*. Он может использоваться для профилактики менингококковых заболеваний и менингитов, вызываемых *Haemophilus influenzae*. Рифамицин S легко восстанавливается с образованием рифамицина SV.

Взаимосвязь между различными формами рифамицина представлена на схеме (по Prelog, 1964):



Установлено химическое строение всех четырех вариантов рифамицина. Их структура необычна и резко отличается от структуры других известных антибиотических веществ:



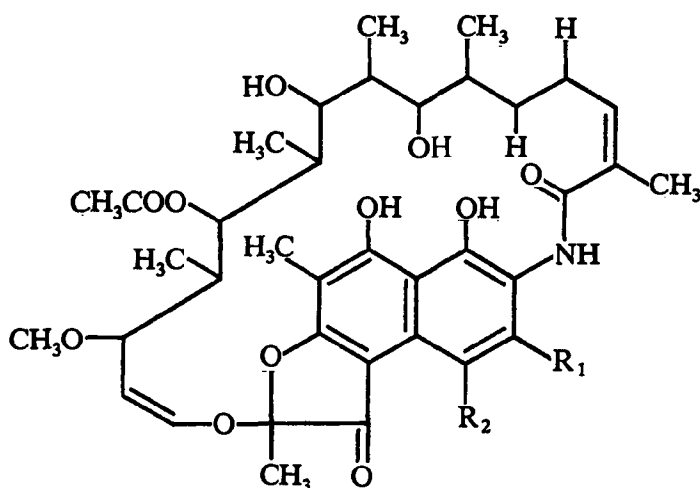
По характеру алифатической части рифамицин SV напоминает макролиды. Строение рифамицинов дает основание предполагать, что основой их биогенеза служат уксусная и пропионовая кислоты.

Наиболее биологически активный и ценный вариант — рифамицин SV; он весьма активен в отношении грамположительных

бактерий (минимальная концентрация, подавляющая развитие *Staphylococcus aureus*, *S. haemolyticus* и др., 0,005–0,0025 мкг/мл), *Mycobacterium tuberculosis* (минимальная концентрация, угнетающая его развитие, 0,05 мкг/мл). Рифамицин SV подавляет развитие и грамтрицательных форм бактерий, но в значительно более высоких концентрациях (25–250 мкг/мл). Препарат не действует на грибы. Относительно плохо растворим. Ценное свойство рифамицина SV — способность подавлять развитие грамположительных форм бактерий, приобретших устойчивость к другим антибиотикам (пенициллину, эритромицину, новобиоцину, олеандомицину, стрептомицину). У него не обнаружено перекрестной устойчивости с другими противотуберкулезными антибиотиками. Рифамицин SV имеет низкую токсичность.

Основа механизма биологического действия рифамицинов, и прежде всего рифамицина SV, — подавление бактериальной РНК-полимеразы.

В результате химической модификации рифамицина SV удалось получить полусинтетические препараты рифампицин (рифампин) и рифамид с более ценными свойствами по сравнению с исходным антибиотиком:



Рифамицин SV: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OH}$

Рифампицин (рифампин): $R_1 = \text{—CH=N—N—CH}_3$; $R_2 = \text{OH}$

Рифамид: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{—OCH}_2\text{CON(C}_2\text{H}_5)_2$

Рифампицин и рифамид — ценные антибиотические препараты, применяемые в медицинской практике для борьбы с туберкулезом и инфекциями, вызываемыми грамположительными бактериями. В табл. 61 приведен антимикробный спектр некоторых форм рифамицина.

В результате химической модификации природного рифамицина S получены два перспективных препарата. Первый — рифабутин (спиропиперидилрифамицин S) — обладает широким спектром антимикробной активности. Он особенно активен в

Антимикробный спектр наиболее ценных препаратов рифамицина
(данные из *Betina, 1983*)

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл		
	Рифамицин SV	Рифамид	Рифампицин
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,05	0,1	0,02
<i>Streptococcus faecalis</i>	0,5	1,0	0,1
<i>S. pyogenes</i>	0,02	0,1	0,2
<i>S. pneumoniae</i>	0,25	0,2	0,1
<i>Neisseria gonorrhoea</i>	—	0,5	0,2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	260	200	50
<i>Escherichia coli</i>	500	100	10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	500	500	100
<i>Proteus vulgaris</i>	250	200	50
<i>Salmonella typhi</i>	1000	200	50
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,5	2	5

отношении микобактерий. Этот антибиотик показал ценные свойства при лечении больных туберкулезом.

Второй полусинтетический препарат, полученный на основе рифамицина S, получил название анзамидина. В последнее время широкий интерес к этому препарату проявляется в США в связи с тем, что он оказался активным в отношении *Mycobacterium aviumintracellulare*. Микроб относительно устойчив к имеющимся химиотерапевтическим препаратам и поражает многих людей с синдромом приобретенного иммунодефицита (СПИД). Анзамидин обладает более высокой антибактериальной активностью, чем рифампицин (рифампин), по отношению к *M. tuberculosis*, включая штаммы, устойчивые к стрептомицину или рифампицину.

Семейство антибиотиков-хинонов

В составе этого семейства рассмотрим группы линейных конденсированных полициклических антибиотиков (тетрациклины), нафтохинонов (антрациклины) и бензохинонов.

ТЕТРАЦИКЛИНЫ

В группу антибиотиков тетрациклинового ряда входят вещества, имеющие близкое химическое строение. Тетрациклиновые антибиотики привлекли большое внимание исследователей благодаря их важному практическому значению. Эти соединения обладают широким антибиотическим спектром в отношении

грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий и успешно применяются в медицинской практике. Кроме того, некоторые из этих антибиотиков используются в животноводстве как стимуляторы роста сельскохозяйственных животных и птиц. Ценность тетрациклиновых антибиотиков определяется их высокой биологической активностью и относительно низкой токсичностью.

Эта группа антибиотиков до настоящего времени сохраняет важное значение при лечении заболеваний дыхательных путей и инфекций, вызываемых возбудителями, устойчивыми к другим антибиотикам: хламидиями, риккетсиями, спирохетами, микоплазмами. Тетрациклины играют существенную роль в профилактике и лечении холеры.

В мире промышленностью выпускается примерно 5 тыс. т тетрациклинов на общую сумму около 135 млн долларов. При этом необходимо заметить, что тенденции к увеличению выпуска тетрациклиновых антибиотиков не наблюдается. Это означает, что потребность в них полностью удовлетворяется.

К тетрациклиновым антибиотикам, в основном образуемым в процессе биосинтеза тремя микроорганизмами (*Streptomyces aureofaciens*, *S. rimosus*, *Nocardia sulphurea*), относится более 30 соединений. На их основе получен ряд полусинтетических препаратов, нашедших применение в медицинской практике.

К наиболее широко известным тетрациклиновым антибиотикам принадлежат тетрациклин, 6-деметилтетрациклин, 7-хлортетрациклин, 7-хлор-6-деметилхлортетрациклин, 7-бромтетрациклин, 5-окситетрациклин, а также метациклин, доксициклин и миноциклин, полученные в результате химической модификации молекулы окситетрациклина. Первым был открыт 7-хлортетрациклин, с которого мы и начнем рассмотрение этой группы антибиотических веществ.

Хлортетрациклин (Chlortetracyclin)

В 1948 г. из почв штата Миссури Б. Дуггаром был выделен новый вид стрептомицета — *Streptomyces aureofaciens*, образующий антибиотик ауреомицин. Свое наименование ауреомицин получил по видовому названию продуцента этого антибиотика и золотистой окраске кристаллического продукта. Затем этому антибиотику, исходя из его химического строения, было дано общепринятое название — хлортетрациклин. В промышленности хлортетрациклин выпускается под названиями «биомицин», «ауреомицин» и «дуомицин».

S. aureofaciens — аэробный организм, хорошо развивающийся при температуре 26–28 °С как на твердых агаризованных, так и в жидких средах.

Кроме хлортетрациклина этот организм в значительном количестве (до 0,5–0,7 мкг/мл) образует витамин В₁₂, тетрациклин, а также некоторые другие антибиотические вещества.

Условия образования хлортетрациклина

В составе сред для образования хлортетрациклина могут быть использованы различные источники углерода (сахароза, мальтоза, глюкоза, крахмал или другие водорастворимые углеводы).

Для получения кормовых препаратов хлортетрациклина рекомендуется использовать в качестве источника углерода в среде гидролизованную в течение часа картофельную мезгу (продукт отхода картофельно-крахмальных заводов).

Среди источников углерода, обеспечивающих хороший рост стрептомицета и образование хлортетрациклина, наилучшим считается глюкоза, которая почти полностью потребляется организмом через 40–45 ч развития. В качестве источников углерода *S. aureofaciens* использует также жиры, некоторые органические кислоты (например, молочную), добавление которых к среде с кукурузным экстрактом способствует повышению образования хлортетрациклина, а также крахмал и глицерин. Лактоза, сахароза, галактоза и арабиноза некоторыми штаммами стрептомицета не используются.

В качестве источников азота, благоприятно действующих на развитие микроорганизм и биосинтез антибиотика, могут применяться аммонийные соли, некоторые аминокислоты, а также различные азотсодержащие вещества растительного и животного происхождения (кукурузный экстракт, мясной экстракт, соевая мука и др.).

Обычно для получения хлортетрациклина используют среду следующего состава (%):

Сахароза	3,0
Кукурузный экстракт	1,0
СаСО ₃	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2
NH ₄ Cl	0,1

Лучшим начальным рН является 6,0–7,0. Длительность процесса развития актиномицета, в течение которого антибиотик образуется в максимальном количестве, составляет 30–40 ч.

При культивировании *S. aureofaciens* в среде с соевой мукой, кукурузным экстрактом и углеводами стимулирующее влияние

на выход хлортетрациклина оказывают отдельные аминокислоты. Наибольшее стимулирующее действие на биосинтез антибиотика оказывают валин, оксипролин и тирозин.

В процессе развития продуцента антибиотика в среде изменяется содержание аминокислот: примерно к 15-му часу явно уменьшается масса основных аминокислот, а концентрация глутаминовой кислоты понижается незначительно; к 20-му часу наблюдается падение количества аспарагиновой кислоты. Интенсивный биосинтез антибиотика происходит после заметного падения содержания в среде основных аминокислот.

Существенное значение на ход развития продуцента и биосинтеза хлортетрациклина оказывает состав среды, на которой выращивается посевной материал стрептомицета. Образование антибиотика культурой *S. aureofaciens* зависит не только от состава посевной среды, но и от ее начального рН.

На выход антибиотика большое влияние оказывает также возраст посевного мицелия стрептомицета и среда, применяемая для образования антибиотика; выработка хлортетрациклина значительно снижается, если инокулят выращивается более 30 ч (табл. 62).

Таблица 62

Влияние возраста инокулята и состава среды на биосинтез хлортетрациклина
(по Макаревич, Лазниковой, 1961)

Среда для образования антибиотика	Возраст инокулята, ч		
	24	30	44
	Количество хлортетрациклина, мкг/мл		
Кукурузная	1710	1650	1590
Кукурузная (обогащенная)	3040	3260	2660
Арахисовая	4045	3660	3530
Подсолнечная	4120	4030	3555

Данные, приведенные в табл. 62, свидетельствуют о том, что оптимальный возраст посевного мицелия находится в пределах 24–30 ч. Количество посевного материала, обеспечивающее высокий уровень биосинтеза хлортетрациклина, должно составлять 5–6 об.%. Влияние посевной среды сказывается не только на образовании антибиотика, но и на всем процессе обмена веществ стрептомицета, что, в свою очередь, отражается на характере и скорости потребления углеводов, окислительной способности мицелия, продуцировании органических кислот и самом характере биосинтеза антибиотика.

Существенную роль в биосинтезе хлортетрациклина играет фосфор, заметно влияя на рост и развитие стрептомицета. При

добавлении к среде фосфата калия K_2HPO_4 резко изменяется обмен веществ стрептомицета: усиливается потребление сахара и аммония, снижается активная кислотность субстрата, в среде накапливается пировиноградная кислота. Рост мицелия вначале ускоряется, но после использования аммиака замедляется; образование антибиотика подавляется, причем это подавление значительно сильнее угнетения роста биомассы микроорганизма. Некоторые данные по влиянию различных концентраций фосфора на рост стрептомицета и образование хлортетрациклина приведены в табл. 63 (см. также рис. 35).

Таблица 63

Изменения роста, образования антибиотика и содержания нуклеиновых кислот в культуре *S. aureofaciens* в зависимости от концентрации фосфора
(no Biffi, Borreti et al., 1954)

K_2HPO_4 , %	Увеличение количества мицелия за период от 24-го до 48-го ч, %	Количество антибиотика, %	Количество мицелия через 48 ч, %	РНК, мкг/мл		ДНК, мкг/мл	
				через 24 ч	через 48 ч	через 24 ч	через 48 ч
0	48	100	100	495	380	105	140
0,3	29	50	83	720	510	130	165
0,5	11,5	21	68	900	780	160	190

Избыток фосфора в среде определенным образом сказывается на содержании нуклеиновых кислот в мицелии стрептомицета, а также тормозит окисление пировиноградной кислоты, которая в результате этого накапливается в культуральной жидкости. Избыток ортофосфата в среде угнетающе действует на поглощение кислорода отмытым мицелием *S. aureofaciens*. Мицелий, выросший на среде с 15 мг% фосфора, имел более высокую окислительную способность, чем мицелий, выросший при избытке фосфора (35 мг%).

Наиболее заметное действие фосфора на биосинтез антибиотика наблюдается в первую фазу развития продуцента, в период интенсивного роста организма и бурно протекающей синтетической деятельности. В этот период развития актиномицета избыток фосфора способствует значительному увеличению содержания нуклеиновых кислот в мицелии микроорганизма.

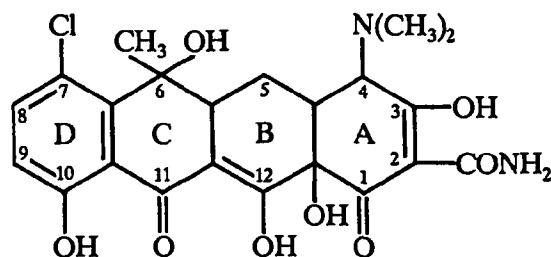
При внесении фосфора в среду в период замедленного роста стрептомицета, сопровождающегося затуханием синтетической деятельности, снижение биосинтеза антибиотика относительно невелико. В данных условиях фосфор в мицелии накапливается в виде лабильных и стабильных форм фосфорных соединений с образованием больших количеств волютина.

Оптимальная концентрация фосфора в среде, обеспечивающая наибольший выход хлортетрациклина, составляет 50–100 мкг/мл и зависит от штамма стрептомицета, состава среды, и в первую очередь от концентрации углеводов в ней. Чем выше процент сахаров в среде, тем более высокая концентрация фосфора необходима для такой среды.

В среде с 1%-м кукурузным экстрактом содержится около 80 мкг/мл фосфора, что вполне достаточно для нормального роста актиномицета и биосинтеза антибиотика.

Химическое строение хлортетрациклина

Впервые химическое строение хлортетрациклина установили в 1952 г. Стефенс с сотрудниками:



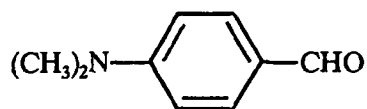
Структура молекулы хлортетрациклина показывает, что антибиотик имеет систему четырех линейных конденсированных 6-членных колец.

Хлортетрациклин слабо растворим в обычных органических растворителях, растворим в воде (0,55 мг/мл при 25 °С) и нерастворим в эфире.

Биосинтез антибиотика

В ряде лабораторий мира изучалось большое число веществ в целях выяснения их стимулирующего действия на биосинтез хлортетрациклина.

Исходя из строения молекулы хлортетрациклина нами в 1959 г. был предложен в качестве стимулятора биосинтеза этого антибиотика близкий по структуре циклу А хлортетрациклина п-диметиламинобензоальдегид:



Действительно, п-диметиламинобензоальдегид, добавленный к синтетической среде в количестве 100 мкг/мл, увеличивает биосинтез хлортетрациклина культурой *S. aureofaciens* в среднем на 40%. При этом показано, что данное вещество существенно не влияет на физиологические показатели культуры стрептомицета, потребление источников азота и углерода, на изменение рН и rH₂ среды,

накопление биомассы (рис. 34). Следовательно, *p*-диметиламинобензоальдегид специфически действует именно на процесс биосинтеза молекулы хлортетрациклина.

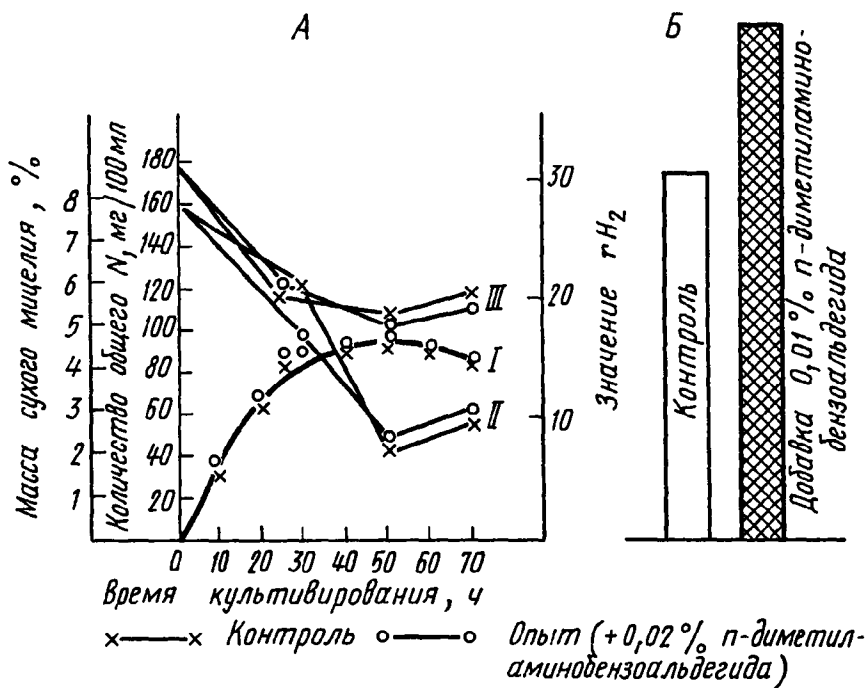
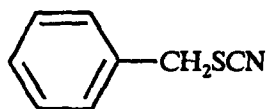


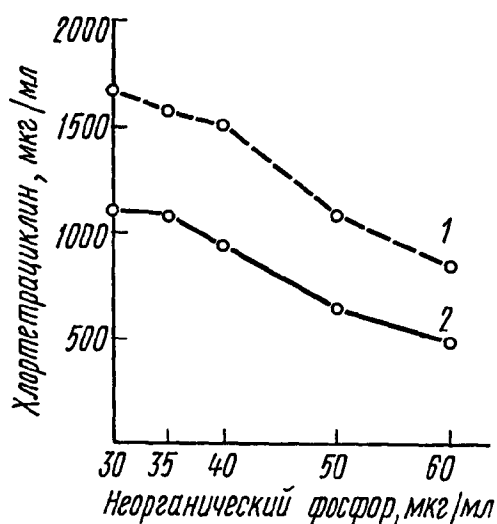
Рис. 34. Влияние *p*-диметиламинобензоальдегида на рост *Streptomyces aureofaciens*, потребление азота и изменение гN₂ среды (А), а также на образование хлортетрациклина (Б) (по Егорову, Барановой, 1959). I — биомасса, II — общий азот, III — гN₂

Л. Велвард и Д. Галяма в 1974 г. подтвердили, что *p*-диметиламинобензоальдегид в концентрации 4 мкг/мл стимулирует биосинтез хлортетрациклина и высокоактивным производственным штаммом *S. aureofaciens* NMU. Одновременно с этим содержание хлортетрациклина в смеси тетрациклиновых антибиотиков повышается с 86,5 до 88–100%.

Специфически стимулирует биосинтез хлортетрациклина и роданистый бензил:



Это соединение в концентрации $1 \cdot 10^5$ М способствует повышению выхода антибиотика (штаммы В и G *S. aureofaciens*) почти на 200% по сравнению с контролем.



Повышение концентрации фосфора в среде приводит к снижению биосинтеза хлортетрациклина в среде как содержащей, так и не содержащей роданистый бензил (рис. 35). Следовательно, роданистый бензил не устраняет угнетающего действия избытка фосфата

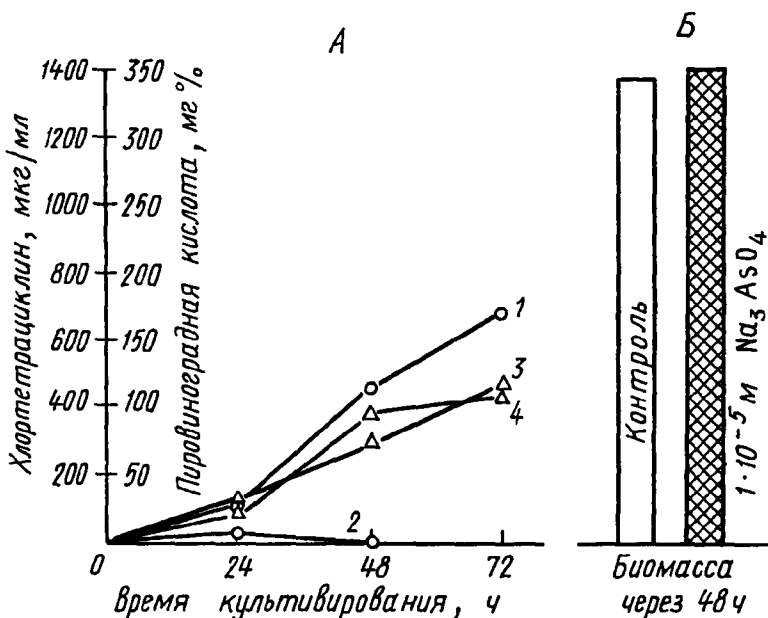
Рис. 35. Зависимость образования хлортетрациклина от содержания фосфора и роданистого бензила в среде (по Гоштялек и др., 1959): 1 — среда с $2 \cdot 10^{-5}$ М роданистого бензила, 2 — среда без роданистого бензила

на биосинтез хлортетрациклина. Стимулирующее действие его проявляется лишь в условиях нормального развития стрептомицета и нормально протекающей биосинтетической деятельности.

Железо снижает биосинтез хлортетрациклина, что, по-видимому, обусловлено способностью ионов железа образовывать с антибиотиком комплекс, который связывается с клетками продуцента, что, в свою очередь, тормозит биосинтез антибиотика.

Рис. 36. Влияние арсенита натрия ($1 \cdot 10^{-5}$ М) на биосинтез хлортетрациклина (А) и развитие *Streptomyces aureofaciens* (Б) (по Барановой, Егорову, 1963):

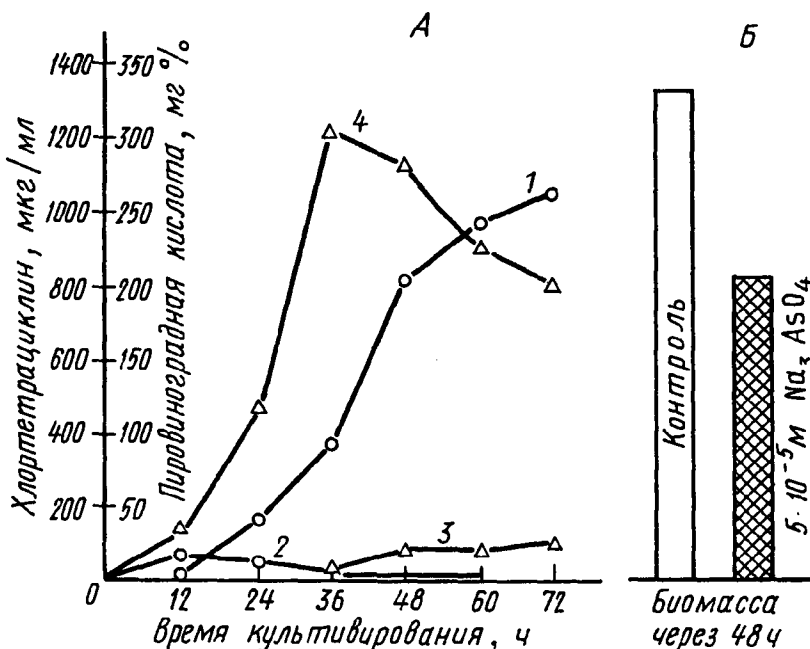
1 — хлортетрациклин (контроль), 2 — пировиноградная кислота (контроль), 3 — хлортетрациклин (среда с As), 4 — пировиноградная кислота (среда с As)



Изучение физиологического механизма биосинтеза молекулы хлортетрациклина позволило заметить ряд интересных закономерностей. В процессе развития стрептомицета на синтетической среде, где в качестве источника углерода использовалась глюкоза, методом хроматографии на бумаге был обнаружен ряд органических кислот: уксусная, пировиноградная, янтарная, молочная, α -кетоглутаровая, яблочная и др. Вместе с тем каких-либо закономерностей в образовании этих кислот и в изменении их содержания в среде в ходе развития стрептомицета установить не удалось. Исключением из этого факта была пировиноградная кислота.

Из рис. 36, 37 видно, что в первой фазе развития стрептомицета (до 23 ч) она максимально накапливается в среде, антибиотик образуется в небольшом коли-

Рис. 37. Влияние арсенита натрия ($5 \cdot 10^{-5}$ М) биосинтез хлортетрациклина (А) и развитие *Streptomyces aureofaciens* (по Барановой, Егорову, 1963). Обозначения см. на рис. 36



честве. Во второй фазе количество пировиноградной кислоты снижается, но одновременно с этим резко возрастает биосинтез хлортетрациклина. Таким образом, падение количества пировиноградной кислоты в среде сопровождается увеличением концентрации антибиотика.

Учитывая эту закономерность, мы решили затормозить превращение кислоты в культуре стрептомицета с помощью арсенита натрия (мышьяковистокислый натрий), который, как известно, специфически блокирует процесс окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты, и проследить дальнейший процесс биосинтеза хлортетрациклина. С повышением концентрации арсенита натрия образование антибиотика резко снижается (табл. 64). Вместе с тем повышение концентрации арсенита натрия тормозит и развитие стрептомицета.

Таблица 64

Влияние различных концентраций арсенита натрия на биосинтез хлортетрациклина

(по Барановой, Егорову, 1963)

Количество антибиотика	Концентрация Na_3AsO_4 , М					
	0	$1 \cdot 10^{-5}$	$5 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$
мкг/мл	810	510	135	57	25	10
% от контроля	100	63	17	7	3	1,1

При концентрации арсенита натрия в среде, равной $1 \cdot 10^{-5}$ М, биосинтез антибиотика к 48–72-му часу развития составляет около 65% от контроля. Однако такая концентрация арсенита практически не влияет на рост стрептомицета. Присутствие арсенита в субстрате резко тормозит дальнейшее превращение пировиноградной кислоты; накопление ее в среде достигает 110 мг%. В контроле пировиноградная кислота практически отсутствует (см. рис. 36).

Увеличение концентрации мышьяковистокислого натрия в 5 раз весьма резко тормозит включение в обмен стрептомицета пировиноградной кислоты, которая в результате этого в значительно большем количестве (до 300 мг%) накапливается в среде (см. рис. 37). В связи с этим биосинтез хлортетрациклина резко снижен и количество антибиотика составляет всего 8% от контроля.

Все это указывает на то, что в процессе биосинтеза молекулы хлортетрациклина существенную роль играет превращение пировиноградной кислоты в уксусную.

Известно, что при избытке фосфора в среде также нарушается углеродный обмен, в результате чего в субстрате накапливается пировиноградная кислота и значительно снижается образование антибиотика. Наши результаты (табл. 65) подтвердили эти выводы.

Влияние концентрации фосфора (KH_2PO_4) в среде на рост стрептомицета и биосинтез хлортетрациклина
(по Барановой, Егорову, 1963)

Концентрация фосфора в среде, мг%	Время культивирования, ч	Масса сухого мицелия, мг%	Пировиноградная кислота, мг%	Количество антибиотика	
				мкг/мл	% к контролю
5 (контроль)	24	875	2,6	160	100
	48	790	—	720	100
	72	750	—	800	100
15	24	810	20	60	37
	48	666	2	235	32
	72	655	2	204	25
25	24	838	24	60	37
	48	695	2	110	15
	72	680	2	120	15
35	24	770	30	60	37
	48	682	2	60	8
	72	668	2	80	10

Избыток фосфора в среде не влияет на рост стрептомицета, но резко снижает выход антибиотика. Снижение образования антибиотика прямо пропорционально концентрации фосфора.

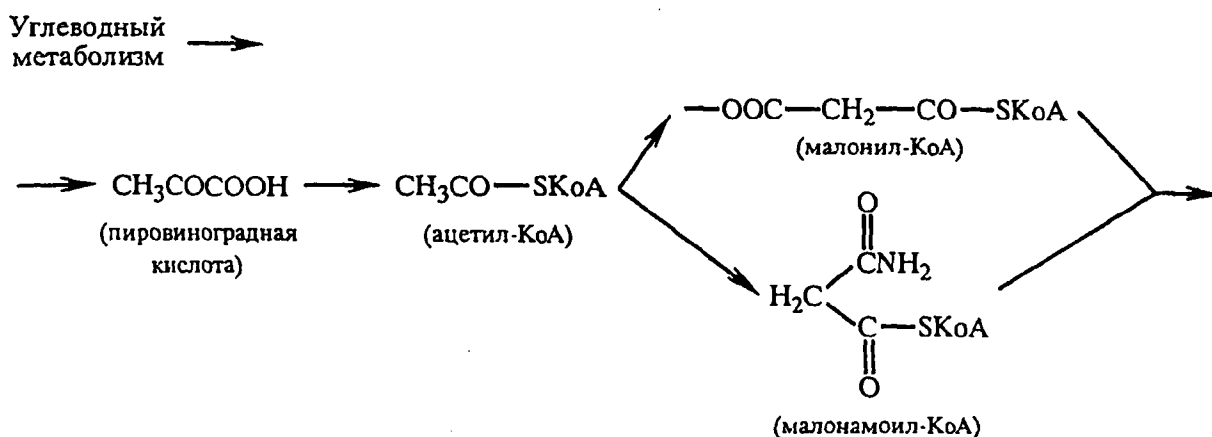
Сравнение динамики изменения содержания пировиноградной кислоты в среде при избытке фосфора и арсенита натрия в субстрате показывает, что в первом случае пировиноградная кислота накапливается в субстрате в первую фазу развития стрептомицета (до 24 ч), а затем ее содержание резко падает, тогда как при наличии в среде арсенита натрия количество пировиноградной кислоты возрастает в ходе развития стрептомицета, достигая к 72-му часу роста 100–260 мг%.

Непосредственные опыты по влиянию арсенита натрия на окислительное декарбоксилирование пировиноградной кислоты отмытым от среды мицелием *S. aureofaciens* продемонстрировали, что в присутствии этого ингибитора (например, при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М) окисление кислоты мицелием прекращается. Следовательно, блокирование участия пировиноградной кислоты, образующейся в процессе жизнедеятельности стрептомицета, в обмене продуцента хлортетрациклина блокирует образование антибиотика.

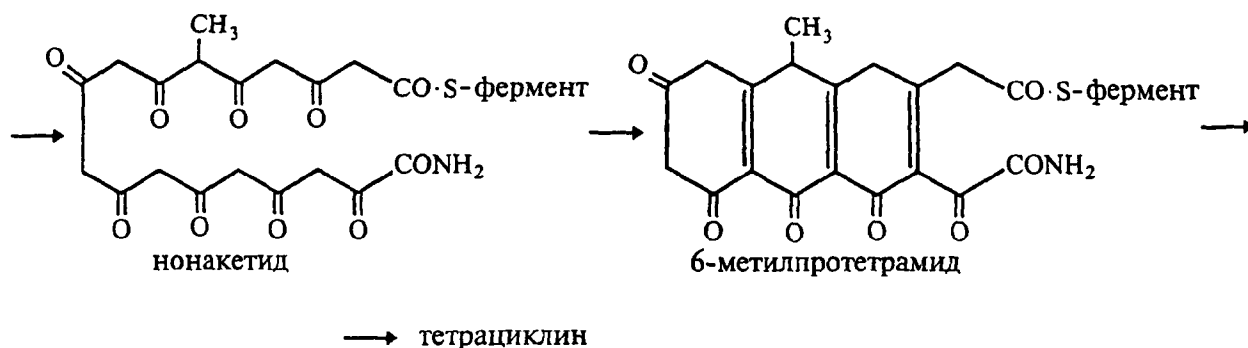
Согласно гипотезе, высказанной П. Робинсоном (1955) и Р. Вудвордом (1956), биосинтез молекулы тетрациклинов осуществляется в результате конденсации и последующей циклизации девяти молекул уксусной кислоты. Работами ряда авторов показана возможность непосредственного включения ацетата в

молекулу окситетрациклина. В соответствии с этими данными процесс окислительного декарбоксилирования пировиноградной кислоты следует рассматривать как одно из звеньев в цепи реакций, приводящих к образованию ряда циклических антибиотиков.

Использование меченых соединений показало, что биосинтез тетрациклиновых структур происходит через малонил-КоА и малонамоил-КоА, которые образуются из девяти молекул уксусной кислоты (ацетил-КоА) при участии АТФ. Схематически этот процесс начальной стадии биосинтеза тетрациклиновой структуры можно представить следующим образом:



Затем к одной молекуле малонамоил-КоА присоединяется восемь молекул малонил-КоА с образованием нонакетид (гипотетическая структура), который через ряд промежуточных соединений превращается в молекулу тетрациклина (McCormick, 1967):



После этого осуществляются реакции, связанные с формированием функциональных групп (метильных, гидроксильных и др.).

Существенную роль в процессе образования хлортетрациклина играет хлор. Обычно источником хлора служат неорганические соли (NaCl , MgCl_2 и др.). Однако производитель хлортетрациклина может использовать для биосинтеза антибиотика хлор органических соединений (например, хлор жирных кислот).

Изменение концентрации хлора в среде заметно влияет на биосинтез хлортетрациклина. Так, увеличение концентрации NaCl от 0 до 0,4% способствует заметному повышению образования антибиотика.

Важную роль в процессе биосинтеза хлортетрациклина играет аэрация. При глубинном выращивании стрептомицета непрерывная аэрация культуры позволяет получить высокий уровень биосинтеза антибиотика. Короткие перерывы в аэрации культуры приводят к резкому снижению образования хлортетрациклина. Культура наиболее чувствительна к перерывам в аэрации в период между 6-м и 12-м часами развития. Один 10-минутный перерыв понижает выход хлортетрациклина до 50% по сравнению с контролем. Роданистый бензил, добавленный к среде в концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ М, снимает вредное действие перерывов в аэрации на биосинтез этого антибиотика.

Образование хлортетрациклина культурой *S. aureofaciens* обратно пропорционально активности ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Снижение окислительной способности ферментов ЦТК, по-видимому, связано с использованием КоА для синтеза углеродной цепочки, из которой формируется молекула хлортетрациклина. Ферментная активность ЦТК у продуцирующего антибиотик штамма в 2–5 раз выше, чем у продуцирующего. Хлортетрациклин подавляет активность ацетил-КоА-карбоксылазы у активного штамма продуцента этого антибиотика почти на 70%, а у неактивного штамма — на 57%.

Хлортетрациклин выделяют из культуральной жидкости после отделения от нее мицелия экстракцией, осаждением или адсорбцией.

Антибиотические свойства хлортетрациклина

Наибольшая антибиотическая активность хлортетрациклина проявляется в слабокислой среде (рН 6,2–6,5). В щелочной среде антибиотик быстро разрушается и, следовательно, его антимикробные свойства резко снижаются. При рН 14,0 хлортетрациклин инактивируется на 50% уже через 40 с, а при рН 7,6 — через 12 ч. При хранении антибиотика в воде в течение 7 сут при 37 °С сохраняется около 68,5% первоначальной активности.

Стабильность хлортетрациклина зависит от солей, в виде которых он приготовлен. Солянокислый хлортетрациклин в герметически закрытом состоянии при 20–24 °С сохраняется в течение 36 мес. Эта же соль антибиотика в виде таблеток стабильна в течение 48 мес.

Хлортетрациклин *in vitro* обладает высокой активностью в отношении многих видов грамположительных, грамотрицательных и кислотоустойчивых бактерий, ряда риккетсий и простейших, т.е. имеет широкий спектр биологического действия. В большинстве известных случаев хлортетрациклин обладает бактериостатическим действием. Следовательно, если антибиотик длительно

присутствует в среде одновременно с чувствительными к нему микроорганизмами, то после разрушения препарата или отделения клеток микроба от антибиотика основная масса бактерий вновь начинает развиваться. Бактериостатическое действие антибиотика проявляется лишь при определенных концентрациях препарата. При увеличении концентрации хлортетрациклина в среде он может оказывать и бактерицидное действие.

У чувствительных к хлортетрациклину микроорганизмов обнаруживается устойчивость к его действию. Однако эта резистентность развивается довольно медленно, гораздо медленнее, чем, например, по отношению к стрептомицину. Широкое применение хлортетрациклина в клинической практике способствует возникновению и нарастанию числа устойчивых к нему форм микробов.

Применение хлортетрациклина

Хлортетрациклин — весьма ценный препарат для медицинской практики. Наиболее рационально применение его при лечении заболеваний, возбудители которых устойчивы к действию пенициллина или стрептомицина, например бактериальных пневмоний, бруцеллеза, туляремии, коклюша, скарлатины, сибирской язвы и других бактериальных заболеваний. Кроме того, хлортетрациклин может использоваться при терапии различных форм сыпного тифа, пятнистой лихорадки и других риккетсиозов.

Хлортетрациклин назначают per os равными дозами 3–4 раза в сутки. Каждая доза антибиотика не должна превышать 500 мг, а ежедневная — 1,5–2 г.

Применение хлортетрациклина не дает серьезных осложнений или побочных реакций, связанных с токсичностью. Однако у некоторых больных хлортетрациклин может вызывать боли в кишечнике, понос, рвоту. Иногда наблюдаются тяжелые случаи поражения печени после приема больших доз хлортетрациклина или других антибиотиков этой группы.

Хлортетрациклин может применяться в сельском хозяйстве. Добавление небольших доз антибиотика к корму птиц и сельскохозяйственных животных (телят, ягнят, свиней и др.) увеличивает у них скорость роста и, следовательно, массу.

Окситетрациклин (Oxytetracyclin)

Окситетрациклин, или, как впервые этот антибиотик был назван, тетрациклин, образуется стрептомицетом *Streptomyces rimosus*. Стрептомицет выделен А. Финли, Ж. Хобби и др. в 1950 г. из почвы и назван *rimosus* (щелистый, с трещинами), потому что при развитии на поверхности агаровой среды образует колонии с трещинами, края которых несколько приподняты. Окраска колоний бледно-желтая.

Кроме *S. rimosus* окситетрациклин вырабатывается и другими видами стрептомицетов: *S. griseoflavus*, *S. armilatus*, *S. aureofaciens* subsp. *oxytetracyclini*. Однако получение антибиотика и все сведения о его образовании связаны с *S. rimosus*.

Окситетрациклин синтезируется стрептомицетом при культивировании в жидкой среде в условиях достаточной аэрации. Обычно для получения антибиотика используют среду следующего состава (%):

Кукурузный экстракт (сухое вещество) . . .	0,5
Крахмал	3,0
Сульфат аммония	0,4
Хлорид натрия	0,5
Карбонат кальция	0,5

При развитии *S. rimosus* через 24–48 ч образуются глубинные споры актиномицета, после чего развивается вторичный мицелий. Рост микроорганизма продолжается в течение 96–120 ч. Формирование глубинных спор у *S. rimosus* сопровождается автолизом части гиф и выделением в среду определенного количества белкового азота. Раннее образование спор в культуре с последующей сменой вегетативных поколений гиф не может не отразиться на качестве посевного материала, используемого в опытах и на производстве.

Количество посевного материала существенно влияет на рост и развитие *S. rimosus* и продуцирование окситетрациклина; возраст посевного материала практически не действует на рост и развитие стрептомицета и на биосинтез антибиотика. Увеличение количества посевного материала до 5–8 об.% способствует накоплению большого количества мицелия в период между 40–48 ч развития и большому потреблению аммонийного источника азота. Все это усиливает процесс биосинтеза антибиотика.

Известно, что максимальный биосинтез антибиотика у многих стрептомицетов происходит в период общего замедленного роста микроор-

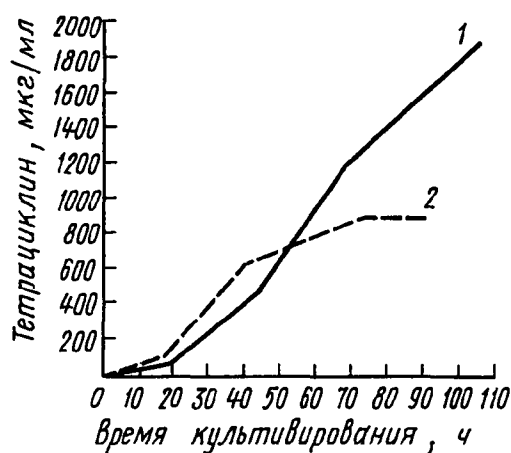
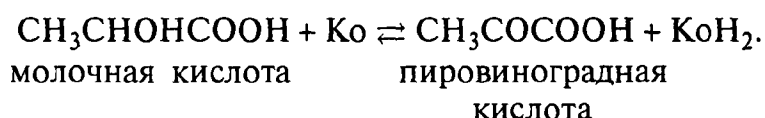


Рис. 38. Сравнение динамики образования окситетрациклина (1) и хлортетрациклина (2) (по Орловой и др., 1959)

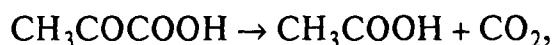
ганизма. Сравнивая максимум накопления антибиотиков у *S. aureofaciens* и *S. rimosus*, можно установить, что максимум накопления окситетрациклина наступает позже, чем максимум образования хлортетрациклина (рис. 38). Антибиотическая продуктивность мицелия *S. rimosus* выше, чем продуктивность мицелия *S. aureofaciens*.

В качестве источника азота продуцент окситетрациклина может использовать аммонийные соли и нитраты, причем аммонийная форма азота потребляется организмом лучше, чем нитратная. *S. rimosus*, как и многие другие стрептомицеты, способен синтезировать необходимые для роста и развития аминокислоты из аммонийной или нитратной формы азота. Аминокислоты, добавленные к среде, хорошо используются организмом, но это существенно не влияет на процесс биосинтеза окситетрациклина. Из источников углерода *S. rimosus* использует крахмал, глюкозу, мальтозу, галактозу, глицерин и др., но не потребляет лактозу и сахарозу.

Продуцент окситетрациклина достаточно хорошо потребляет некоторые органические кислоты (молочную, пировиноградную, янтарную, фумаровую, лимонную). Молочная кислота, содержащаяся в кукурузном экстракте, наиболее сильно стимулирует биосинтез окситетрациклина. Добавление молочной кислоты к среде с кукурузным экстрактом оказывает еще большее влияние на выработку антибиотика. По-видимому, это связано с тем, что из молочной кислоты в процессе ее дегидрирования в присутствии фермента кодегидразы легко получается пировиноградная кислота:



При дальнейшем декарбоксилировании пировиноградной кислоты образуется уксусная кислота



которая и принимает непосредственное участие в формировании тетрациклиновых структур (см. с. 298).

Продуцент окситетрациклина может использовать жиры, причем *S. rimosus* использует жиры интенсивнее, чем *S. aureofaciens*.

Важную роль в процессе развития стрептомицета и биосинтеза окситетрациклина играют фосфор и железо. От концентрации фосфора в среде зависят скорость потребления углеводов, образование органических кислот, характер развития продуцента (накопление нуклеиновых кислот и волютина в мицелии стрептомицета). *S. rimosus* довольно быстро использует внесенный в среду фосфор. Увеличение концентрации фосфора в среде по сравнению с его оптимальным количеством (около 6 мг%) приводит к возрастанию биомассы мицелия, к увеличению скорости потребления углеводов, снижению pH среды, в результате чего образование антибиотика тормозится. Внесение дополнительных количеств фосфора в ходе развития продуцента резко снижает выход антибиотика, особенно на более ранних стадиях развития стрептомицета (рис. 39).

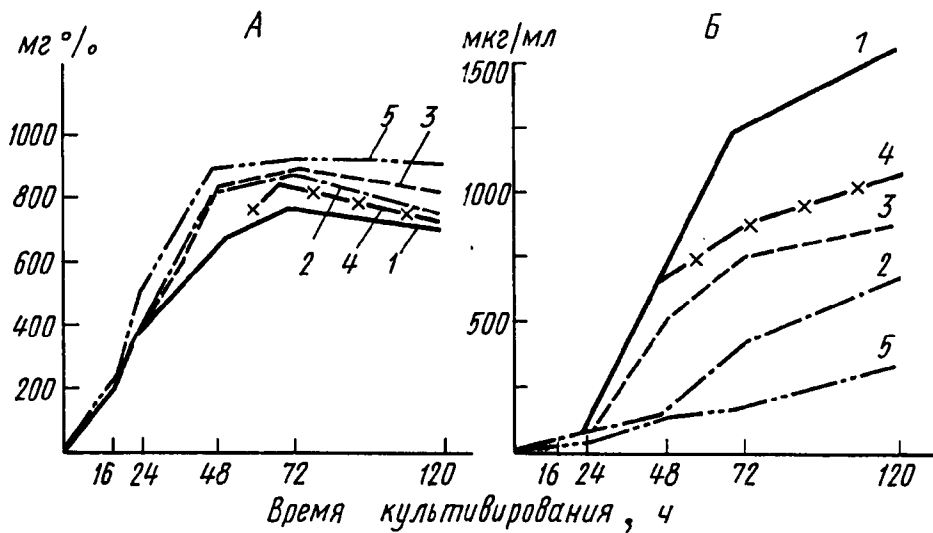


Рис. 39. Влияние избыточного количества фосфора, внесенного в среду на разных стадиях развития *Streptomyces rimosus*, на рост стрептомицета (А) и образование окситетрациклина (Б) (по Зайцевой, Михайловой, 1961): 1 — контроль (6 мг% Р); 2–4 — добавка 5 мг% Р через 16 (2), 24 (3) и 48 ч (4); 5 — трехкратная добавка фосфора (15 мг%)

Повышение содержания в среде минерального источника фосфора (K_2HPO_4) на ранних стадиях развития стрептомицета (16–24 ч) стимулирует интенсивный синтез нуклеиновых кислот, особенно ДНК, и усиливает процесс спорообразования.

Действие железа на биосинтез окситетрациклина в значительной степени зависит от присутствия в среде ненасыщенных масел. Ионы железа катализируют образование из масел пероксидных соединений, которые и оказывают токсическое влияние на процесс биосинтеза антибиотика.

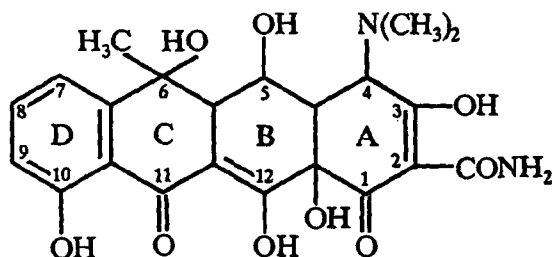
Получение методом индуцированного мутагенеза и селекции наиболее продуктивного штамма, а также изучение условий биосинтеза антибиотика обеспечили высокий выход окситетрациклина. Использование мутантов микроорганизмов, потерявших способность к биосинтезу того или иного вещества, может помочь раскрыть пути биосинтеза определенных микробных продуктов жизнедеятельности. Попытка использовать неактивные мутанты была предпринята для выяснения механизма биосинтеза 7-хлортетрациклина. Из неактивного мутанта *S. aureofaciens* выделено вещество (кофактор 1), сильно активирующее биосинтез хлортетрациклина.

В результате действия мутагенных факторов (рентгеновское и ультрафиолетовое излучения, этиленмин) на высокоактивные штаммы *S. rimosus* удалось получить мутанты, потерявшие способность к биосинтезу окситетрациклина. При совместном культивировании двух таких мутантов, условно названных «белым» и «черным», происходит биосинтез антибиотика. Образование окситетрациклина этими мутантами происходит при переносе мицелия «черного» мутанта в культуральную жидкость «белого» мутанта. Результаты опыта показали, что «белый» мутант способен выделять в

окружающую среду какое-то вещество (или несколько веществ), позволяющее «черному» мутанту продуцировать окситетрациклин.

Выработку антибиотика «черным» мутантом стимулируют также культуральные жидкости многих видов стрептомицетов, но не мицелиальных грибов, дрожжей и ряда видов бактерий. По всей вероятности, эти вещества имеют характер кофермента, участвующего в биосинтезе антибиотика.

Строение окситетрациклина установили Ф. Хокстейн, К. Стефенс и др. в 1952–1953 гг.:



Они впервые показали тетрациклиновый характер антибиотиков как новый тип химической структуры.

Строение окситетрациклина отличается от строения хлортетрациклина тем, что, во-первых, в его молекуле ион хлора в положении 7 отсутствует, как это имеет место в молекуле хлортетрациклина; во-вторых, молекула окситетрациклина в положении 5 содержит оксигруппу (ОН), а у хлортетрациклина в этом положении находится водород (Н). По биологическим и фармакологическим свойствам окситетрациклин близок хлортетрациклину.

Пути образования молекулы окситетрациклина аналогичны путям биогенеза молекулы хлортетрациклина (см. с. 297–298).

Антимикробный спектр окситетрациклина весьма близок спектру тетрациклина:

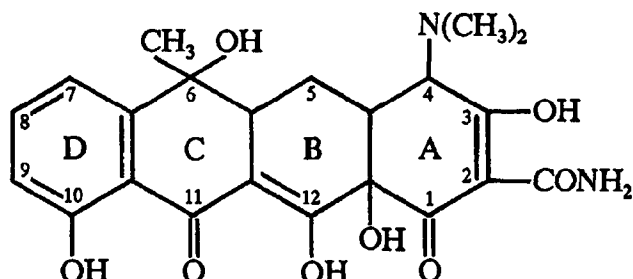
Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,1–2,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,05–1,6
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,4–6,0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,3–10
<i>Escherichia coli</i>	0,5–100
<i>Proteus vulgaris</i>	10–100
<i>Salmonella</i> sp.	0,5–10
<i>Brucella</i> sp.	0,5–2
<i>Rickettsia</i> sp.	1,0–10
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	0,4
<i>Vibrio cholerae</i>	0,2–8,0

В отличие от хлортетрациклина окситетрациклин не так быстро разрушается при щелочной реакции среды, более устойчив он и

в кислых условиях. Препараты окситетрациклина солянокислого и чистого основания — стабильные соединения, сохраняющие активность в течение 36–48 мес.

Тетрациклин (Tetracyclin)

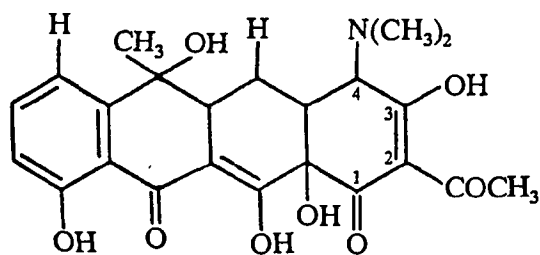
Тетрациклин — производное хлортетрациклина, полученное путем удаления из его молекул атома хлора:



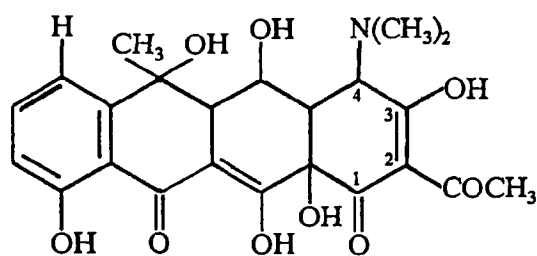
Первые сообщения о получении тетрациклина путем каталитического гидрирования хлортетрациклина относятся к 1953 г. Затем антибиотик был получен в результате биосинтеза, осуществляемого стрептомицетом *Streptomyces viridifaciens*, выделенным из почвы, а также мутантом *S. aureofaciens*.

При развитии на обычных средах *S. aureofaciens* образует главным образом хлортетрациклин и в небольшом количестве тетрациклин. Однако путем подбора определенных условий культивирования стрептомицета (например, использование сред, не содержащих хлоридов) можно осуществлять биосинтез тетрациклина. При общем низком уровне биологической активности культуральной жидкости тетрациклин образуется в большем количестве.

S. aureofaciens и *S. rimosus* наряду с образованием тетрациклина и окситетрациклина могут синтезировать и аналоги этих соединений — 2-ацетил-2-декарбоксамидотетрациклин (АДТ) и 2-ацетил-2-декарбоксамидоокситетрациклин (АДОТ):



АДТ

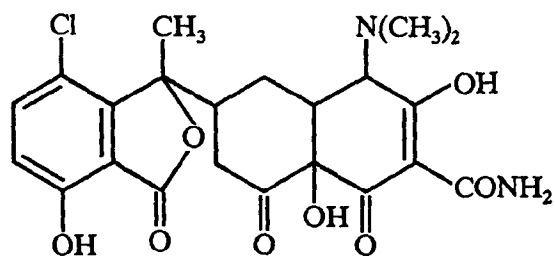


АДОТ

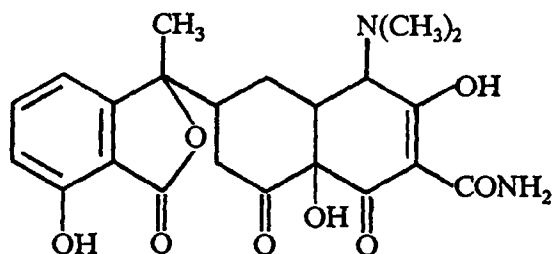
Эти соединения обладают низкой антибиотической активностью.

Количество АДТ, получающееся в процессе биосинтеза тетрациклина, составляет 0,5–5,0%, а АДОТ — в процессе развития *S. rimosus* — от 3 до 10%. Возникновение аналогов зависит от условий культивирования стрептомицетов и особенностей штаммов.

В процессе развития *S. aureofaciens* наряду с хлортетрациклином образуются изомеры этих антибиотиков — изохлортетрациклин и изотетрациклин:



Изохлортетрациклин



Изотетрациклин

Биосинтез этих изоформ увеличивается при условии снижения степени аэрации культуры, а также при повышении концентрации источника неорганического фосфора в среде. Антибиотические свойства указанных изомеров во много раз ниже, чем у исходных форм антибиотиков.

Известно, что концентрация углеводов и источника азота в среде существенно влияет на рост микроорганизмов и образование ими антибиотических веществ.

Влияние железа на биосинтез тетрациклина культурой *S. aureofaciens* зависит как от концентрации этого элемента в среде и ее состава, так и от особенностей штамма стрептомицета. Добавление к субстрату магния стимулирует образование тетрациклина, а такие микроэлементы, как бор, кобальт, литий, цинк, молибден, вольфрам, алюминий, олово, угнетают биосинтез тетрациклина.

Существенное влияние на рост *S. aureofaciens* и биосинтез тетрациклина оказывает рН среды. Оптимальное значение рН среды для роста стрептомицета 6,0–6,8, а для образования антибиотика 5,8–6,0.

Увеличение концентрации фосфора в среде, уменьшение аэрации, избыток подсолнечного масла (используемого в качестве пеногасителя) снижают содержание тетрациклина.

Некоторые штаммы *S. aureofaciens* при развитии на основной среде (без хлора и брома) продуцируют до 70% хлортетрациклина и до 30% тетрациклина. При увеличении концентрации хлора в среде биосинтез тетрациклина снижается, причем выход хлортетрациклина достигает определенного уровня и дальнейшее увеличение концентрации хлора не оказывает влияния на него.

Добавление к среде брома (NaBr) способствует повышению биосинтеза тетрациклина. При отношении брома к хлору в среде, равном 0,5, количество тетрациклина равно количеству хлортетрациклина. Однако при увеличении концентрации брома в среде снижается биосинтез тетрациклина и увеличивается образование бромтетрациклина. Таким образом, при высоких концентрациях брома в среде он не только подавляет реакцию хлорирования, но и сам включается в молекулу антибиотика.

Преимущественный биосинтез тетрациклина в процессе развития *S. aureofaciens* можно получить также при дехлорировании питательной среды (при помощи диализа, обработки среды анионитами и другими методами) или при культивировании стрептомицета на обычной среде в присутствии веществ, подавляющих процесс биохимического хлорирования у *S. aureofaciens*. К таким соединениям относятся бромиды, йодиды, роданиды и некоторые другие.

В присутствии в среде ингибиторов хлорирования и фосфора в оптимальной для образования антибиотика концентрации (около 40 мкг/мл) биосинтез тетрациклина достигает 95–99% от суммарного выхода тетрациклина и хлортетрациклина, продуцируемых стрептомицетом (рис. 40).

Повышение концентрации фосфора в среде, содержащей ингибиторы биохимического хлорирования, приводит к замет-

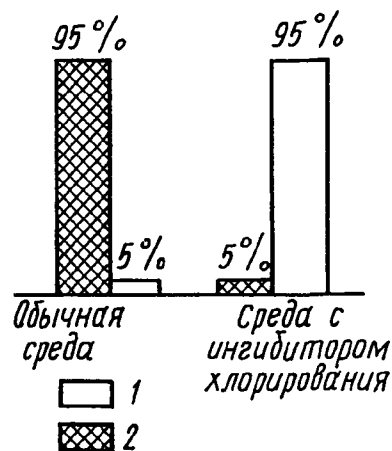


Рис. 40. Соотношение образования хлортетрациклина (2) и тетрациклина (1) при развитии *Streptomyces aureofaciens* на обычных средах и в присутствии ингибиторов биологического хлорирования

ному снижению продуцирования общего количества антибиотиков, резкому уменьшению биосинтеза тетрациклина и некоторому повышению образования хлортетрациклина (табл. 66).

Таблица 66

Влияние концентрации фосфора на биосинтез тетрациклинов при развитии стрептомицета на кукурузной среде, содержащей ингибиторы хлорирования (по Макаревич, Орловой, 1970)

Содержание фосфора в среде, мкг/мл	Суммарная активность, мкг/мл	Тетрациклин		Хлортетрациклин	
		мкг/мл	%	мкг/мл	%
37	2852	2808	98,4	46	1,6
237	1564	1506	96,2	58	3,8
808	1035	948	91,6	87	8,4
1540	651	575	88,4	76	11,6
2900	507	430	85,0	77	15,0

Вместе с тем имеются вещества, которые снимают ингибирование процесса хлорирования. К ним относятся ионы меди — Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) и ионы серебра — Ag^+ (AgNO_3).

Ионы меди довольно быстро снимают ингибирующее действие биологического хлорирования. Серебро менее эффективно, чем медь. Эти данные вместе с тем показывают, что процесс биосинтеза, осуществляемый *S. aureofaciens*, по желанию экспериментатора

можно направлять по пути синтеза хлортетрациклина, или тетрациклина, или бромтетрациклина.

Изучение закономерностей физиологических и биохимических особенностей организма позволяет управлять его биосинтетической активностью (см. гл. 11).

По своим свойствам тетрациклин мало отличается от хлортетрациклина и окситетрациклина, но тетрациклин лучше растворим в воде и более устойчив. По антибактериальным свойствам эти антибиотики близки между собой, но их биологическая активность имеет некоторые различия.

Изучение *in vitro* антибактериальной активности трех тетрациклиновых антибиотиков (хлортетрациклин, окситетрациклин и тетрациклин) по отношению к 1108 свежевыделенным от больных штаммам бактерий показало (табл. 67), что их антибактериальная активность близка друг другу.

Таблица 67

Сравнительная характеристика антибиотических свойств хлортетрациклина, окситетрациклина и тетрациклина в опытах *in vitro*
(по Koch, 1956)

Вид микроба	Число изучаемых штаммов	Количество штаммов, чувствительных к		
		хлортетрациклину	окситетрациклину	тетрациклину
<i>Enterobacter aerogenes</i>	150	42	43	32
<i>Escherichia coli</i>	60	29	25	30
Синегнойная палочка	113	32	8	22
<i>Proteus vulgaris</i>	116	1	0	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	364	230	158	196
Фекальный стрептококк	95	64	41	49
β-Стрептококк гр. Д	96	34	12	21
Стрептококк гр. А	31	31	31	31
Пневмококк	40	40	40	40

Тетрациклин при действии в обычных концентрациях — бактериостатический антибиотик. Однако увеличение концентрации антибиотика в десятки раз приводит к бактерицидному эффекту.

По фармакологическим свойствам тетрациклин близок другим тетрациклиновым антибиотикам. Установлено, что тетрациклин вызывает меньше побочных реакций, чем, например, хлортетрациклин и окситетрациклин.

Бромтетрациклин (Bromtetracyclin)

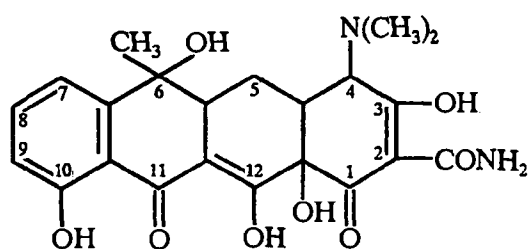
В 1955 г. появилось сообщение П. Сенси, Ж. Де Феррари и др. о новом антибиотике тетрациклиновой природы — бромтетрациклине, который был выделен из культуральной жидкости *S. aureofaciens*, выращенного на среде, содержащей NaBr.

Установлено, что продуцент хлортетрациклина на среде, содержащей ионы брома (100 мкг/мл), в отсутствие или в присутствии хлоридов образует антибиотик, в молекулу которого вместо иона хлора в 7-м положении включается бром.

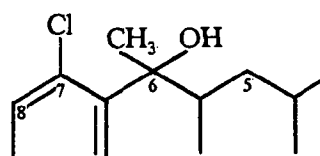
По антибактериальному действию *in vitro* бромтетрациклин очень близок к другим антибиотикам тетрациклиновой структуры и особенно к тетрациклину. От последнего бромтетрациклин отличается более высокой активностью в отношении ряда микроорганизмов. Так, в отношении *Sarcina lutea* он активнее тетрациклина в 2 раза, *Proteus vulgaris* — в 2,5, *Bacillus cereus* — в 6 раз и т.д.

Деметилхлортетрациклин и деметилтетрациклин (Demethylchlortetracyclin, demethyltetracyclin)

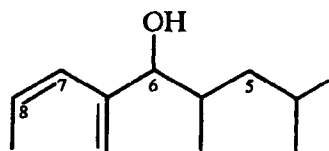
Деметилхлортетрациклин и деметилтетрациклин выделены и идентифицированы Ж. Мак Кормиком и др. в 1957 г. Эти антибиотики образует мутантный штамм *S. aureofaciens*, у которого нарушен механизм переноса метильных групп. Однако деметилпроизводные хлортетрациклина и тетрациклина можно получить и при развитии обычного штамма *S. aureofaciens*. Для этого достаточно в среду для развития стрептомицета ввести антиметаболиты метионина — основного донора метильных групп молекулы тетрациклинов. В качестве таких антиметаболитов метионина могут быть использованы этионин, D-норлейцин и D-метионин. Деметилпроизводные отличаются от основных антибиотиков отсутствием метильной группы в 6-м положении тетрациклиновой молекулы. Структурные отношения тетрациклинов показаны в следующих формулах:



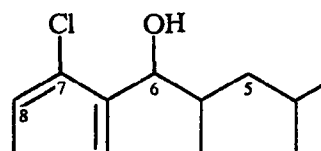
Тетрациклин



Хлортетрациклин



Деметилтетрациклин



Деметилхлортетрациклин

Деметилтетрациклины более устойчивы к кислотам и щелочам по сравнению с их метильными гомологами.

Соотношение антимикробной активности *in vitro* у тетрациклиновых антибиотиков, используемых в клинической практике,

может быть представлено активностью некоторых из них по отношению к *Staphylococcus aureus*:

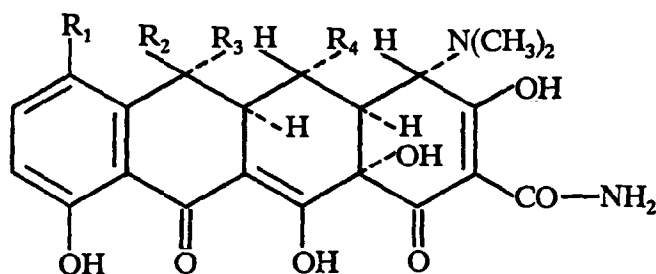
Антибиотик	Активность, %
Хлортетрациклин	100
Деметилхлортетрациклин	75
Тетрациклин	25
Окситетрациклин	24

Из этих данных видно, что в отношении *St. aureus* наиболее активен хлортетрациклин; он примерно в 4 раза активнее тетрациклина и окситетрациклина.

Химическая модификация тетрациклинов

Длительное и активное применение тетрациклиновых антибиотиков в медицинской практике привело к широкому распространению микроорганизмов, устойчивых к ним. Это побудило исследователей получить на основе молекул природных тетрациклинов синтетические производные с повышенными антимикробными свойствами.

В результате химической модификации молекулы природного окситетрациклина получены новые формы тетрациклиновых антибиотиков: метациклин (рондомицин) и доксициклин, а в результате изменения молекулы 6-деметилтетрациклина получен миноциклин:



	Метациклин	Доксициклин	Миноциклин
R ₁	H	H	N—(CH ₃) ₂
R ₂	 CH ₂	H	H
R ₃		CH ₃	H
R ₄	OH	OH	H

Новые антибиотические препараты обладают рядом ценных свойств. Так, устойчивые к тетрациклину патогенные формы бактерий чувствительны к миноциклину.

Наиболее эффективным для приема внутрь оказался деметилхлортетрациклин, а для внутривенного введения — окситетрациклин.

Тетрациклиновые антибиотики способны избирательно накапливаться в опухолевых тканях. При облучении опухолевых тканей,

содержащих тетрациклины, они начинают флуоресцировать. Этот метод нашел применение при диагностике больных раком желудка.

В 1968 г. в лаборатории Д. Бартона (Англия) осуществлен синтез молекулы тетрациклина и в то же время в лаборатории, руководимой М.М. Шемякиным (СССР), — химический синтез окситетрациклина.

АНТРАЦИКЛИНЫ

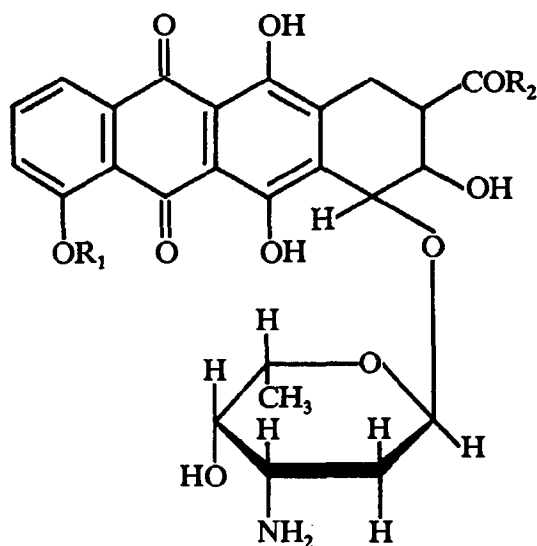
Группа антрациклинов включает около 70 наименований антибиотиков. Многие из этих антибиотиков, образуемых стрептомицетами, обладают противобактериальной активностью, а часть из них и противоопухолевым действием. К последним относятся дауномицин и его аналоги (адриамицин и карминомицин).

Дауномицин (Daunomycin)

Антибиотик, продуцируемый определенными штаммами *Streptomyces peuceticus*, впервые описали Греин и др. в 1963 г. А в 1965 г. Г.Ф. Гаузе с сотрудниками выделили штамм *S. coeruleorubidus*, способный вырабатывать противоопухолевый антибиотик рубомицин, который оказался идентичным дауномицину. В отечественной литературе нередко дауномицин носит название «рубомицин».

Дауномицин и его аналоги (адриамицин и карминомицин) обладают высокой антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий и слабо активны в отношении грамотрицательных бактерий. Для подавления роста последних требуются более высокие концентрации антибиотика.

Эти антибиотики относятся к группе антрациклинов и представляют собой гликозиды. Их молекулы состоят из четырех 6-углеродных колец, соединенных с аминасахарами и расположенных в одной плоскости:



Дауномицин: $R_1 = R_2 = \text{CH}_3$
Адриамицин: $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$
Карминомицин: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{CH}_3$

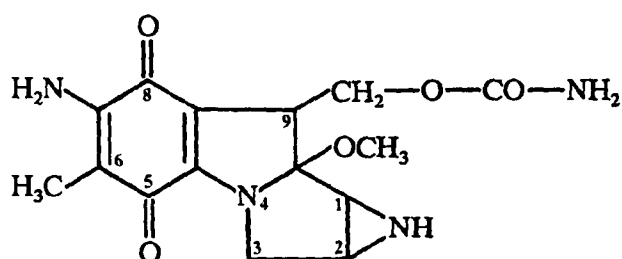
Механизм биологического действия дауномицина и его аналогов связан с подавлением репликации ДНК. Молекулы этих антибиотиков интеркалируют (внедряются, встраиваются) между основаниями ДНК, в результате чего препятствуют связыванию РНК-полимеразы с ДНК, что приводит к подавлению синтеза РНК.

Дауномицин и родственные ему соединения, обладая противоопухолевым действием, используются в химиотерапии рака. Их не применяют для лечения инфекционных заболеваний.

Митомицины (Mitomycins)

Митомицины относятся к группе бензохинонов. Т. Хата с соавторами в 1956 г. сообщили об антибиотике митомицине, обладающем противоопухолевым действием. Канамари, Хата и др. спустя год выделили митомицин С. К настоящему времени известны митомицины А, В и С, имеющие близкое строение. Наиболее ценным антибиотиком является митомицин С.

Эти антибиотики продуцируются культурой *Streptomyces caespitosus* и относятся к бензохинонам. Они содержат бензохиноновое кольцо, соединенное с двумя пятичленными структурами. В частности, митомицин С имеет следующее строение:



Этот антибиотик обладает широким антимикробным спектром действия: подавляет рост грамположительных и грамотрицательных бактерий, активен в отношении риккетсий. Вместе с тем он ингибирует рост раковых опухолей (экссудативной формы саркомы, аденокарциномы, меланомы) и проявляет мутагенный эффект. В основе противоопухолевого действия митомицина С лежит способность антибиотика подавлять синтез ДНК.

Семейство аминокислот, пептидов и пептолипидов

В составе этого семейства рассмотрим группу актиномицинов.

АКТИНОМИЦИНЫ (ACTINOMYCINS)

Актиномицин принадлежит к числу первых антибиотиков стрептомицетного происхождения, полученных в кристаллическом виде. Он был открыт и частично изучен З. Ваксманом и

Х. Вудруфом еще в 1940 г. Этими же учеными антибиотик, выделенный из культуральной жидкости *Streptomyces antibioticus*, был назван актиномицином.

Актиномицин — красно-оранжевое вещество с высокой антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий и в меньшей степени — в отношении грамотрицательных.

Открытие актиномицина и получение его в кристаллическом виде в 40-х гг. не привлекло большого внимания, так как антибиотик был чрезвычайно токсичен в отношении экспериментальных животных. Однако спустя примерно 15 лет после открытия актиномицина было выяснено, что это не единственное соединение, а большая группа близких по своим свойствам антибиотических веществ, образуемых разными видами стрептомицетов.

Эти антибиотики в концентрации 0,1 мкг/мл подавляют развитие грамположительных и в концентрации 1–10 мкг/мл — грамотрицательных бактерий. Некоторые из них обладают противоопухолевым действием. В качестве продуцентов актиномицинов описано более 50 видов стрептомицетов: *S. chrysomallus*, *S. flavus*, *S. flaveolus*, *S. parvus*, *S. parvulus*, *S. griseus*, *S. fradiae*, *S. melanochromogenes* и др., а также некоторые виды *Micromonospora* и *Actinoplanes*.

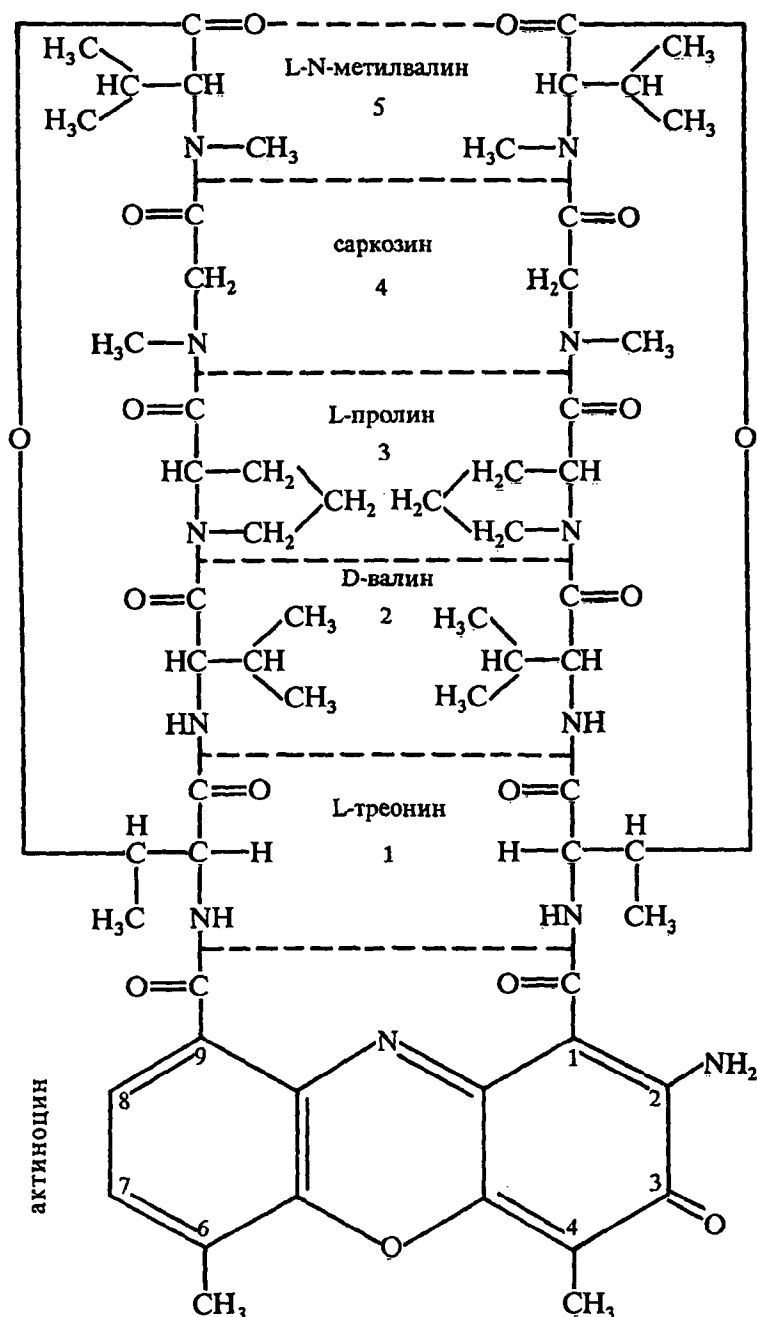
В 1949–1950 гг. Х. Брокман выделил из культуры *S. chrysomallus* актиномицин С. Затем он же с сотрудниками в 1952 г. описал актиномицин Х. В 1954 г. Р. Манакер с соавторами выделил актиномицин D из культуры одного штамма стрептомицета. К настоящему времени получено и описано более 100 актиномицинов, однако установлено, что многие препараты, имеющие разные названия, являются одними и теми же соединениями. Следует отметить, что образование различных типов актиномицинов зависит от вида (штамма) продуцента, состава среды, на которой он развивается, и от времени культивирования. В процессе биосинтеза образуются не единичные актиномицины, а смеси этих антибиотиков.

Все актиномицины принадлежат к группе очень сходных между собой хромопептидов, состоящих из феноксазиновой хромоформной группировки (одинаковой для всех актиномицинов), называемой актиноцином, и двух депсипептидных боковых цепей, являющихся, как правило, пентапептидами. Каждый полипептид содержит лактонный цикл, образуемый гидроксильной группой L-треонина, который входит в состав всех актиномицинов, и карбоксилем C-концевой аминокислоты. Раскрытие лактонного цикла в молекуле антибиотика приводит к потере его биологической активности.

Разнообразие типов актиномицинов обусловлено неодинаковым аминокислотным составом их депсипептидных цепочек.

У всех известных актиномицинов в 1-м положении от хромофорной части молекулы находятся два остатка L-треонина. Наиболее лабильны 2-е и 3-е положения от гетероцикла. Во 2-м положении могут быть D-аминокислоты: D-валин или D-аллоизолейцин либо их сочетания. В 3-м положении — L-пролин, гидроксипролин, L-кетопролин, саркозин. В 4-м положении всегда два остатка саркозина и в 5-м — два остатка L-N-метилвалина.

Для актиномицина D (C_1) предложена следующая структурная формула:



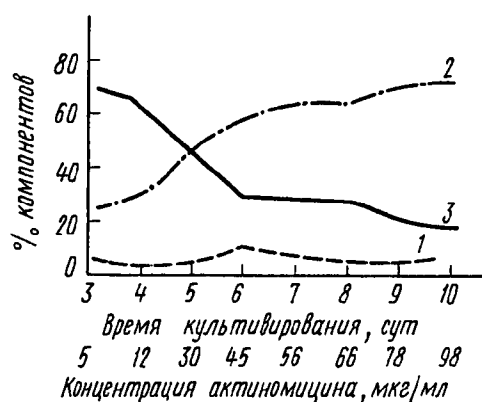
Х. Брокман с сотрудниками осуществил полный синтез актиномицина C_3 ; препарат оказался идентичным природному актиномицину.

Образование актиномицинов

Актиномицины могут вырабатываться разными видами стрептомицетов, *Micromonospora* и *Actinoplanes*, синтезирующих несколько типов антибиотиков. Вместе с тем довольно часто разные актиномицины синтезируются одним видом микроорганизма. Это явление связано, с одной стороны, с биосинтетическими особенностями стрептомицета, а с другой — с условиями культивирования организма. Последнее имеет важное значение с точки зрения управления процессами биосинтеза.

Образование различных компонентов в актиномициновом комплексе меняется в ходе развития *S. antibioticus* (рис. 41). Так, с увеличением времени культивирования выработка компонента A_{IV} возрастает до 70–80% и более от общего количества антибиотика в среде, компонента A_I — до 5% и A_V — до 10–20%. Актиномицины синтезируются при развитии проду-

Рис. 41. Относительное процентное содержание компонентов в препарате актиномицина, образуемого культурой *Streptomyces antibioticus* 3720, выросшей на среде, содержащей глюкозу и глутаминовую кислоту (по Waksman et al., 1958): 1 — компонент A_I , 2 — компонент A_{IV} , 3 — компонент A_V



центов как на синтетических, так и на натуральных средах неопределенного состава. Однако лучше всего эти антибиотики образуются в средах, содержащих в качестве источников азота нитраты. Если в среде имеются аммонийные соли, аминокислоты или пептон, биосинтез актиномицинов резко снижается, несмотря на хороший рост стрептомицета (табл. 68).

Таблица 68

Рост стрептомицета и образование аурантина в присутствии различных источников азота (по Нефедовой, Несмеяновой, 1966)

Источник азота	Максимальная биомасса, мг%	Максимальная концентрация аурантина, мкг/мл	Источник азота	Максимальная биомасса, мг%	Максимальная концентрация аурантина, мкг/мл
KNO_3	820	650	L-Лейцин	805	10
$(NH_4)_2SO_4$	935	70	Саркозин	815	0
Пептон	1130	100	D-L-аргинин	795	0
Гликокол	900	70	D-L-серин	805	0
L-пролин	800	20	D-L-гистидин	710	0
D-L-валин	600	20			

Продуцент аурантина* может развиваться в синтетической среде, содержащей D-L-валин в качестве единственного источника азота, однако антибиотик при этом также не вырабатывается. Биосинтез антибиотика наблюдается в том случае, если одновременно с валином в среде присутствует KNO_3 .

Состав среды для культивирования существенно влияет на биосинтез того или иного актиномицина, на соотношение разных форм антибиотика в ходе развития стрептомицета. Так, в синтетической среде с KNO_3 и глицином добавление D-L-валина способствует биосинтезу смеси трех актиномицинов (C_1 , C_2 и C_3) с преобладанием C_1 . При развитии стрептомицета на той же среде без D-L-валина вырабатывались только актиномицины C_2 и C_3 . Биосинтез актиномицина C_1 не наблюдался.

В состав многих актиномицинов входит D-валин. Так, *S. antibioticus* синтезирует смесь антибиотиков, состоящую иногда из пяти актиномицинов, каждый из которых содержит по два моля D-валина на один моль антибиотика. Однако *S. chrysomallus* образует смесь актиномицинов, одна группа которых содержит два моля D-валина на один моль антибиотика, другая группа — один моль D-валина и один моль D-аллоизолейцина и третья группа — два моля D-аллоизолейцина на моль актиномицина.

Попытка облегчить биосинтез антибиотиков путем добавления к синтетической среде D-валина, D-изолейцина и D-аллоизолейцина приводит к тому, что в присутствии D-аминокислот биосинтез актиномицинов культурой *S. antibioticus* подавляется. Однако добавка L-валина к среде снимает тормозящее действие D-валина на биосинтез антибиотика. L-валин гораздо легче используется стрептомицетом, и перед тем как включиться в пептид актиномицина, он превращается в D-изомер.

Присутствие D-L-изолейцина в среде (крахмал — глутаминовая кислота — соли) подавляет образование актиномицина, не оказывая отрицательного влияния на рост стрептомицета. Изолейцин в концентрации 0,1 мг/мл почти полностью приостанавливает биосинтез антибиотика. Однако D-L-треонин, присутствующий в среде, полностью снимает тормозящее действие изолейцина (табл. 69).

Аминокислоты, добавленные к среде, по-разному влияют на биосинтез аурантина. D-валин и D-изолейцин заметно подавляют синтез антибиотика. Лейцин, норвалин и норлейцин в D-форме не только не ингибируют образование актиномицина, но и включаются в его молекулу. Аминокислоты в L-форме активнее включаются в биосинтез молекулы актиномицина и, по-видимому, легче проникают через клеточную стенку, чем D-аминокислоты.

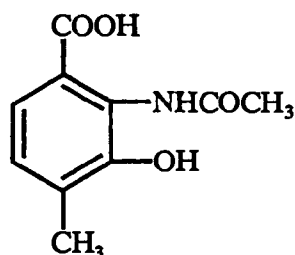
* Антибиотик относится к актиномицинам типа С.

Устранение D-L-треонином подавляющего действия D-L-изолейцина при образовании актиномицина
(no Kawamata et al., 1960)

Время развития стрептомицета, сут	Образование актиномицина, мкг/мл		
	Контроль	D-L-изолейцин, 100 мкг/мл	D-L-изолейцин, 100 мкг/мл + D-L-треонин, 100 мкг/мл
2	0	0	0
4	100	0	200
6	400	0	400
7	2000	0	800
8	4000	0	1000
9	4000	0	4000

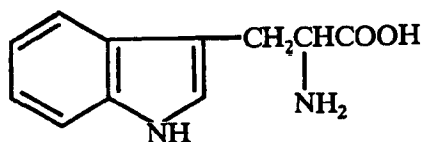
Существенное значение в образовании актиномицинов имеет биосинтез феноксазинового хромофора.

В процессе развития *S. sp.* в культуральную жидкость выделяется вещество, представляющее собой N-ацетил-4-метил-3-оксиантраниловую кислоту (N-ацетил-МОАК):

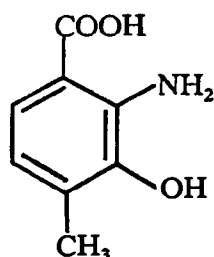


Удалось получить доказательства образования пептидов с N-ацетил-МОАК в процессе развития стрептомицета — продукта актиномицина. По-видимому, N-ацетил-МОАК принимает участие в биосинтезе молекулы актиномицина, являясь его предшественником.

При биосинтезе феноксазина определенную роль играет триптофан:

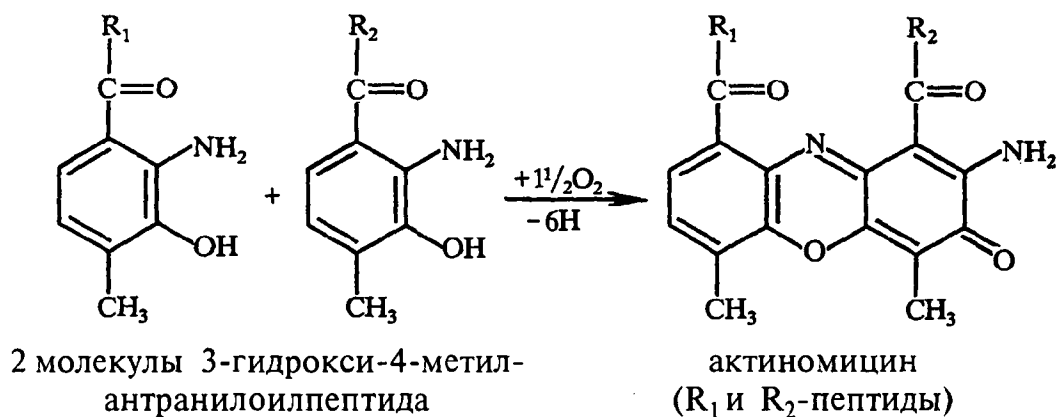


Из триптофана в ходе ряда превращений образуется 3-окси-4-метилантраниловая кислота:



которая служит исходным соединением для получения 3-гидрокси-4-метилантранилоилпептида.

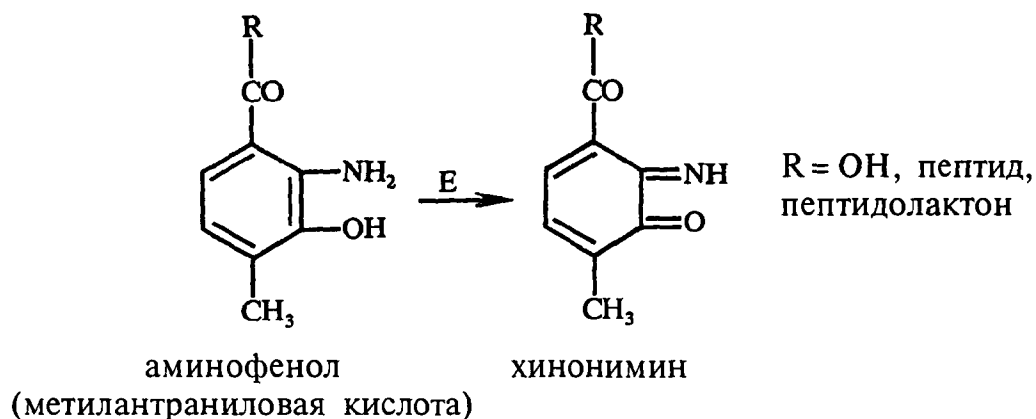
По-видимому, хромофор актиномицинов образуется в процессе синтеза антибиотика в результате оксидативной конденсации двух молекул 3-гидрокси-4-метилантранилоилпептида:



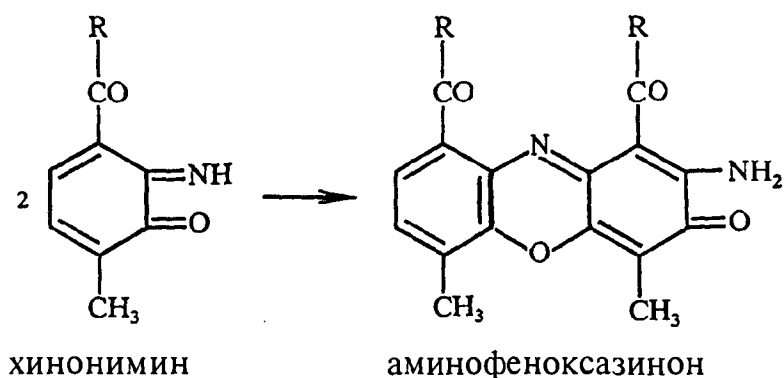
Эта реакция представляет большой интерес, так как рядом авторов было подтверждено, что 3-гидрокси-4-метилантраниловая кислота в процессе биосинтеза актиномицинов выступает в роли предшественника.

По всей вероятности, реакция конденсации идет в две стадии.

1. С участием фермента аминофеноксазиносинтетазы, обнаруженного у *S. antibioticus* и способного превращать аминофенолы (в том числе и метилантраниловую кислоту) в хинонимины:



2. Без участия фермента две молекулы хинонимина превращаются в аминофеноксазиносинтетазы:



Биосинтез актиномицина культурой *S. antibioticus* зависит от количества фенолоксидазы, присутствующей в мицелии актиномицета.

Характер пути конденсации двух молекул метилантраниловой кислоты определяется видом стрептомицета или условиями его культивирования.

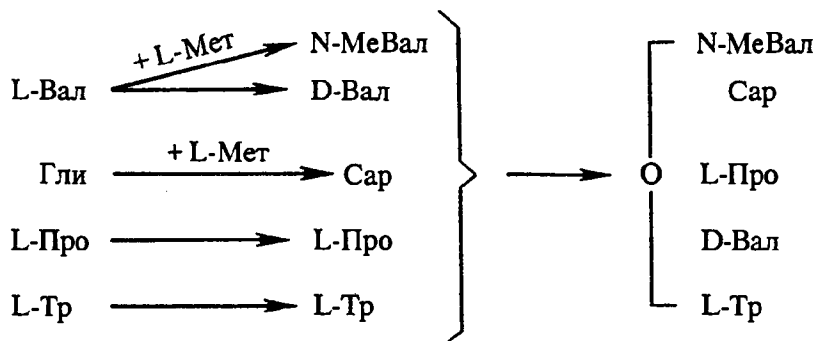
S. antibioticus включает в актиномициновый хромофор D-L-триптофан, меченный ^{14}C . В аминокислотах, входящих в пептиды актиномицина, радиоактивность не обнаружена. Таким образом, триптофан — важнейший предшественник биосинтеза хромофора актиномицина.

Образование хромофора (актиноцина) молекулы актиномицина из триптофана может быть представлено общей схемой, приведенной на рис. 42.

Изучение механизма биосинтеза полипептидной части молекулы актиномицинов имеет практическое и теоретическое значение.

Различные варианты актиномицинов образуются в результате воздействия аминокислот, вносимых в среду, на механизм биосинтеза антибиотика. Попадая в клетки стрептомицета, аминокислоты включаются в пул свободных аминокислот, из которых вырабатывается белок микроорганизма и актиномицина. Образование молекулы антибиотика в основном зависит не от уровня аминокислот в пуле, а от того, насколько легко те или иные аминокислоты могут быть включены в молекулу актиномицина.

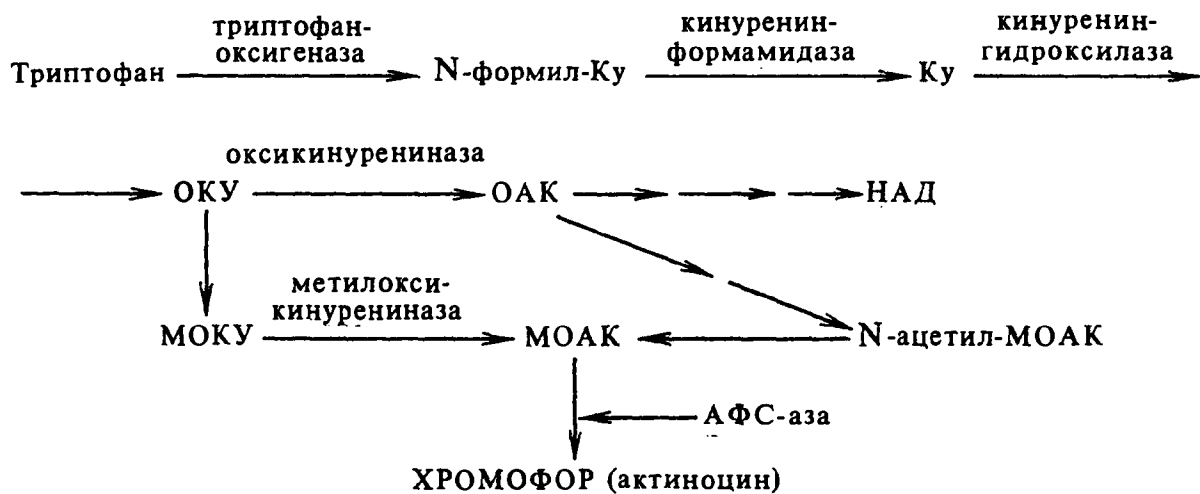
Биосинтез пентапептида в молекуле актиномицина идет по следующей схеме (Katz, 1967):



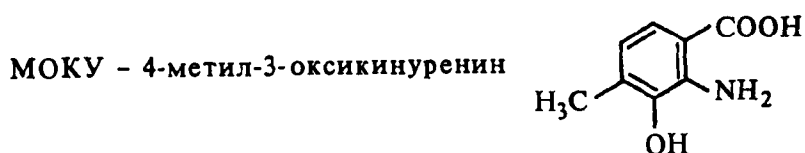
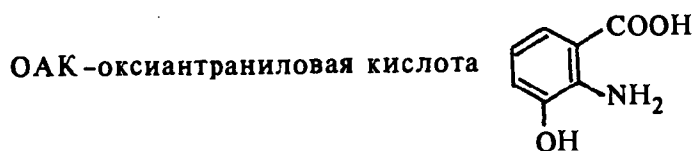
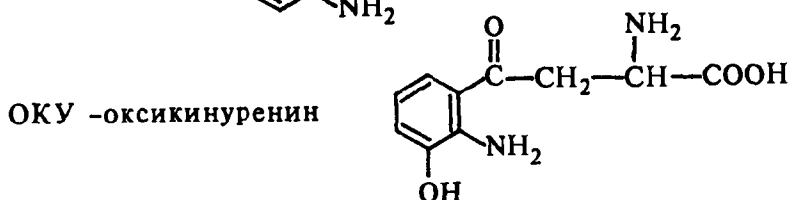
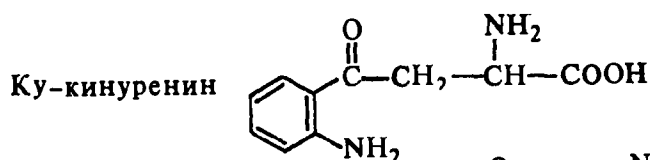
Уровень биосинтеза актиномицина коррелирует с уровнем гуанозинпентафосфата: низкий уровень этого соединения связан с низкой активностью ферментов (феноксазиносинтазы и актиномицинсинтазы), участвующих в биосинтезе молекулы антибиотика.

Таким образом, путем изменения состава среды для культивирования стрептомицета — продуцента актиномицинов — можно направлять его биосинтетическую деятельность в нужную сторону и получать заранее известные антибиотики, изменять количественное соотношение различных актиномицинов.

Изменяя в процессе развития стрептомицета структуру полипептидных цепочек, можно получить антибиотики с новыми биологическими свойствами. Биосинтез полипептидов актиномицинов находится в определенной зависимости от синтеза белка мицелия стрептомицета. Вместе с тем установлено, что механизмы



Обозначения :



МОАК - 4-метил-3-оксиантраниловая кислота

АФС-аза - аминоксантинонсинтетаза

Рис. 42. Схема превращения триптофана в хромофор (актиноцин) актиномицина (по Орловой и др., 1970; Perlman et al., 1973; Troost, Katz, 1979)

синтеза белка мицелия и синтеза полипептидов антибиотика различны. Например, рибосомы клетки стрептомицета не принимают участия в процессе биосинтеза актиномицинов.

Работами ряда авторов в кратковременных опытах показано, что скорость включения меченых аминокислот в актиномицин

в присутствии левомецетина (ингибитора синтеза белка) возрастает, а в белок мицелия *S. antibioticus* — резко уменьшается. Эти результаты дали основание предположить, что механизмы биосинтеза актиномицина и белка стрептомицета неодинаковы, однако между ними существует определенное равновесие. По-видимому, стрептомицет в процессе развития на биосинтез белка своего тела и образование актиномицинов использует общий запас свободных аминокислот. Высказано предположение, что биосинтез антибиотика — своеобразный контролируемый механизм стрептомицета, позволяющий клетке удалять избыток свободных аминокислот в период фазы замедленного роста.

Левомецетин оказывает влияние и на углеводный обмен продуцента актиномицина: во второй фазе развития в культуральной жидкости интенсивно накапливается пировиноградная кислота.

В биосинтезе молекулы актиномицина принимают участие плазмиды. Если с помощью акрифлавина и новобиоцина освободить клетки продуцентов актиномицинов от плазмид, то вырабатывающие антибиотик микроорганизмы становятся неактивными. Вместе с тем такие бесплазмидные штаммы стрептомицетов способны синтезировать ферменты (в частности, аминифеноксазинсинтетазу), которые принимают участие в биосинтезе хромофора актиномицина, но не образуют из триптофана метилоксиантраниловую кислоту. Бесплазмидные штаммы неспособны также включать в молекулу актиномицина метилоксиантраниловую кислоту, добавленную к среде.

Химическая модификация актиномицинов

В процессе биосинтеза образующиеся актиномицины отличаются один от другого составом депсипептидных цепочек молекулы антибиотиков.

Химическая модификация этих антибиотиков связана с изменениями хромоформной структуры. Химическому изменению подвергают NH_2 -группу в положении 2 и группировку хромофора в положении 7 (см. формулу актиномицина на с. 314).

Модификации подвергался в основном актиномицин D.

В результате слабого кислотного гидролиза 2- NH_2 -группа превращается в OH -группу с образованием 2-дезамино-2-окси-актиномицина, который под действием тионилхлорида превращается в 2-Cl-актиномицин. Наличие хлора во 2-м положении делает антибиотик высоко реакционноспособным соединением. Поэтому Cl-производные актиномицинов служат исходными

соединениями для получения 2-N-производных актиномицинов различной структуры.

Большое число производных актиномицинов получено в результате модификации хромофора по положению 7.

Путем химической модификации получено большое число аналогов актиномицинов, которые не могут образовываться в результате биосинтеза.

Механизм действия актиномицинов и их практическое использование

Актиномицины подавляют в клетке синтез РНК в результате образования комплекса с ДНК-матрицей. Иными словами, они ингибируют ДНК-зависимую РНК-полимеразу и препятствуют продвижению РНК-полимеразы вдоль ДНК-матрицы. В образовавшемся комплексе актиномицин — ДНК пептидная часть молекулы антибиотика размещается в малой борозде двойной спирали ДНК. При более высоких концентрациях он ингибирует также ДНК-полимеразу.

Имеется и другой механизм действия актиномицинов. Под действием ферментов клетки антибиотик превращается в свободный радикал, способный вызывать изменения белков мембран. В результате этого нарушаются транспортные функции мембран и в конечном счете клетки гибнут.

В медицинской практике находят применение пока лишь два типа актиномицинов: актиномицин D (препараты космоген и дактиномицин) и некоторые препараты актиномицина С. Препараты актиномицина D эффективны при лечении рака Вильмса (своеобразные опухоли почек), эмбриональной рабдомиосаркомы.

Препараты актиномицина С применяются при лечении лейкозов, лимфогранулематоза, рака яичников.

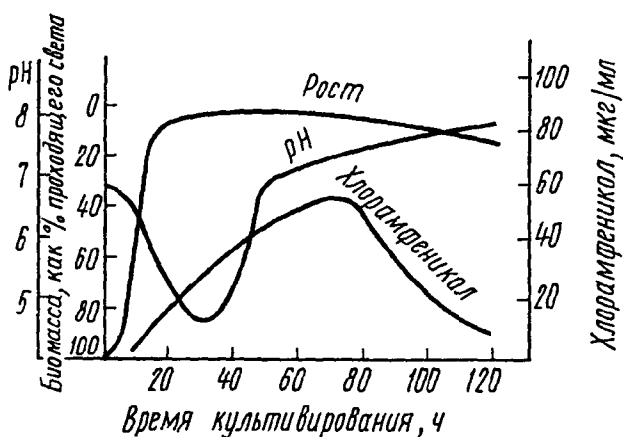
Однако высокая токсичность актиномицинов оказывается весьма ограничивающим фактором их использования.

Получение в процессе направленного биосинтеза новых форм актиномицинов, обладающих антиопухолевыми свойствами и вместе с тем пониженной токсичностью, имеет существенное практическое значение.

Семейство ароматических антибиотиков

К этому семейству антибиотиков относятся соединения бензола (хлорамфеникол) и вещества, имеющие небензольные ароматические структуры (новобиоцин, коумермицины).

характер. К 72-му часу развития стрептомицета на синтетической среде биомасса достигает максимума, а затем в результате преобладания лизиса мицелия над процессом его развития общая масса мицелия медленно снижается (до 60–70%) (рис. 43). После 72 ч глицерин больше не используется стрептомицетом; молочная кислота потребляется им одновременно с глицерином.



Кривая 'Хлорамфеникол' повышается до максимума в 72 часа и затем снижается.

Как в синтетической, так и в триптон-глицериновой среде максимум образования хлорам-

Рис. 43. Процесс развития *Streptomyces venezuelae* и образования хлорамфеникола (по Legator, Gottlieb, 1953)

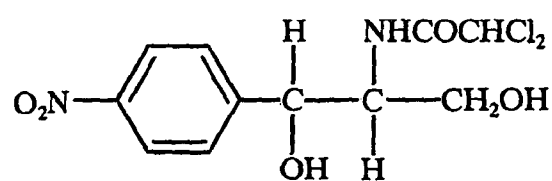
феникола обнаруживается спустя определенное время после максимума роста стрептомицета.

В процессе развития *S. venezuelae* основное количество хлорамфеникола выделяется в окружающую среду и лишь небольшая часть, примерно 0,015% от общего количества образовавшегося антибиотика, связывается гифами мицелия продуцента.

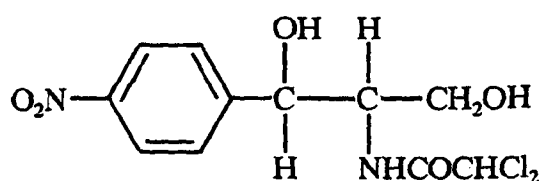
Добавление в среду хлорамфеникола в ходе развития стрептомицета или внесение его в субстрат до засева продуцента в количествах, соответствующих уровню, который образуется в нормальных условиях развития стрептомицета, прекращает биосинтез антибиотика, хотя организм в этих условиях развивается нормально. Возможно, хлорамфеникол блокирует ферментативные системы организма, участвующие в биосинтезе антибиотика.

Химическая природа хлорамфеникола и его синтез

Установлена структурная формула хлорамфеникола, которая оказалась не слишком сложной, — это D-трео-1-(п-нитрофенил)-2-дихлорацетиламинопропан-1-3-диол:



D-трео-хлорамфеникол



L-трео-хлорамфеникол

Антибиотик, образующийся в процессе биосинтеза, является D-трео-формой. Антибиотические свойства хлорамфеникола в большой степени зависят от пространственной конфигурации молекулы. Например, L-трео-изомер биологической активностью не обладает.

Вскоре после выяснения химического строения хлорамфеникола был осуществлен его химический синтез одновременно в США (Controulis et al., 1949) и в СССР (Авт. свид. СССР, 1950). Это был первый пример химического синтеза антибиотика, осуществляемого в промышленных масштабах. В настоящее время хлорамфеникол получают только путем химического синтеза.

Однако при химическом синтезе образуется рацемический препарат, т.е. соединение, содержащее L-трео- и D-трео-формы хлорамфеникола. Рацемический препарат, синтезированный советскими учеными, назван синтомицином.

При соответствующих методах рацемический продукт хлорамфеникола удастся разделить на L-трео- и D-трео-изомеры. D-трео-изомер получил название левомицетина.

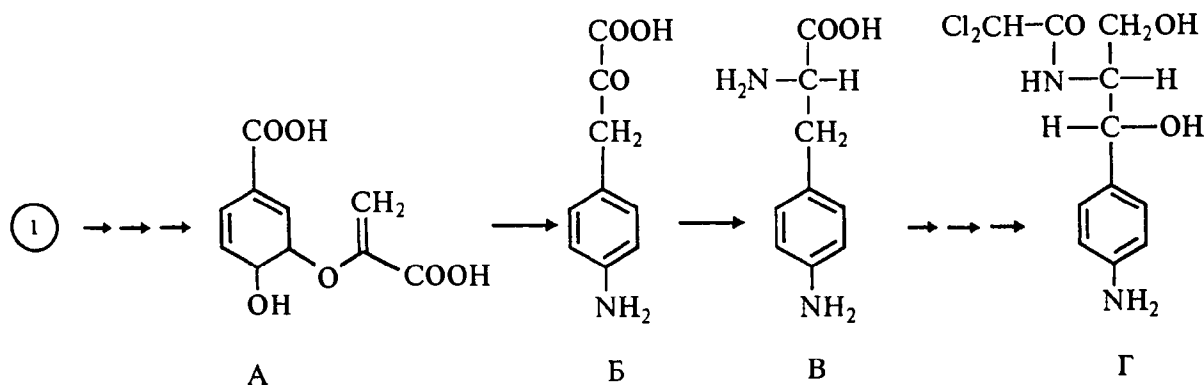
При культивировании стрептомицета в среде, не содержащей ионов хлора, вместо хлорамфеникола синтезируются его аналоги, у которых дихлорацетильная группа заменена остатком уксусной, пропионовой, масляной или валерьяновой кислоты.

Пути биосинтеза молекулы хлорамфеникола

Образование молекулы хлорамфеникола в процессе развития стрептомицета связано с биосинтезом ароматических аминокислот (п-аминофенилаланина, аминофенилсерина).

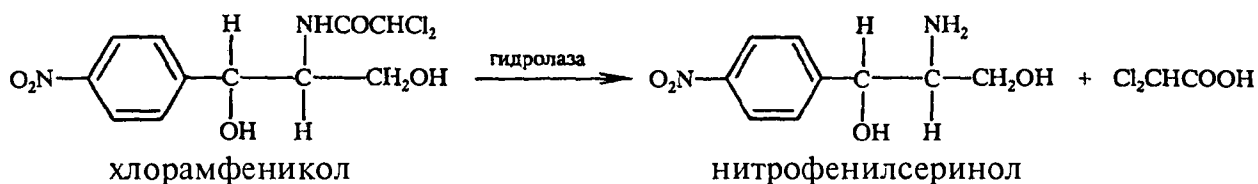
Исходным продуктом метаболизма для биосинтеза хлорамфеникола является хоризминовая кислота, которая образуется из шикимовой кислоты (см. формулу на с. 235) в результате ряда ее превращений.

В 1967 г. была предложена следующая схема биосинтеза молекулы хлорамфеникола (из Vetina, 1983):



Обозначения: 1 — шикимовая кислота, А — хоризминовая кислота (chorismic acid), Б — п-аминофенилпировиноградная кислота, В — п-аминофенилаланин, Г — хлорамфеникол.

Хлорамфеникол может инактивироваться под действием ферментов (гидролаз), образуемых как продуцентами этого антибиотика, так и отдельными видами бактерий. Под действием гидролаз образуется нитрофенилсеринол, лишенный антимикробных свойств:



Химическая модификация хлорамфеникола

В Институте химии природных соединений АН СССР впервые в мире в 50-е гг. XX в. М.Н. Колосовым было получено производное хлорамфеникола — тиамфеникол. У этого антибиотика нитрогруппа ($-\text{NO}_2$) бензольного кольца замещена на сульфометильную группу ($-\text{SO}_2\text{CH}_3$).

Во многих странах мира вместо хлорамфеникола в медицинской практике используют тиамфеникол, не вызывающий осложнений, подобно хлорамфениколу (апластическая анемия). К сожалению, в нашей стране тиамфеникол до сих пор не производится. Апластическая анемия* хотя и редкое, но очень тяжелое осложнение, вызываемое хлорамфениколом. Частота этих осложнений, иногда заканчивающихся летальным исходом, составляет 1 на 10 тыс. (Дудник, 1989). Представляет большой интерес фторированный аналог тиамфеникола, который устойчив к хлорамфениколацетилтрансферазе — ферменту, инактивирующему хлорамфеникол в клетках устойчивых к нему бактерий.

Антибиотические свойства хлорамфеникола

Хлорамфеникол обладает широким антимикробным действием. Он подавляет развитие многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий, спирохет, хламидий, в том числе риккетсий сыпного тифа, трахомы и др.

Некоторые микроорганизмы, в частности *Salmonella typhi*, приобретают устойчивость к хлорамфениколу, но резистентность развивается довольно медленно. Этот антибиотик подавляет формы некоторых бактерий, устойчивые к пенициллинам, например *Nisseria gonorrhoeae*.

Применение хлорамфеникола

Хлорамфеникол имеет широкий спектр биологического действия, что позволяет активно применять его в медицинской практике как средство лечения брюшного тифа и паратифов, дизентерии, бруцеллеза, токсической диспепсии, трахомы и других заболеваний.

* Апластическая, или, что то же, гипопластическая, анемия — малокровие с замедленным темпом развития. При этом происходит замещение в костном мозге гемотворной ткани жировой.

Антибиотик успешно применяется при лечении бактериальной дизентерии у детей, менингита. Он эффективен при пневмониях, остеомиелитах, перитонитах и других заболеваниях. При приеме через рот хорошо всасывается и поступает в кровь и тканевые жидкости.

Имеется несколько лекарственных форм хлорамфеникола, в их числе хлороцид С (сукцинат натрия левомицетина), зулевомицетин (стеарат левомицетина), левовинизоль (аэрозольная форма левомицетина).

Новобиоцин (Novobiocin)

Новобиоцин — антибиотик стрептомицетового происхождения, относящийся к группе ароматических соединений, имеющих небензольные ароматические структуры. Впервые его открыл и описал в 1953 г. И. Уага под названием «гризеофлавин». Затем антибиотик почти одновременно описали под разными названиями («катомицин», «стрептоницин», «кардельмицин») в лабораториях, принадлежащих трем фирмам. Лишь некоторое время спустя было установлено, что эти антибиотики — одно и то же соединение (новобиоцин).

Одни авторы считали продуцентом новобиоцина *Streptomyces spheroides*, другие — *S. niveus*. Затем было установлено, что этот антибиотик образуется также культурами *S. griseoflavus* и *S. sp.*

По данным В.Д. Кузнецова и др., продуценты новобиоцина *S. spheroides*, *S. niveus* и *S. griseoflavus* относятся к одному виду — *S. spheroides*, или *S. niveus*, но не к *S. griseoflavus*, так как последний резко отличается от истинного *S. griseoflavus* Krainsky рядом свойств.

Образование новобиоцина происходит при развитии стрептомицета как на относительно простых синтетических средах, так и на натуральных средах неопределенного состава, где в качестве компонентов используются соевая мука, кукурузный экстракт, ржаная сечка, дрожжевые продукты, хлопковая мука или барда.

В качестве синтетической среды можно использовать среду следующего состава:

Глюкоза, %	5
Цитрат аммония, %	1
K ₂ HPO ₄ , %	0,2
MgSO ₄ , %	0,05
CaCl ₂ , %	0,04
FeSO ₄ , мг/л	2
ZnSO ₄ , мг/л	1

На этой среде антибиотика продуцируется примерно столько же или больше, чем на сложных натуральных средах.

Антимикробный спектр

Новобиоцин обладает относительно широким антимикробным спектром действия: подавляет развитие грамположительных и, слабее, некоторых грамотрицательных бактерий:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Micrococcus pyogenes</i>	0,19
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,39
<i>Neisseria intercellularis</i>	0,39
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,7–12,0
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3,12
<i>Proteus vulgaris</i>	25
Грамотрицательные микроорганизмы .	более 200

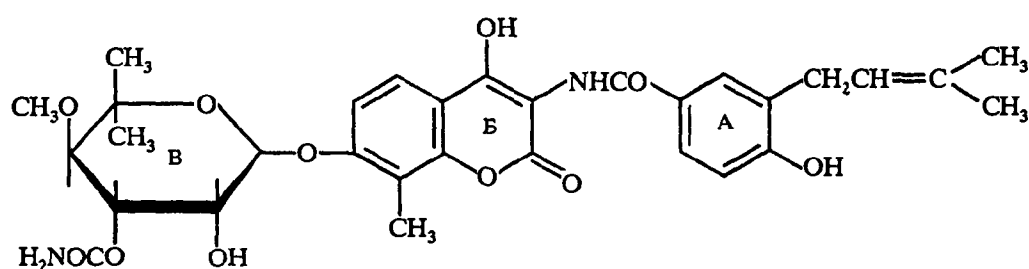
Весьма важно, что новобиоцин активен в отношении микроорганизмов, которые приобрели устойчивость к пенициллинам, стрептомицину, эритромицину, бацитрацинам, неомицинам, тетрациклинам и хлорамфениколу. Новобиоцин малотоксичен, но при его применении иногда наблюдаются аллергические реакции (сыпь на коже, зуд). В отдельных случаях при повторном применении антибиотика появляются тошнота, боли в области желудка.

Новобиоцин успешно применяется при лечении различных форм пневмонии, энтероколитов, флегмон, ангин, раневых инфекций и других заболеваний.

Основной мишенью деятельности новобиоцина является ингибирование ДНК-гираз в бактериальной клетке.

Химическое строение новобиоцина

Строение новобиоцина было выяснено одновременно несколькими авторами, которые установили структурную форму антибиотика:

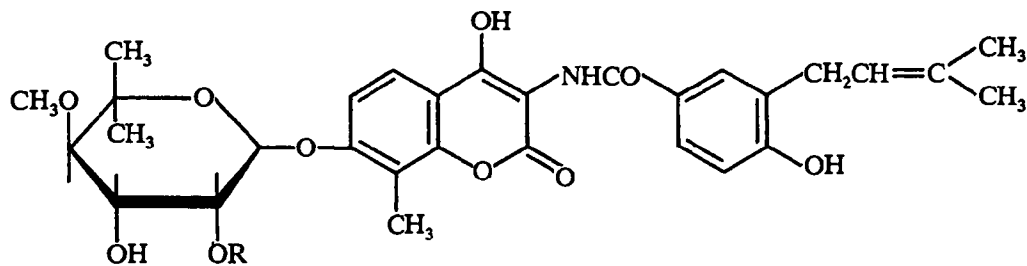


В 1964 г. был осуществлен синтез новобиоцина (В. Vaterlaus et al.). Полученный продукт обладал свойствами, аналогичными природному новобиоцину.

В состав молекулы новобиоцина входят: А — замещенная бензойная кислота; Б — аминогидроксикумарин; В — разветвлен-

ный (две CH_3 -группы) сахар новбиоза. Это пример антибиотиков, относящихся к кумариновым гликозидам.

В щелочной среде происходит почти полная инактивация новбиоцина с образованием практически неактивного изоновобиоцина, имеющего ту же общую формулу:



изоновобиоцин; $\text{R} = \text{CONH}_2$
дескарбамилновобиоцин; $\text{R} = \text{H}$

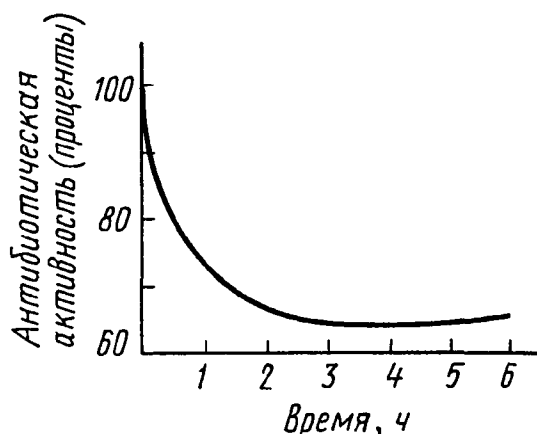
При помещении новбиоцина в щелочной буфер при pH 10 его антибиотическая активность быстро снижается (рис. 44).

Условия образования новбиоцина

В зависимости от состава среды стрептомицет может синтезировать как биологически активное вещество (новбиоцин), так и биологически неактивные соединения (изоновобиоцин и дескарбамилновобиоцин), по химическому строению очень близкие новбиоцину.

Источники азота. На фоне синтетической среды *S. spheroides* может использовать для роста, развития и

Рис. 44. Разрушение новбиоцина в водном растворе с pH 10 при температуре 25 °C (по Ноексем, Smith, 1961)



образования антибиотика разнообразные источники азота (табл. 70). Лучшими из испытанных источников азота оказались гидролизат казеина (1,25%) и белок соевой муки (1,0%). Хорошим источником азота следует признать цитрат аммония. Продуцент новбиоцина может использовать также нитратную форму азота.

Аминокислоты (глицин, аспарагин, глутаминовая кислота, аргинин), присутствующие в синтетической среде в качестве единственных источников азота, не обеспечивают высокий выход антибиотика. При развитии стрептомицета в синтетической среде уже начиная с 48-го ч роста в субстрате обнаруживаются свободные аминокислоты: аланин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, метионин, валин, триптофан, фенилаланин, лейцин, изолейцин. Пролин в свободном виде не обнаруживается.

Влияние разных источников азота на рост *Streptomyces spheroides*
и образование новобиоцина

(по Егорову, Ушаковой, 1962)

Источник азота	Количество источника азота, %	Максимальная биомасса, г/100 мл	Наибольший выход антибиотика, %
Цитрат аммония	1,00	1,6	100
Гидролизат казеина	0,75	1,6	77
То же	1,25	1,9	111
Казеин	1,00	1,6	102
Желатин	1,00	2,2	82
Белок сои	0,50	1,3	47
То же	1,00	1,9	116
Пептон	0,50	1,2	55
То же	1,00	1,4	50

Добавленный к среде пролин способствует увеличению выхода антибиотика почти в 2 раза и при этом стимулирует синтез биологически активных форм новобиоцина.

Источники углерода. Для роста и биосинтеза антибиотика продуцент новобиоцина использует глюкозу, крахмал, мальтозу, органические кислоты. Хороший выход антибиотика наблюдается на средах, содержащих в качестве источников углерода глюкозу или крахмал. В зависимости от характера источника углерода в среде *S. spheroides* образует не только неодинаковое количество антибиотика, но и разные варианты его (табл. 71).

Таблица 71

Действие источника углерода на образование разных вариантов новобиоцина*

(по Hoeksema, Smith, 1961)

Углевод	Концентрация, г/л	Новобиоцин, мкг/мл	% от общего		
			новобиоцин	изоново-биоцин	дескарбамил-новобиоцин
Глюкоза	40	1065	70	24	6
Мальтоза	40	825	94	3	3
	50	750	95	3	2
Крахмал	40	1040	75	20	5

* Углеводы добавлялись к среде с бардой (40 г/л).

При использовании в качестве источника углерода мальтозы 95% общей антибиотической активности составляет новобиоцин, но наряду с этим образуется небольшое количество изоновобиоцина и дескарбамилновобиоцина. Два последних варианта антибиотика в большом количестве вырабатываются при наличии в среде глюкозы или крахмала.

На среде с бардой многие органические кислоты стимулируют биосинтез антибиотика. В синтетической среде, содержащей крахмал и цитрат аммония, лишь молочная, янтарная и яблочная кислоты стимулируют выход новобиоцина.

Концентрация цитрата натрия 0,3% обеспечивает хорошее развитие стрептомицета и накопление антибиотика, причем при этих условиях образуется 90% биологически активного вещества, в то время как при других концентрациях цитрата натрия выход антибиотика составляет 75–80% от общего количества (табл. 72).

Таблица 72

Влияние различных концентраций цитрата натрия на рост стрептомицета и образование новобиоцина (через 168 ч)

(по Егорову, Ушаковой, 1964)

Концентрация цитрата натрия, %	рН	Биомасса, мг%	Новобиоцин, мкг/мл, определенный		Биологически активная форма (от общего количества антибиотика), %
			микробиологическим методом	спектрофотометрическим методом	
0,0	6,85	270	22,6	30,3	73
0,1	7,90	530	210,0	241,0	87
0,3	8,30	1058	502,0	555,0	90
0,7	8,50	1094	368,0	489,0	75
1,4	9,00	838	318,0	419,0	75

При замене лимонной кислоты уксусной, молочной, пировиноградной и янтарной кислотами накопление биомассы и образование новобиоцина снижаются (табл. 73).

Таблица 73

Влияние органических кислот на биосинтез новобиоцина через 168 ч

(по Егорову, Ушаковой, 1964)

Органическая кислота, добавленная в среду (натриевые соли)	рН	Биомасса, мг%	Новобиоцин, мкг/мл, определенный		Биологически активная форма (от общего количества антибиотика), %
			микробиологическим методом	спектрофотометрическим методом	
Без добавки	6,85	270	23	30	73
Уксусная	8,30	748	308	458	67
Молочная	8,20	696	312	385	81
Пировиноградная	8,25	604	226	303	74
Янтарная	8,30	874	402	533	75
Фумаровая	8,50	1058	367	658	56
Яблочная	8,30	1124	391	577	67
Лимонная	8,30	1058	502	555	90

Среды с солями фумаровой и яблочной кислот обеспечивают хорошее развитие стрептомицета и высокий уровень выхода антибиотика, однако при этом активная форма новобиоцина составляет не более 56–67% от общего количества образовавшегося продукта жизнедеятельности.

Изменение концентрации нитрата (NaNO_3), являющегося единственным источником азота в среде, а также источника углерода позволяет существенно изменить процесс биосинтеза, осуществляемый стрептомицетом. Так, при содержании в среде 0,3% NaNO_3 и 5% глюкозы стрептомицет синтезирует всего 61% активного антибиотика; если же соотношение источников азота и углерода изменить и взять соответственно 0,6 и 4%, то количество биологически активного препарата составит 86%. При замене глюкозы на мальтозу (5%) выход биологически активного вещества достигает 93%.

Изучая влияние некоторых жиров на рост стрептомицета и образование антибиотика, мы показали, что через 24 ч после добавки жира к среде развитие микроорганизма остается примерно на том же уровне, что и на среде без жира (за исключением подсолнечного масла). При добавлении 0,4% жира увеличений выхода антибиотика не наблюдается. Кукурузное (0,2%) и подсолнечное (0,5%) масла резко тормозят биосинтез новобиоцина, хотя в присутствии подсолнечного масла рост стрептомицета усиливается.

Влияние фосфора. Концентрация фосфата калия от 0,02 до 1,0% в среде с крахмалом практически не влияют на рост стрептомицета и биосинтез антибиотика (табл. 74).

Таблица 74

Влияние различных концентраций неорганического источника фосфора на развитие *S. spheroides* и образование новобиоцина
(по Ушаковой, Егорову, 1963)

Источник углерода в синтетической среде	Содержание KH_2PO_4 в среде, %	Биомасса через 120 ч, г/мл	Количество новобиоцина через 120 ч, мкг/мл
Крахмал, 5%	0,02	1,426	102
	0,05	1,592	158
	0,10	1,308	210
	1,00	1,634	160
Глюкоза, 5%	0,02	0,474	24
	0,05	0,780	96
	0,10	1,144	225
	1,00	1,026	290

Однако те же концентрации фосфата на синтетической среде с глюкозой дают иной эффект: 0,02 и 0,05% KH_2PO_4 не обеспечивают нормального роста стрептомицета, что, в свою очередь,

приводит к значительному снижению выхода антибиотика. При более высоких концентрациях фосфора улучшается рост стрептомицета и возрастает биосинтез новобиоцина.

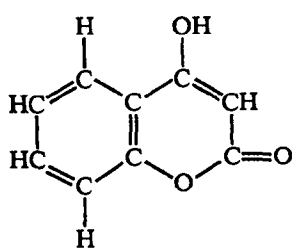
Влияние некоторых микроэлементов. Для получения хорошего выхода антибиотика необходима определенная концентрация ионов цинка в субстрате. Ионы кобальта значительно угнетают рост актиномицета и образование антибиотика.

Аэрация среды. Интенсивность аэрации среды существенно влияет на процесс образования новобиоцина: увеличение аэрации способствует повышению биосинтеза антибиотика. Снижение выхода новобиоцина происходит при добавлении к среде для развития *S. spheroides* небольших концентраций (от 0,02 до 0,10%) ряда восстановителей (цистеина, глутатиона, меркаптоэтанола). Если в среде присутствует 0,1% глутатиона, выработка антибиотика снижается примерно в 4 раза, а добавление к среде 0,1% цистеина или меркаптоэтанола полностью тормозит его биосинтез.

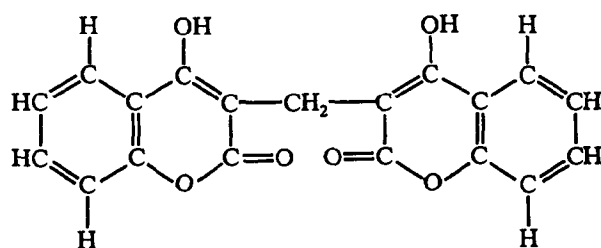
Специфические стимуляторы биосинтеза новобиоцина

Продукты разложения новобиоцина — 4-гидрокси-3-(3-метал-2-бутенил)-бензойная кислота (0,05 мкг/мл), новобиоциновая кислота (0,05 мг/мл) и п-аминосалициловая кислота — на синтетической среде с глюкозой (30 г/л), L-пролином (10 г/л) и минеральными солями стимулируют биосинтез новобиоцина. Другие компоненты молекулы новобиоцина таким действием не обладают. На сложных натуральных средах, содержащих, например, барду или другие компоненты неопределенного состава, вышеназванные вещества не стимулируют образование новобиоцина.

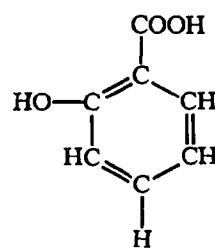
Учитывая, что в молекулу новобиоцина входят аминоксикумарин и производное бензойной кислоты, мы в качестве возможных стимуляторов продуцирования новобиоцина исследовали кумарин, дикумарин и ряд производных салициловой кислоты:



Кумарин



Дикумарин



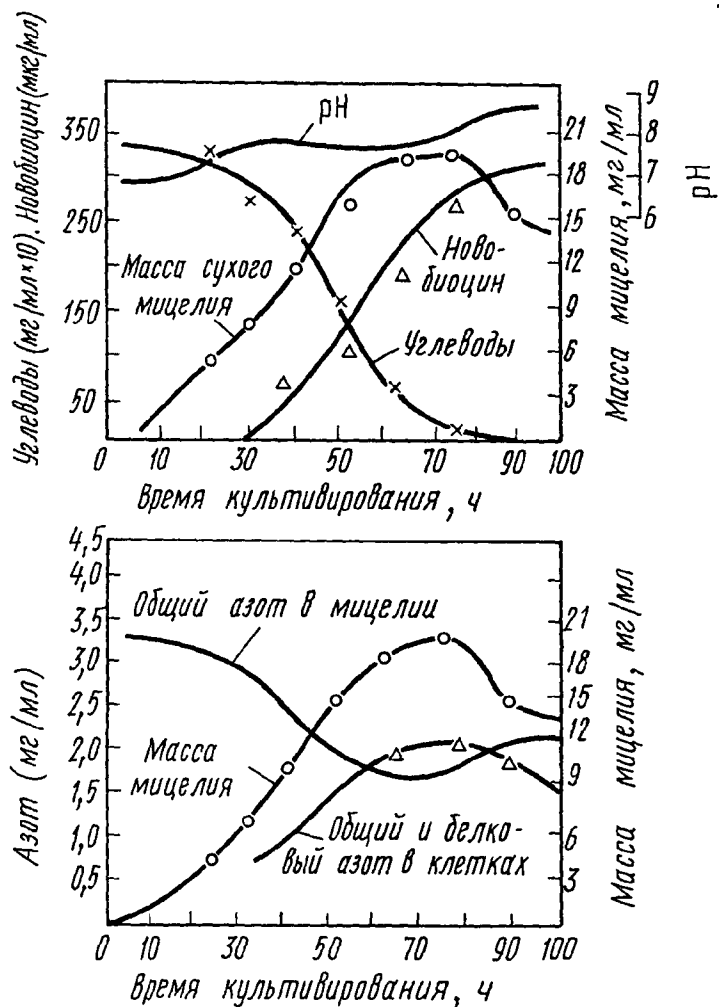
Салициловая кислота

Однако эти вещества как на среде с пролином, так и без него не дали ожидаемого эффекта.

Биохимические изменения в мицелии стрептомицета и в среде в процессе образования новобиоцина

Биохимические изменения, происходящие в субстрате и в мицелии стрептомицета, изучены на среде, содержащей глюкозу (25 г/л), яичный пептон (20 г/л) и мясной экстракт (10 г/л).

Данные, представленные на рис. 45, показывают, что биосинтез новобиоцина культурой стрептомицета на такой среде начинается спустя примерно 48 ч после начала развития организма.



Фазы быстрого образования антибиотика наблюдается в период между 40 и 75 ч. Рост стрептомицета происходит в первые 65 ч после посева. Таким образом, основная масса антибиотика образуется в последующий период фазы роста стрептомицета. В течение первых 24 ч роста стрептомицет использует незначительное количество углеводов, затем потребление углево-

Рис. 45. Биохимические изменения в ходе развития продуцента новобиоцина (no Smith, 1956)

дов из среды происходит довольно быстро и сопровождается интенсивным накоплением биомассы продуцента; pH субстрата в первый период меняется от 6,8 до 7,6, а затем возрастает примерно до 8,5–8,7.

В процессе развития продуцента новобиоцина в среде, содержащей 4-окси-3-изоамилбензойную кислоту, синтезируется дигидроновобиоцин с такой же антибиотической активностью, как и у новобиоцина. Но если в среде присутствует диметил-хромат-6-карбоновая кислота, стрептомицет синтезирует изомер новобиоцина, активность которого примерно в 25 раз меньше.

Образование биологически неактивных аналогов новобиоцина, и в первую очередь изоновобиоцина, в процессе развития стрептомицета связано с ферментативной активностью продуцента антибиотика (Егоров, 1974). Фермент, изомеризующий

новобиоцин, *S. sheroides* вырабатывает уже ко вторым суткам роста. Основная масса фермента выделяется в культуральную жидкость. Фермент наиболее активен при рН 8,0–8,5 и температуре 28 °С. Известно, что эти же условия наиболее благоприятны и для образования новобиоцина.

В присутствии в среде малата натрия как дополнительного источника углерода активность фермента значительно возрастает и превышает активность, характерную для развития стрептомицета в среде с цитратом натрия. Этот факт объясняет образование повышенных концентраций новобиоцина в процессе развития стрептомицета в среде, содержащей цитрат натрия (см. табл. 73).

В молекулу новобиоцина входит сахар новиоза (гем-метил-О-карбамил-4-О-метилновопиранозид). Основная углеродная цепь новиозы образуется в процессе развития стрептомицета непосредственно из D-глюкозы. Синтез новиозы происходит в результате метилирования гексозного скелета. Циклы А (бензойная кислота) и В (аминокумарин) молекулы новобиоцина образуются из тирозина.

Наличие в молекуле новобиоцина соединения фенольной природы позволило предположить, что биосинтез этого антибиотика, подобно хлортетрациклину, в какой-то степени может зависеть от обмена пировиноградной кислоты. В связи с этим нами было изучено влияние арсенита натрия на развитие стрептомицета, образование пировиноградной кислоты и биосинтез антибиотика.

Арсенит натрия в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М резко снижает образование новобиоцина и в небольшой степени (всего на 14%) угнетает рост стрептомицета. Увеличение концентрации арсенита в 1,5 и 2 раза сильно угнетает рост продуцента новобиоцина и полностью подавляет биосинтез антибиотика (табл. 75).

Таблица 75

Влияние разных концентраций арсенита натрия на рост стрептомицета и образование новобиоцина (результаты после 7-суточного культивирования)
(по Миронову, Егорову, 1964)

Концентрация арсенита, М	рН	Масса сухого мицелия		Новобиоцин		
		мг%	% к контролю	мкг/мл	% к контролю	мкг/10 мг, сухого мицелия
0 (контроль)	8,35	1300	100	208	100	156,4
$1 \cdot 10^{-4}$	8,40	1285	97	207	100	161,0
$5 \cdot 10^{-4}$	7,80	1144	86	12,5	6	10,6
$7,5 \cdot 10^{-4}$	7,10	583	44	4,5	2	7,7
$1 \cdot 10^{-3}$	6,00	276	21	0,0	0	—

Более подробно было изучено влияние арсенита в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ М. Результаты показали (табл. 76), что данная концентрация приводит к значительному накоплению пировиноградной кислоты в культуральной жидкости уже после 3 сут развития стрептомицета. В то же время при вполне хорошем росте микроорганизма биосинтез новобиоцина прекращается практически полностью.

Таблица 76

Влияние арсенита натрия ($5 \cdot 10^{-4}$ М) на развитие стрептомицета и биосинтез новобиоцина
(по Миронову, Егорову, 1964)

Вариант опыта	Время культивирования, сут	рН	Масса сухого мицелия		Пировиноградная кислота, мг%	Новобиоцин, мкг/мл
			мг%	% к контролю		
Среда без арсенита натрия (контроль)	0	6,70	98	100	11,9	—
	2	7,00	—	—	20,5	—
	3	7,30	—	—	28,2	22,5
	4	7,70	648	100	33,7	42,5
	5	8,30	1102	100	—	75,5
	6	8,40	1238	100	25,8	142,0
	7	8,45	1261	100	14,2	177,5
Среда с арсенитом натрия ($5 \cdot 10^{-4}$ М)	0	6,80	95	97,5	10,8	—
	2	6,80	—	—	62,0	—
	3	6,90	—	—	120,0	6,0
	4	7,45	621	96,0	180,0	6,5
	5	7,80	810	73,5	—	7,0
	6	7,70	1006	81,0	95,5	—
	7	7,40	1040	82,5	112,5	8,5

Следует отметить, что уксусная, лимонная, янтарная и фумаровая кислоты, а также пролин и глутаминовая кислота снимают подавляющее действие арсенита на биосинтез новобиоцина. Фенилаланин, салициловая и пировиноградная кислоты не тормозят образование антибиотика в присутствии ингибитора. Следовательно, кислоты, входящие в цикл Кребса, и аминокислоты, метаболически связанные с ним, могут служить источником уксусной кислоты и обеспечивать биосинтез антибиотика в присутствии арсенита натрия.

Арсенит натрия тормозит окисление пировиноградной кислоты также и отмытым мицелием стрептомицета.

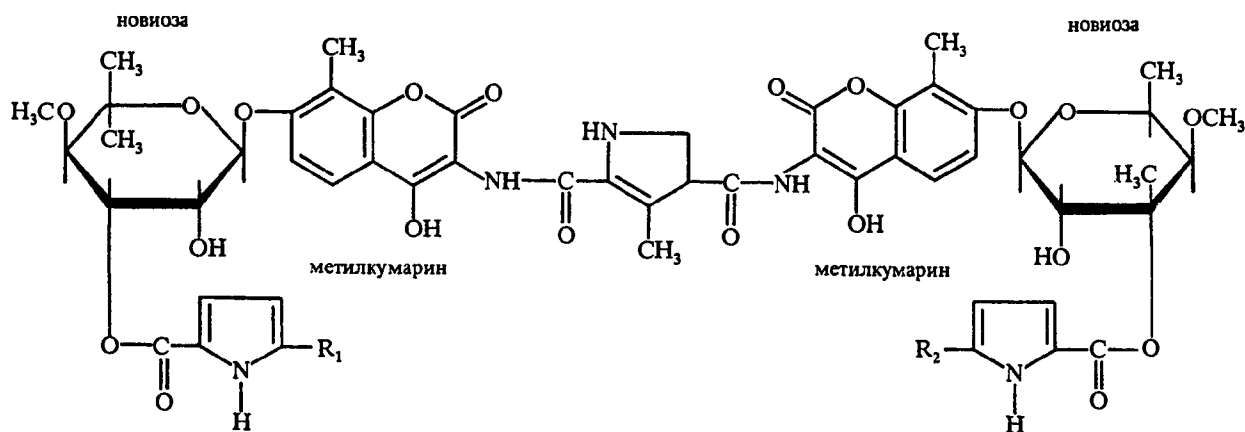
Коумермицины (Coumermycins)

К антибиотикам, содержащим в своем составе кумарин и сахар новиозу (подобно новобиоцину), относится коумермицин. Этот антибиотик образует культура *Streptomyces rishiriensis*, впервые выделенная Х. Кавагучи (Н. Kawaguchi) с соавторами в 1956 г.

В процессе развития стрептомицета синтезируется пять коумермицинов (A₁, A₂, B, C и D). Антибиотики A₁ и A₂ образуются примерно в равных количествах и составляют основную массу антибиотика. Наиболее биологически активным компонентом указанного комплекса является коумермицин A₁.

Коумермицин A₁, подобно новобиоцину, обладает относительно широким антимикробным спектром действия. Он подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий. Особенно активен в отношении стафилококков. Имеет низкую токсичность.

Строение коумермицинов A₁ и A₂ показано ниже:



Коумермицин A₁: R₁ = CH₃; R₂ = CH₃

Коумермицин A₂: R₁ = H; R₂ = H

Антибиотическая активность коумермицина A₁ в большей степени проявляется в кислой среде и снижается в щелочной.

* * *

Завершая рассмотрение антибиотиков, образуемых группой актиномицетов, необходимо остановиться на вопросе о том, где и как образуются эти биологически активные вещества. Большое внимание этим вопросам уделено польскими учеными во главе с В. Курыловичем. При изучении изменений, происходящих на поверхности и в ультраструктуре мицелия некоторых стрептомицетов, образующих антибиотики, основное внимание обращалось на роль разных клеточных структур в процессах образования, накопления и выделения антибиотиков.

Для исследования определенного вида стрептомицета использовались два штамма: высокоактивный и малоактивный продуценты антибиотика. Как показали наблюдения поверхности мицелия стрептомицетов с помощью сканирующего микроскопа, на гифах мицелия встречаются различные формы утолщений, выпячиваний и деформации. Так, на поверхности мицелия *S. erythraea*, *S. aureofaciens*, *S. vinaceus* наблюдаются аморфные

пузырьки или сферические субструктуры, причем в большем числе эти образования обнаруживаются у высокопродуктивных штаммов (рис. 46, 47).

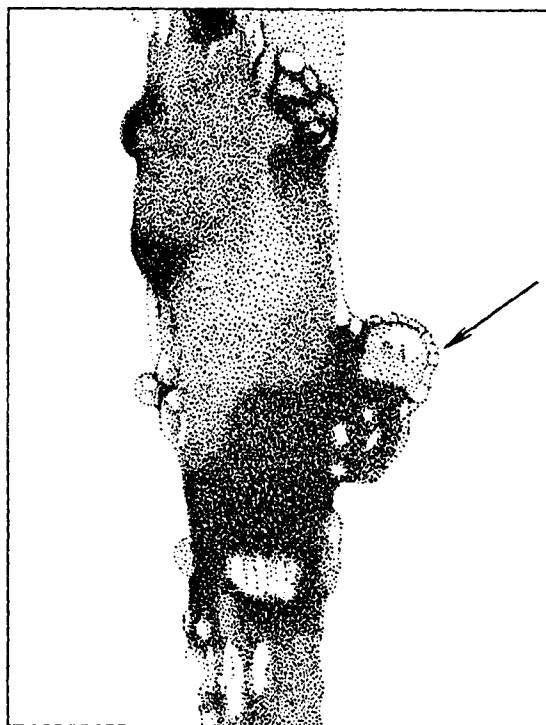


Рис. 46. Везикулярные субструктуры (показано стрелкой) на поверхности мицелия *Streptomyces aureofaciens* высокопродуктивного штамма (увеличение 70 000 раз) (no Kurylowicz et al., 1974)

Рис. 47. Вспучивание (показано стрелкой) на гифах *Streptomyces aureofaciens* высокопродуктивного штамма (увеличение 15 000 раз) (no Kurylowicz et al., 1974)

На поверхности мицелия штамма *S. noursei*, образующего нистатин, электронно-плотные аморфные субструктуры сходны с кристаллами различной формы и размера (рис. 48). Эти субструктуры смываются при обработке мицелия метанолом. Спектрофотометрический анализ полученного раствора метанола и раствора стандарта нистатина показывает их идентичность.

У продуцента тетрациклина *S. aureofaciens* в процессе развития и выработки антибиотика на поверхности мицелия возникают субструктуры размером 3000–6000 нм, причем их образование тесно связано с биосинтезом тетрациклина.

Таким образом, по мнению В. Куриловича и др. (1974), биосинтез антибиотиков высокопродуктивными штаммами стрептомицетов может быть связан с образованием в клетках многочисленных мембранных структур типа мезосом, трубочек и «цистерна» (рис. 49). Наблюдения за ультраструктурой *S. vinaceus* — продуцента виомицина — дают основание полагать, что антибиотик образуется на внешней поверхности клеточной мембраны и аккумулируется между мембраной и клеточной стенкой, откуда выделяется на наружную сторону клетки.

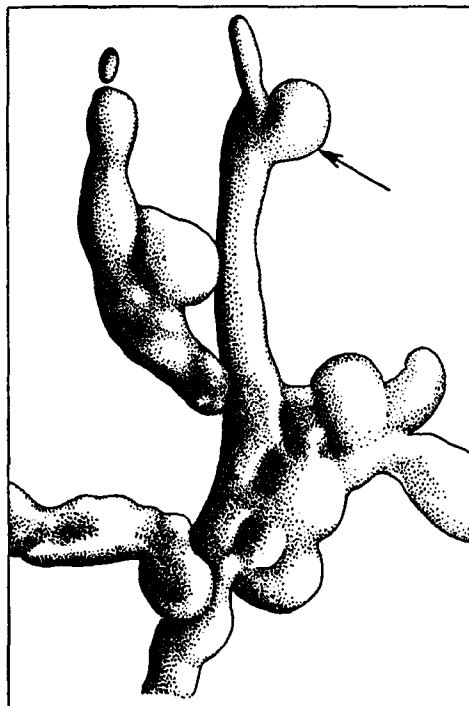


Рис. 48. Мицелий высокопродуктивного штамма *Streptomyces noursei*, покрытый субструктурами (показано стрелкой) (увеличение 10 000 раз) (no Kurylowicz et al., 1974)

Рис. 49. Мембранные структуры типа трубочек (каналцев) в клетках высокопродуктивного штамма *Streptomyces aureofaciens* (увеличение 90 000 раз) (no Kurylowicz et al., 1974)

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте общую характеристику антибиотиков, образуемых актиномицетами.
2. Приведите характеристику аминогликозидных антибиотиков.
3. Охарактеризуйте стрептомицин, условия его образования, свойства и назовите области применения.
4. Неомицины и другие аминогликозиды, их характеристика и свойства.
5. Тетрациклиновые антибиотики (условия биосинтеза, свойства и применение), деметилпроизводные и полусинтетические соединения.
6. Хлорамфеникол и его свойства. Полусинтетические производные.
7. Особенности строения стрептомицинов, условия их образования и свойства.
8. Каковы пути биосинтеза молекулы актиномицинов и механизм биологического действия этих антибиотиков?
9. Дайте общую характеристику макроциклической группы антибиотиков.
10. Назовите основных представителей группы макролидов. Каковы условия их образования и применения?
11. Охарактеризуйте группу полиеновых антибиотиков и ее основных представителей (нистатин, леворин).
12. Макротетралиды и их основные свойства.
13. Рифамицины, их характеристика и значение.
14. Новобиоцин и коумермицины. Условия их образования и свойства.
15. Дайте характеристику группы антрациклинов.

АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ ГРИБАМИ И ЛИШАЙНИКАМИ

Огромная группа организмов, принадлежащая к грибам (известно около 100 тыс. видов), образует более 2500 разнообразных антибиотических веществ, отдельные представители которых завоевали всеобщее признание в качестве лечебных средств. Основная же часть грибных антибиотиков не нашла еще практического применения главным образом в силу своей высокой токсичности.

Как отмечает З.Э. Беккер (1988), характерная особенность антибиотиков, образуемых грибами, — отсутствие азота в структурах у большинства из них, а также преобладающий циклический (гетероциклический) тип строения. Однако наиболее ценными антибиотиками, продуцируемыми этими организмами, являются соединения, имеющие в своем составе азот.

Рассмотрим ограниченное число антибиотиков, образуемых некоторыми видами грибов (пенициллины, цефалоспорины, фузидиевая кислота, циклоспорины, гризеофульвин, трихотецин, фумагиллин и др.), применяющихся в медицинской и сельскохозяйственной практике.

Среди антибиотиков грибного происхождения наибольший интерес по своим свойствам и уникальным возможностям представляет группа β -лактамных антибиотиков. К этой группе из числа грибных препаратов относятся пенициллины и цефалоспорины.

БЕТА-ЛАКТАМНЫЕ АНТИБИОТИКИ

В соответствии с классификацией антибиотиков по их химическому строению β -лактамы относятся к семейству антибиотических веществ, включающих в свои структуры производные аминокислот.

К β -лактамным антибиотикам относятся соединения, имеющие в своей структуре β -лактамное кольцо. Эти вещества образуются мицелиальными грибами (пенициллины, цефалоспорины, цефемы), стрептомицетами (карбапенемы, клавулановая кислота, цефамицины и др.), некоторыми видами нокардий (монобактамы).

Наряду с антибактериальными свойствами некоторые соединения этой группы (карбапенемы) способны инактивировать β -лактамазы — ферменты бактерий, участвующие в деструкции β -лактамного кольца пенициллинов и цефалоспоринов.

По приблизительным подсчетам, из природных источников частичным или полным синтезом получено примерно 10 тыс. соединений, имеющих β -лактамное кольцо. Из этого числа соединений около 50 веществ применяется в клинике.

Бета-лактамы находят широкое применение в медицинской практике, так как обладают такими ценными качествами, как надежность, относительно широкий спектр антимикробного действия, высокая активность, стабильность и эффективность. Названные качества дают основания считать эти антибиотики идеальными препаратами для лечения многих бактериальных инфекций.

Пенициллин (Penicillin)

Известный английский бактериолог А. Флеминг в 1929 г. опубликовал сообщение о литическом действии зеленой плесени на стафилококки. Он выделил гриб, идентифицированный как *Penicillium notatum*, и установил, что культуральная жидкость этой плесени способна оказывать антибактериальное действие по отношению к патогенным коккам.

Содержащееся в культуральной жидкости гриба антибактериальное вещество Флеминг назвал п е н и ц и л л и н о м.

Попытки А. Флеминга и группы химиков во главе с Г. Рейстриком в 1930 г. выделить активное начало, образуемое *Penicillium*, не увенчались успехом. Несмотря на это, Флеминг указал на перспективы практического применения обнаруженного им явления.

Спустя примерно десять лет после сообщения А. Флеминга пенициллин начал изучать Е. Чейн. Он был убежден, что это вещество — фермент. В 1940 г. Х. Флори и Е. Чейн получили индивидуальное соединение пенициллина, который оказался не ферментом, а низкомолекулярным веществом.

Об антагонистических свойствах зеленой плесени (*Penicillium*) было известно задолго до наблюдений А. Флеминга. Еще в глубокой древности индейцы из племени майя использовали зеленую плесень, выращенную на зернах кукурузы, для лечения ран. Философ, врач и естествоиспытатель Абу-Али Ибн-Сина (Авиценна) рекомендовал использовать плесень при гнойных заболеваниях.

В русской народной медицине с давних времен для лечения ран применялись присыпки, состоящие из зеленой плесени.

В работах русских ученых В.А. Манассеина и А.Г. Полотебнова в 1871–1872 гг. указывалось на отношение *P. glaucum* к разным бактериям. А.Г. Полотебнов впервые в клинической обстановке изучил применение зеленой плесени, получив при этом практически

ценные результаты. В.А. Манассеин установил, что молодая культура плесени подавляет рост некоторых бактерий. В 1877 г. русский врач Н.В. Лебединский доложил об угнетении плесенью бактерий желудочно-кишечного тракта. Английский физик Д. Тиндаль описал в 1876 г. способность *Penicillium* подавлять развитие бактерий, находящихся в жидкости, но объяснял он это явление чисто физическими причинами.

Таким образом, эти данные показывают, что человечество на разных уровнях своего развития знало о целебных свойствах зеленой плесени. Однако эти сведения носили разрозненный характер и касались лишь воздействия самого гриба на микроорганизмы. В то время не могло быть и речи о выделении и изучении активного начала, образуемого плесенью.

И только после 1940 г., когда Х. Флори и Е. Чейн получили пенициллин в очищенном виде, появился широкий научный интерес к этому препарату.

Изучение пенициллина в СССР было начато З.В. Ермольевой. В 1942 г. под ее руководством в лаборатории биохимии микробов Всесоюзного института экспериментальной медицины в Москве был выделен первый отечественный пенициллин — крустозин, сыгравший огромную роль в спасении жизни воинов Советской Армии во время Великой Отечественной войны.

Получать этот антибиотик в нашей стране начали в 1944 г., используя метод поверхностного выращивания гриба. Однако к этому времени США, вложив огромные средства (более 20 млн долларов), разработали и запустили мощные комбинаты по производству пенициллина глубинным способом выращивания гриба и в 1944 г. получили 90% всей мировой продукции антибиотика. Попытки советского руководства купить лицензию на производство пенициллина глубинным способом у наших союзников по Второй мировой войне не увенчались успехом: они отказали нам в приобретении лицензии. В этой ситуации мы были вынуждены сами разрабатывать более совершенный способ получения этого ценнейшего антибиотика. В разработку метода глубинного способа получения пенициллина активно включились и военные медики, и инженеры. В 1944–1945 гг. технология промышленного производства пенициллина глубинным способом в СССР была разработана.

В январе 1944 г. Москву посетила группа иностранных ученых, среди которых был профессор Х. Флори, привезший с собой английский штамм продуцента пенициллина. Сравнение двух штаммов (советского и английского) показало, что они по уровню образования антибиотика близки: советский штамм образует 28, а английский — 20 ед./мл.

После того как было установлено, что пенициллин обладает ценными лечебными свойствами, начались интенсивные поиски продуцентов этого антибиотика. В результате большого числа работ удалось установить, что пенициллин могут вырабатывать многие виды *Penicillium* (*P. chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. nigricans*, *P. turbatum*, *P. steckii*, *P. corylophilum*), а также некоторые виды *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. flavipes*, *A. janus*, *A. nidulans* и др.). Есть указания, что пенициллин образуется также термофильным организмом *Malbranchea pulchella*.

Первые выделенные из естественных субстратов штаммы *Penicillium* как наиболее активные продуценты пенициллина образовывали не более 20 ед. (12 мкг) антибиотика на 1 мл культуральной жидкости. Даже промышленное производство этого ценнейшего препарата было начато при активности культуральной жидкости не выше 30 мкг/мл, или 50 ед./мл. Насколько низка эта активность, можно судить по тому факту, что в настоящее время в промышленных условиях получают культуральные жидкости с содержанием пенициллина более 50 тыс. ед./мл, а отдельные штаммы способны синтезировать до 55 тыс. ед./мл.

Высокий выход антибиотика достигнут в результате изучения условий его образования и селекции наиболее активных штаммов продуцента пенициллина.

Условия образования пенициллина

Пенициллин относится к группе β -лактамных антибиотиков. Антибиотики этой группы образуются не только плесневыми грибами, но и некоторыми видами стрептомицетов и нокардий.

Получение пенициллина — замечательная веха в развитии микробиологии, химии и медицины. С производством этого антибиотика связано создание вначале довольно скромной, а затем весьма мощной антибиотической промышленности, формирование современной биотехнологии.

В течение ряда лет пенициллин получали путем выращивания гриба в стеклянных матрацах на жидкой питательной среде. Это создавало огромные трудности в поддержании стерильности при засевах каждого матраца и требовало большой затраты рабочей силы. Учитывая, что выход антибиотика составлял всего несколько десятков единиц на 1 мл среды, себестоимость пенициллина была чрезвычайно высокой. Так, 1 кг пенициллина в США, как отмечал в 1959 г. Н. Гольдберг, стоил в 1943 г. 227 270 долларов, а в 1953 г. — всего 169 долларов, т.е. за десять лет его стоимость снизилась более чем в 1340 раз. В настоящее время ежегодно в мире получают около 17 тыс. т пенициллина (К. Kieslich, 1984) на общую сумму более 272 млн долларов (Р. Lowe, R.P. Elander, 1983), иными словами, 1 кг стоит всего 16 долларов.

Важным этапом в увеличении выхода пенициллина было изучение условий образования антибиотика.

Первая среда для глубинного образования пенициллина была разработана А. Мойером и Р. Когхиллом в 1946 г. В ее состав входили кукурузный экстракт, лактоза, NaNO_3 , глюкоза, однозамещенный фосфат калия и другие соли. Эта среда была основной, на ее базе были разработаны среды, используемые при промышленном производстве пенициллина. Например, в качестве посевной часто применяют среду следующего состава:

Кукурузный экстракт (твердый), г	20
Глюкоза, г	40
KH_2PO_4 , г	0,5
NaNO_3 , г	3
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, г	0,125
Мел, г	5
Вода водопроводная, мл	до 1000

pH после стерилизации 6,0–6,1.

Для промышленного производства антибиотика используют среду следующего состава (%):

Кукурузный экстракт	2,5
Гидрол	1,5
Лактоза	5,0
NH_4NO_3	0,4
$\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,1
$\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,05
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,025
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,002
ZnSO_4	0,002
KH_2PO_4	0,4
CaCO_3	5,0
Фенилуксусная кислота	0,5

Довольно часто для сред используют сахарозу или смесь лактозы с глюкозой в отношении 1 : 1.

Необходимо иметь в виду, что глюкоза может выступать в качестве катаболитного репрессора и снижать биосинтез антибиотика. На средах, содержащих лактозу или сахарозу, т.е. в условиях дерепрессии, биосинтез пенициллина идет активнее. В ряде случаев вместо кукурузного экстракта применяют арахисовую муку, жмыхи, муку из хлопковых семян и другие растительные материалы.

Возможность широко использовать в качестве компонентов сред продукты растительного происхождения обусловлена тем, что продуцент пенициллина *P. chrysogenum* образует высокоактивные протеолитические ферменты. По интенсивности действия

могут быть выделены три фермента, различающиеся значением рН среды, обеспечивающим их оптимальное действие: 1) протеиназа с оптимальным действием при рН 5,0–6,5; 2) протеиназа типа триптаза с оптимумом действия при рН 7,0–7,5; 3) пептидаза с оптимальным действием при рН 8,0–8,4. Протеолитические ферменты гриба способны производить дезагрегацию и протеолиз белка. Обычно максимальная протеолитическая активность гриба совпадает с максимумом биосинтеза пенициллина.

Благодаря высоким протеолитическим свойствам гриба наличие кукурузного экстракта или другого растительного материала в среде полностью обеспечивает продуцент пенициллина азотом.

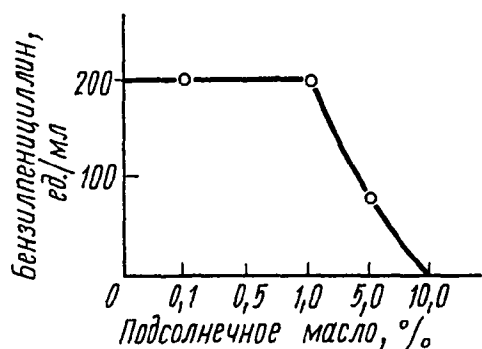
В результате изучения обмена азота в связи с продуцированием пенициллина сделано предположение, что большая часть антибиотика вырабатывается на ранних стадиях роста гриба из азотистых запасов мицелия и что синтез белков может быть конкурирующим фактором, лимитирующим образование пенициллина.

Сравнительное изучение азотного обмена у продуцента пенициллина *P. chrysogenum* и его неактивного мутанта показало, что, действительно, основная часть азота среды начиная со вторых суток развития используется продуцентом антибиотика на биосинтез пенициллина, а у неактивного мутанта азот продолжает поддерживать интенсивный рост биомассы. Химический состав мицелия и его отдельных азотсодержащих фракций у этих штаммов существенно не различается.

В качестве единственного источника углерода среды лучшим соединением для биосинтеза пенициллина признана лактоза, так как она используется грибом медленнее, чем, например, глюкоза, в результате чего в период максимального образования антибиотика лактоза еще содержится в среде. Это создает наиболее благоприятные условия для выработки пенициллина.

На среде с глюкозой ускоряются все обменные процессы. Максимум образования пенициллина наблюдается приблизительно через 50 ч после начала развития гриба, а глюкоза используется организмом за первые 30–40 ч роста. В присутствии же лактозы максимальный выход пенициллина наблюдается через 6–7 сут, а лактоза потребляется грибом приблизительно за 6 сут. Однако в среде для развития *P. chrysogenum* лактозу можно заменять легко используемыми углеводами — глюкозой, сахарозой, галактозой, ксилозой, крахмалом (гидролизованным) — при условии их непрерывного введения в среду. Например, если глюкозу подавать в среду непрерывно со скоростью 0,032% в 1 ч, выход пенициллина на кукурузной среде по сравнению с лактозой повышается на 15%, а на синтетической — на 65%.

При промышленном получении пенициллина для борьбы со вспениванием среды используют, как правило, растительные масла. Однако эти вещества не являются инертными компонентами субстрата; определенные концентрации, например, подсолнечного масла влияют на биосинтез пенициллина. Добавление подсолнечного масла к среде в концентрации, не превышающей 1%, не влияет на образование антибиотика, а повышение концентрации масла приводит к резкому снижению выхода бензилпенициллина (рис. 50). Токсический эффект масла, по-видимому, носит косвенный характер, связанный с нарушением



концентрации масла приводит к резкому снижению выхода бензилпенициллина (рис. 50). Токсический эффект масла, по-видимому, носит косвенный характер, связанный с нарушением

Рис. 50. Влияние подсолнечного масла на биосинтез пенициллина (по Ниури, Ленгель, 1965)

диффузии кислорода в клетки мицелия, обусловленным образованием масляной пленки между стенкой клетки и газообразной фазой культуральной жидкости.

Подсолнечное масло в концентрации от 0,1 до 10% токсического воздействия на рост мицелия гриба не оказывает.

При развитии продуцента антибиотика во встряхиваемых колбах без добавления масел выход пенициллина резко снижается. Добавление органических кислот (малеиновой в количестве 1 г/л один раз в сутки или янтарной — 1 г/л два раза в сутки) в опытах на качалках стимулирует выработку антибиотика. Ненасыщенные жирные кислоты, этанол, молочная и лимонная кислоты также способствуют повышению образования пенициллина. В ферментерах с перемешиванием после добавления сахара, малеиновой и янтарной кислот и при регулировании вспенивания посредством небольших количеств смеси растительных и углеводородных масел выход антибиотика достигал большого значения. Не все масла используются грибом, часть масел окисляется до CO_2 , а некоторое количество их включается в различные фракции плесени. Только следы масла, меченного ^{14}C , включаются в пенициллин.

Важное значение в процессе биосинтеза пенициллина имеет сера. Продуценты антибиотика в качестве источников серы хорошо используют сульфаты (например, Na_2SO_4) и тиосульфаты (например, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

Ионы меди, взятые в концентрации большей, чем 2 мг/л, полностью подавляют образование пенициллина, но не влияют на рост гриба. Если же к среде, содержащей медь в концентрации, которая тормозит биосинтез антибиотика, добавить железо (1 мг/л), эффект торможения снимается.

В нейтральных и щелочных средах тяжелые металлы вступают в реакцию с фосфатами, образуя нерастворимые соли; вместе с тем они могут синтезировать хелаты с аминокислотами, ди- и трикарбоновыми кислотами, имеющимися в среде.

В качестве источников фосфора *P. chrysogenum* может использовать как фосфаты ($\text{KН}_2\text{PО}_4$), так и фитаты (соли инозитфосфорных кислот). Продукт пенициллина содержит фермент, разрушающий фитин, в результате чего освобождается неорганический фосфор.

Для развития гриба и биосинтеза пенициллина в первой фазе оптимальная температура 30 °С, во второй фазе — 20 °С.

Большое значение для образования пенициллина имеет аэрация культуры; максимальное накопление его происходит при степени аэрации, близкой к 1.

Уменьшение интенсивности аэрации или ее чрезмерное увеличение снижает биосинтез антибиотика. Существенную роль при этом играет перемешивание культуры. От способа перемешивания культуральной жидкости зависят форма и величина глубинных колоний, состояние которых определяет способность мицелия образовывать пенициллин. В процессе развития *P. chrysogenum* в среде могут накапливаться продукты обмена гриба, ингибирующие биосинтез пенициллина. Причина их образования, вероятно, связана с автолизом мицелия. Добавки питательных веществ в ходе развития продуцента антибиотика уменьшают автолиз мицелия, что способствует минимальному образованию токсических веществ.

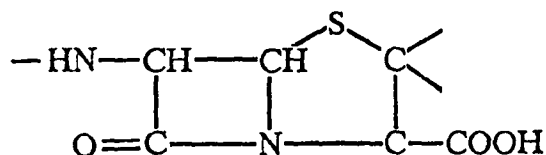
Таким образом, для высокого выхода пенициллина требуются следующие условия развития гриба: хороший рост мицелия, достаточное обеспечение культуры питательными веществами и кислородом, оптимальная температура (в период первой фазы 30 °С, в период второй фазы 20 °С), уровень рН ниже 8,0 (но не ниже 7,0), медленное потребление углеводов, подходящий предшественник. Для начального периода фазы роста гриба желательно иметь рН среды ниже 7,0 и обязательно присутствие в среде легкодоступного источника углерода. Медленное потребление углеводов во время фазы образования пенициллина достигается либо использованием лактозы, либо дробным внесением глюкозы или другого сахара.

В. Курилович с соавторами (1980) изучили ультраструктуру клеток продуцента пенициллина *P. chrysogenum* в связи с локализацией антибиотика в процессе его биосинтеза. Они выяснили, что к клеточной мембране клетки гриба примыкают многочисленные пузырьки диаметром около 40 нм, содержащие пенициллин. Эти образования, напоминающие аппарат Гольджи, по-видимому, играют существенную роль в переносе пенициллина от цитоплазмы к вакуолям и затем к поверхности клетки.

Химическое строение пенициллина

Изучение химической структуры пенициллина проводилось одновременно английскими и американскими исследователями в период Второй мировой войны.

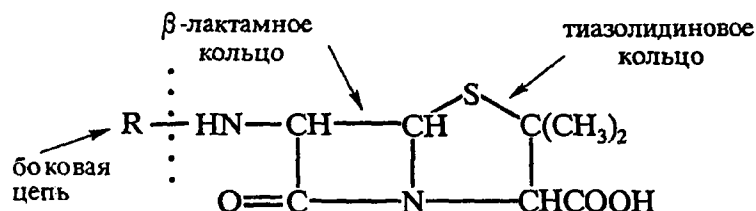
Основным ядром молекулы антибиотика является бициклическая структура, состоящая из β -лактамного и тиазолидинового колец:



В биосинтезе этой структуры участвуют две аминокислоты: L-цистеин и L-валин.

Окончательная β -лактамная структура пенициллина подтверждена лишь в 1949 г. (Crowfoot et al.).

Общее строение молекулы пенициллина представлено следующей формулой:



6-Аминопенициллановая кислота

Предшественники биосинтеза пенициллина

В процессе жизнедеятельности *P. chrysogenum* образует разные типы пенициллинов (пенициллины G, X, F, V, O, K), отличающиеся строением радикала молекулы (R), антибиотической активностью и спектром биологического действия.

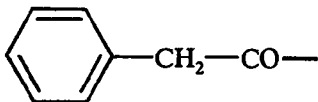
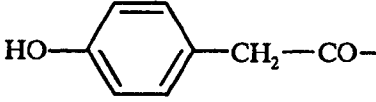
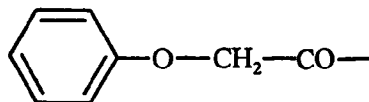
Большую роль в биосинтезе пенициллина определенного типа и в увеличении его выхода играют так называемые предшественники. Предшественниками могут служить только те органические вещества субстрата, которые в процессе биосинтеза антибиотика тем или иным путем включаются в его молекулу. Продуцент пенициллина включает в молекулу антибиотика некоторые органические соединения или часть их без предварительного расщепления на отдельные фрагменты и последующего ресинтеза.

Работами М.М. Левитова с сотрудниками установлено, что в отдельных случаях при введении одного предшественника в среду образуется несколько пенициллинов. Эти наблюдения показывают, что вещества, применяемые в качестве предшественников, в процессе развития гриба также могут под действием ферментов, образуемых им, изменяться, а затем включаться в биосинтез

молекулы пенициллина наряду с другими компонентами среды. Под воздействием гриба предшественники способны окисляться до CO_2 и воды. Различные типы пенициллинов, образуемые грибом, близки по химическому строению. Отличие в их структуре определяется лишь строением радикала. Состав и название некоторых типов пенициллинов приведены в табл. 77.

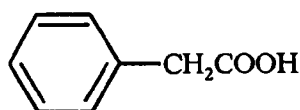
Таблица 77

Различные типы природных пенициллинов и строение их радикалов

Название пенициллина		Строение радикала R	Активность натриевых солей в отношении <i>Micrococcus pyogenes</i> , ед./мг
общепринятое	условное		
Бензилпенициллин	G		1667
п-Оксибензилпенициллин	X		900
2-Пентенилпенициллин	F	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2-\text{CO}-$	1600
п-Гептилпенициллин	K	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2-\text{CO}-$	2300
п-Амилпенициллин	Дигидро F	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2-\text{CO}-$	1500
Феноксиметилпенициллин	V		1670
Аллилмеркаптометилпенициллин	O	$\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{SCH}_2-\text{CO}-$	1630

Радикал соединяется с общим для всех типов ядром молекулы пенициллина, называемым 6-аминопенициллановой кислотой, состоящей из β -лактамного и тиазолидинового колец.

А. Мойер и Р. Когхилл (1947) одними из первых установили, что при добавлении к культуре гриба фенилуксусной кислоты



выход пенициллина повышается на 30–35%.

Фенилуксусная кислота и многие ее производные — предшественники биосинтеза пенициллина. Присутствие в кукурузном экстракте фенилэтиламина $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ способствует образованию бензилпенициллина; в данном случае фенилэтиламин выступает также в качестве предшественника бензилпенициллина (пенициллина G).

Зависимость образования того или иного типа пенициллина от наличия в среде предшественника представлена в табл. 78.

Влияние добавления предшественников к кукурузной среде на образование пенициллина культурой *P. chrysogenum*
(no Higuchi et al., 1946)

Предшественник	Возраст культуры, ч	Общее содержание пенициллина, ед./мл	Содержание различных пенициллинов в смеси, %		
			G	X	K
Без предшественника	60	161	44	3	53
	108	559	22	8	70
β-Фенилэтиламин (C ₆ H ₅ · CH ₂ · CH ₂ · NH ₂)	60	267	93	2	5
	108	726	78	5	17
Фенилацетамид (C ₆ H ₅ CH ₂ C(=O)NH ₂)	60	335	99	1	—
	108	616	78	2	20
Фенилуксусная кислота (C ₆ H ₅ CH ₂ COOH)	60	448	97	3	—
	108	673	75	—	25
n-Оксифенилуксусная кислота (HO · C ₆ H ₄ · CH ₂ COOH)	60	209	39	26	35
	108	462	34	10	56

Данные табл. 78 позволяют сделать следующие выводы: 1) при развитии гриба в среде без дополнительного внесения предшественника образуется около 45% бензилпенициллина и около 53% пенициллина К, с возрастом культуры биосинтез сдвигается в сторону образования пенициллина К (до 70%); 2) при добавлении к среде производных фенилуксусной кислоты увеличивается общий выход пенициллинов и меняется соотношение образующихся компонентов в сторону уменьшения концентрации К-пенициллина и увеличения концентрации G-пенициллина, количество которого в зависимости от возраста мицелия достигает 75–99% от общего содержания в культуральной жидкости смеси пенициллинов.

В процессе культивирования *P. chrysogenum* в среде, не содержащей фенилуксусной кислоты, в культуральной жидкости накапливаются серосодержащие соединения не β-лактамного характера. По хроматографической активности они близки к цистеину CH₂SH–CHNH₂–COOH и метионину CH₂SCH₃–CH₂–CHNH₂–COOH.

Добавление к среде для культивирования гриба фенилуксусной кислоты способствует более интенсивному превращению серосодержащих компонентов в соединение β-лактамного характера. Различные штаммы *P. chrysogenum* по-разному относятся к предшественнику: чем активнее штамм, тем «экономнее» он использует такой предшественник, как фенилацетамид.

В зависимости от штамма для синтеза антибиотика используются разные количества предшественников (от 0,1 до 10%). При этом от 5 до 30% предшественника остается в среде, а большая часть его окисляется организмом до CO_2 и воды, т.е. потребляется по другим путям обмена веществ. Однако в определенных условиях отдельные штаммы превращают в антибиотик практически весь объем предшественника (фенилацетамид), если его начальная концентрация не превышает 1 мг/мл.

При добавлении к синтетической среде 0,1% феноксиуксусной кислоты *P. chrysogenum* образует феноксиметилпенициллин (пенициллин V). На среде с кукурузным экстрактом в присутствии того же предшественника наряду с пенициллином V синтезируются и пенициллины других типов (до 25% от общего выхода антибиотиков). По данным С.Ф. Русинова (1992), высокоактивный штамм *P. chrysogenum* не способен синтезировать молекулу феноксиметилпенициллина без внесения в среду предшественника феноксиуксусной кислоты. В этих условиях образуются пенициллинподобные вещества, имеющие β -лактамную структуру, но лишенные биологической активности. Среди различных пенициллинов феноксиметилпенициллин значительно более устойчив в кислой среде, что существенно отличает его от бензилпенициллина и других пенициллинов.

Предшественники биосинтеза пенициллина (фенилуксусная кислота, фенилацетамид, феноксиуксусная кислота) при определенных концентрациях и рН среды оказывают токсическое действие на *P. chrysogenum*. Из названных предшественников фенилуксусная кислота наименее токсична. Добавление фенилуксусной кислоты в среду при концентрации выше 500 мкг/мл угнетает рост мицелия гриба, особенно в первые 24 ч его развития. Добавление же этой кислоты к субстрату в количестве от 100 до 500 мкг/мл, наоборот, стимулирует рост мицелия плесневого гриба (рис. 51). Оптимальная концентрация фенилуксусной кислоты, добавленной через 24 ч после начала развития *P. chrysogenum*, обеспечивающая наибольший выход пенициллина (через 72 ч развития гриба), 500–1000 мкг/мл (рис. 52). Одновременное внесение в среду фенилуксусной кислоты в концентрации 1000 мкг/мл и 1% подсолнечного масла полностью прекращает биосинтез пенициллина при нормальном росте гриба.

По мнению М.М. Левитова (1957), процесс биосинтеза определенного пенициллина при добавлении к среде предшественника с биологической точки зрения представляет собой процесс обезвреживания токсического для организма вещества путем связывания его с продуктами обмена гриба в результате «защитного синтеза». Этим и объясняется эффект образования пенициллина при повтор-

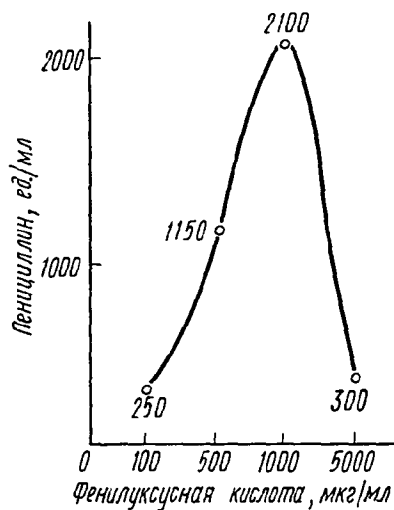
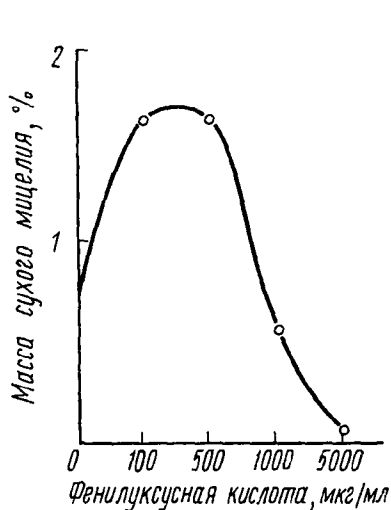


Рис. 51. Влияние фенилуксусной кислоты на развитие мицелия *Penicillium chrysogenum* (по Ниури, Ленгель, 1965)

Рис. 52. Влияние фенилуксусной кислоты, добавленной через 24 ч, на биосинтез пенициллина грибом *Penicillium chrysogenum* (по Ниури, Ленгель, 1965)

ном введении в среду, например, фенилуксусной кислоты; повторное введение предшественника вызывает ответную реакцию организма, характеризуемую усиленным процессом связывания.

Идея о детоксикации вредного (вредных) для микроорганизма вещества при образовании некоторых антибиотиков позднее была развита Х. Даром и А. Каном. Такие «двухкомплектные» антибиотики, как актиномицины, макролиды и др., по мнению ученых, синтезируются в результате обезвреживания некоторых токсичных для организмов веществ путем связывания их с другими соединениями, что способствует образованию продукта, нейтрального для продуцента. Например, в состав макролидных антибиотиков входит углеводный компонент пираноза. Х. Дар и А. Кан предполагают, что выработка указанных антибиотиков обусловлена реакцией обезвреживания этого сахара с образованием дезоаминов. Биосинтез же актиномицинов, по их мнению, связан с обезвреживанием гетероциклических фрагментов путем их пептидизации.

Основная масса пенициллина в процессе биосинтеза выделяется в окружающую среду, и лишь небольшое количество антибиотика содержится в мицелии гриба и клеточной стенке (табл. 79). Относительное содержание пенициллина в экстракте из мицелия и стенок клеток по отношению к общему количеству антибиотика остается постоянным и не превышает 0,8%.

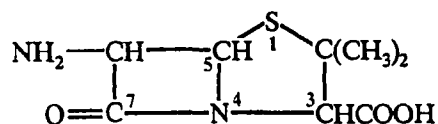
Полусинтетический способ получения пенициллинов

В настоящее время большое значение имеет так называемый полусинтетический (биологический + химический) способ получения аналогов природного пенициллина, обладающих рядом

Содержание пенициллина в культуральной жидкости, экстрактах из мицелия и стенок клеток в процессе развития гриба

Время инкубации, ч	Содержание пенициллина			Содержание пенициллина в мицелии и стенках клеток, % от общего количества
	в культуральной жидкости, ед./мл	в мицелии, ед./мг	стенках клеток, ед./мг	
24	2520	10	10	0,79
64	56 600	288	71	0,63
93	70 300	425	87	0,73

ценных свойств. Исходным продуктом в указанном синтезе служит 6-аминопенициллановая кислота (6-АПК):



Это вещество практически лишено антибиотических свойств, его биологическая активность составляет примерно 0,002 активности бензилпенициллина.

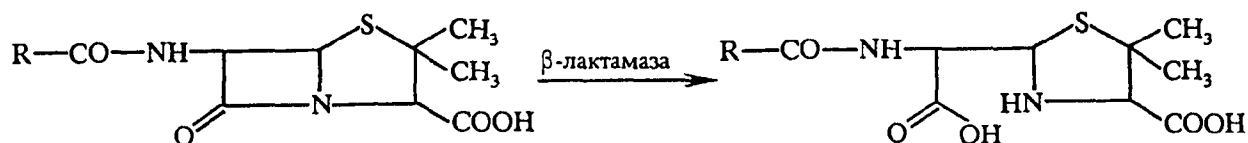
Кислоту получают в результате биосинтеза при развитии *P. chrysogenum* в специфических условиях его культивирования.

Впервые на возможность получения 6-АПК в результате изменения условий культивирования гриба указал К. Като (1953). Позже это соединение предложили получать из культуральной жидкости *P. chrysogenum*, выращенного в среде без предшественника. Однако наиболее перспективный способ получения 6-АПК — ферментативный метод гидролиза молекулы бензилпенициллина с участием иммобилизованной пенициллинацилазы.

Фермент пенициллинацилаза (пенициллинамидаза) гидролизует бензилпенициллин с образованием 6-аминопенициллановой кислоты и фенилуксусной кислоты, соединенных в молекуле антибиотика карбоксиламидной связью. Пенициллинацилаза образуется различными группами микроорганизмов. Все продуцирующие пенициллин грибы способны образовывать этот фермент. Пенициллинацилаза, выделенная из плесневых грибов, дрожжей и актиномицетов, обладает более высокой активностью по отношению к феноксиметил-, п-гепти- и п-аминопенициллинам; фермент же, полученный из бактерий, осуществляет гидролиз бензилпенициллина быстрее, чем других пенициллинов. В последнее время предложен способ получения иммобилизованных клеток *Escherichia coli* с высокой пенициллинацилазной активностью, пригодных для многократного применения при ферментативном получении 6-аминопенициллановой кислоты. Получение этой кислоты в больших масштабах осуществляется с

помощью иммобилизованной пенициллинамидазы. Ферментативный метод гидролиза бензилпенициллина по сравнению с кислотным гидролизом имеет ряд преимуществ в отношении выхода и чистоты основного продукта.

Наряду с пенициллинацилазой имеется фермент пенициллиназа* (пенициллин-β-лактамаза), вызывающий у бензилпенициллина гидролитическое расщепление β-лактамного кольца с образованием биологически неактивной бензилпенициллоиновой кислоты:



Этот фермент образуется как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями. Среди грамположительных бактерий β-лактамазы продуцируются преимущественно стафилококками, и процесс их образования связан с плазмидной локализацией генов. Крайне редко β-лактамазы вырабатываются энтерококками. Названные ферменты грамположительных бактерий активно воздействуют на природные и полусинтетические пенициллины за исключением оксациллина и метициллина.

Бета-лактамазы, вырабатываемые грамотрицательными бактериями, можно разделить на две группы: ферменты, кодируемые плазмидными генами, и ферменты, кодируемые хромосомными генами. Первая группа энзимов, вырабатываемая бактериями в больших концентрациях, характеризуется широким спектром действия, они способны гидролизовать как пенициллины, так и цефалоспорины. Ферменты второй группы образуются в незначительном количестве, гидролизуют или пенициллин, или цефалоспорин.

Некоторые β-лактамные антибиотики могут индуцировать биосинтез этих β-лактамаз.

Пенициллин-бета-лактамаза и пенициллинацилаза могут одновременно продуцироваться разными видами микроорганизмов (*E. coli*, *Nocardia*, *S. lavendulae* и др.). Среди изученных штаммов *E. coli* 79% способны образовывать пенициллиназу, 72% — ацилазу, 59% — продуцировали оба фермента одновременно, 6% штаммов не образовывали эти ферменты.

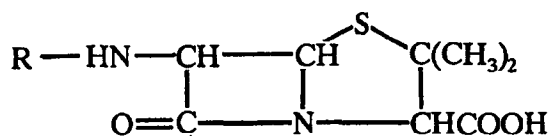
Наиболее широко в медицинской практике применяются полусинтетические пенициллины, полученные на основе 6-аминопенициллановой кислоты.

* Термин «пенициллиназа» впервые был использован в 1940 г. И. Абрагамом и Е. Чейном, которые показали, что экстракты, выделенные из клеток бактерий разных видов, способны инактивировать пенициллин.

6-аминопенициллановую кислоту подвергают химическому ацилированию и получают соответствующие аналоги пенициллина, обладающие иными свойствами, чем природные пенициллины. В результате удалось получить около 50 тыс. полусинтетических пенициллинов, из них около 35 антибиотиков применяются в клинике (часть из них приведена в табл. 80).

Таблица 80

Наиболее ценные полусинтетические пенициллины, полученные в результате химической модификации природного антибиотика



Аминопенициллановая кислота

Название пенициллина	Строение радикала (R)
Амоксициллин	
Ампициллин	
Диклоксациллин	
Карбенициллин	
Метициллин	
Нафциллин	
Оксациллин	

Пенициллин (бензилпенициллин) необходим не только как химиотерапевтический препарат, но и как исходный материал для получения 6-аминопенициллановой кислоты.

Из общего количества природного пенициллина, выпускаемого промышленностью (около 17 тыс. т), примерно 35% используется непосредственно в медицинской практике, а около 65% идет на получение 6-аминопенициллановой кислоты.

Все известные пенициллины подобно бензилпенициллину подавляют синтез клеточной стенки бактерий.

Наиболее ценными с практической точки зрения полусинтетическими препаратами пенициллина 1-го поколения следует считать ампициллин, оксациллин, клоксациллин, нафциллин, метициллин, амоксициллин.

Большим достижением последних лет в создании полусинтетических пенициллинов следует считать получение ациламинопенициллинов (азлоциллин, мезлоциллин, пиперациллин) — пенициллинов 2-го поколения, которые более эффективны в отношении определенных штаммов энтеробактерий и псевдомонад, чем ампициллин и карбенициллин.

Задачей получения новых пенициллинов является разработка препаратов, более устойчивых к β -лактамазам, со сниженной способностью к индуцированию синтеза β -лактамаз, обладающих пролонгированным действием.

Фазы процесса развития гриба и биосинтеза пенициллина

Изменения, происходящие в мицелии гриба *P. chrysogenum* и культуральной жидкости в процессе биосинтеза пенициллина, имеют определенный фазовый характер.

Согласно положению В.Н. Шапошникова о двухфазности ряда микробиологических процессов, развитие *P. chrysogenum*, биохимические изменения в субстрате и биосинтез пенициллина при условии, что гриб начинает развиваться при засеве среды спорами или мицелием, не перешедшим еще в стадию антибиотикообразования, могут быть разделены на две фазы.

В *первой фазе* развития наблюдается усиленный рост гриба, происходит энергичное потребление источников углерода, усиливается азотный обмен, рН среды значительно возрастает и потребление кислорода высокое. В этой фазе антибиотик практически не вырабатывается.

Во *второй фазе* значительно снижается прирост мицелия гриба, уменьшается интенсивность поглощения кислорода, рН среды почти не изменяется. Основная масса источника углерода уже использована. В этот период образуется основное количество пенициллина (рис. 53).

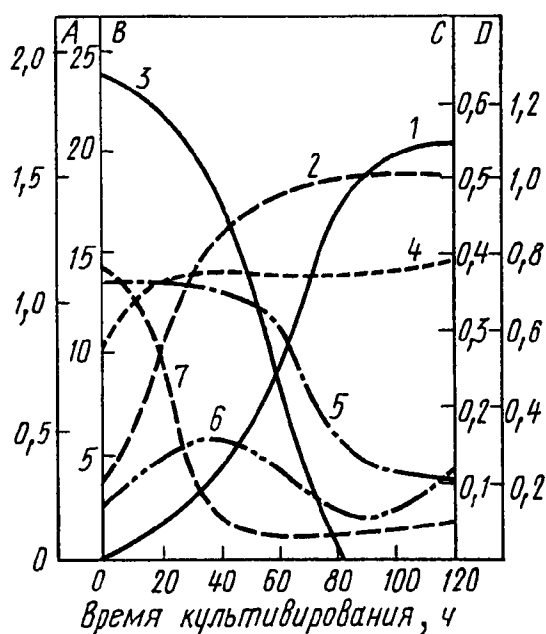
З.Э. Беккер с соавторами (1956–1957 гг.) описали шесть условно выраженных возрастных фаз, определяемых при цитологическом и цитохимическом изучении продуцентов пенициллина.

Установлено, что в заметном количестве пенициллин начинает продуцироваться лишь с IV возрастной фазы гриба. Максимум накопления антибиотика в культуральной среде приходится на VI фазу в период автолиза.

Определение возрастных фаз и связанного с ними биосинтеза пе-

Рис. 53. Биохимические изменения в среде в связи с образованием пенициллина при развитии гриба в ферментере (по Herold, 1957):

1 — содержание пенициллина в среде, ед./мл × 1000 (шкала А), 2 — масса сухого мицелия, г/100 мл (шкала А), 3 — лактоза, мг/мл (шкала В), 4 — рН 10 (шкала D), 5 — сульфат, мг/мл (шкала С), 6 — аммиачный азот, мг/мл (шкала D), 7 — аминный азот, мг/мл (шкала D)



нициллина путем микроскопического контроля за состоянием мицелия позволяет установить: 1) характер развития гриба с выяснением его возрастного состояния, пригодного для использования посевного материала, и контроля за ходом образования антибиотика; 2) дефекты развития и их возможные причины; 3) момент окончания развития гриба в ферментерах.

Изменения химического состава мицелия *P. chrysogenum* изучены в процессе его развития на среде, указанной на с. 344. Данные по изменению содержания общего азота, белка, углеводов и жира представлены в табл. 81.

Таблица 81

Изменения химического состава мицелия *P. chrysogenum* в динамике его развития (по Баскаковой, Якимову, 1965)

Возраст мицелия, ч	Биомасса, г/100 мл культуральной жидкости	Содержание, % от сухого вещества					Жир, % от сухого вещества
		общего азота	белка	углеводов			
				моносахаров	дисахаров	клетчатки	
24	0,82	8,8	49,2	0,3	1,5	7,0	4,1
48	1,40	7,2	41,9	0,4	1,0	6,6	3,2
72	1,62	7,3	42,8	0,6	0,5	7,9	3,2
96	1,40	6,2	34,6	1,8	—	7,2	1,8
120	1,23	4,9	26,8	1,2	—	7,1	1,5

Количество общего азота и белка в мицелии в ходе развития гриба уменьшается. Содержание моносахаров в мицелии в период максимального биосинтеза пенициллина (96 ч) увеличивается

примерно в 6 раз по сравнению с начальным периодом развития *P. chrysogenum*, количество дисахаров уменьшается.

Аминокислотный состав белков мицелия пеницилла в качественном отношении не зависит ни от среды, на которой развивается гриб, ни от возраста мицелия. Однако количество отдельных аминокислот значительно изменяется в ходе развития пеницилла, оно также зависит от состава среды. Всего в мицелии гриба определено 12 аминокислот (цистеин + цистин, лизин, гистидин, аргинин, гликокол, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, аланин, тирозин, валин, фенилаланин, лейцин). Изменение содержания указанных аминокислот в гидролизатах белка мицелия *P. chrysogenum* в ходе развития гриба приведено в табл. 82.

Таблица 82

Изменение содержания аминокислот белка *P. chrysogenum* (% от сухого вещества) в динамике роста гриба (по Баскаковой, Якимову, 1965)

Аминокислота	Время культивирования гриба, ч				
	24	48	72	96	120
Цистеин + цистин	3,85	1,16	2,42	0,59	0,40
Лизин	4,40	2,16	2,72	2,18	1,52
Гистидин	1,95	0,44	0,49	0,57	0,44
Аргинин	4,39	2,61	1,90	0,98	1,69
Гликокол	0,29	0,91	0,62	0,52	0,35
Глутаминовая кислота	2,23	0,78	0,58	0,60	0,18
Аспарагиновая кислота	0,25	1,06	1,18	0,83	0,61
Аланин	5,08	1,79	1,58	1,58	0,88
Тирозин	2,17	0,56	0,46	0,44	0,25
Валин	1,13	0,75	0,78	0,56	0,49
Фенилаланин	2,29	2,45	1,36	1,06	1,01
Лейцин	1,76	0,96	0,69	0,86	0,63

Лизин $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_4-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$, содержащийся в мицелии в значительном количестве, в период развития гриба угнетающе действует на биосинтез пенициллина покоящимися клетками. Вместе с тем примерно четверть штаммов *P. notatum*, не содержащих лизин, не способна к биосинтезу пенициллина.

Действие лизина, угнетающее биосинтез пенициллина, может быть снято добавлением к субстрату α -аминоадипиновой кислоты $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_3-\text{CHNH}_2-\text{COOH}$. Это хорошо видно на приведенной ниже схеме по ингибированию лизином фермента гомоцитратсинтетазы (см. рис. 54).

Процесс биосинтеза пенициллина ведут при самом тщательном соблюдении стерильности всех операций, так как загрязнение культур посторонней микрофлорой резко снижает накопление

антибиотика. Известно, что многие бактерии, обычно встречающиеся в воздухе (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *E. coli* и др.), способны образовывать фермент β-лактамазу, расщепляющий пенициллин. Особенно активно продуцируют этот фермент *B. subtilis* и *B. cereus*. Загрязнение культуры гриба одной из этих бактерий может резко снизить количество антибиотика в культуральной жидкости.

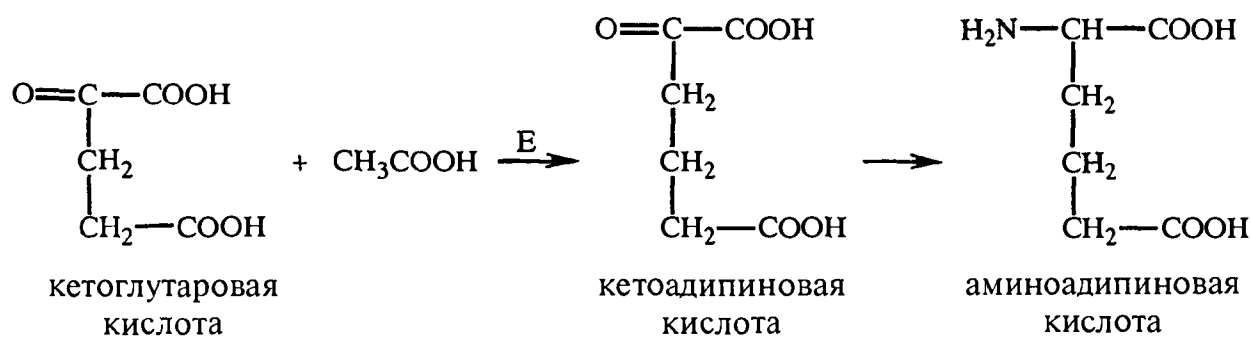
Температурный оптимум действия лактамазы 37 °С. Одним из активных продуцентов названного фермента оказалась туберкулезная палочка *Mycob. tuberculosis*. Возможно, именно с этим свойством связана чувствительность туберкулезных палочек к пенициллину.

Пути биосинтеза молекулы пенициллина

Как уже отмечалось (см. с. 349–350), направленный биосинтез того или иного типа пенициллина обеспечивается добавлением к среде для культивирования *P. chrysogenum* фенилуксусной кислоты или ее производных, а также других соединений — предшественников молекулы пенициллина. Следовательно, эти соединения, включающиеся в боковую цепь молекулы пенициллина, определяют направленность биосинтеза антибиотика. Установлены пути биосинтеза основной бициклической структуры пенициллина — 6-аминопенициллановой кислоты и всей молекулы антибиотика.

Для этого были использованы высокоэффективные методы исследования, в том числе применение протопластов грибов (клеток, лишенных стенок) и их лизатов, мутантов грибов — продуцентов этих антибиотиков, блокированных на разных этапах биосинтеза молекулы пенициллина, а также меченые соединения, в частности аминокислоты, входящие в молекулу антибиотика.

Молекула пенициллина образуется из L-цистеина, L-валина и неполярных карбоновых кислот — предшественников бокового радикала молекулы пенициллина. Кроме указанных соединений обязательным компонентом биосинтеза пенициллина является L-α-аминоадипиновая кислота (L-α-ААК), которая образуется из кетоглутарата и ацетил-КоА при участии фермента гомоцитрат-синтетазы по следующей схеме:



Однако в первой фазе развития *P. chrysogenum* на этой стадии биосинтеза может происходить ингибирование фермента гомоцитратсинтетазы конечным продуктом метаболизма л и з и н о м, как это

показано на рис. 54.

Первым этапом биосинтеза молекулы пенициллина следует считать образование трипептида: L-2-аминоадипил-L-цистеинил-D-валина (LLD). В начале процесса образуется дипептид (L-α-аминоадипил-L-цистеин), который

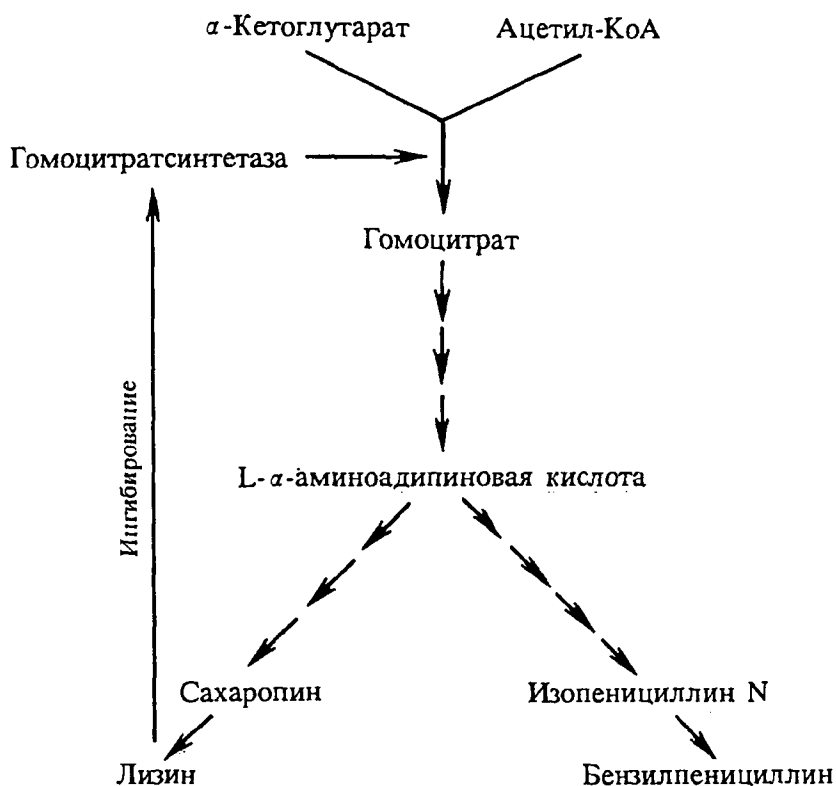
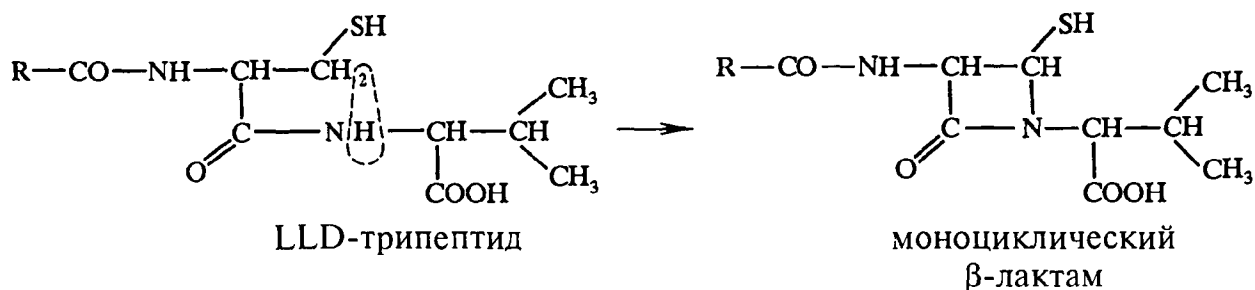


Рис. 54. Схема ингибирования гомоцитратсинтетазы лизином (по Беккеру и др., 1990)

затем, взаимодействуя с L-валином, образует трипептид. LLD-трипептид превращается в изопенициллин N через моноциклический β-лактам:



Этот трипептид был обнаружен в мицелии продуцента пенициллина *P. chrysogenum*. Его синтез осуществлен бесклеточным экстрактом *P. chrysogenum*. Этот трипептид рассматривается в качестве основного промежуточного соединения в процессе биосинтеза β-лактама молекулы антибиотика.

β-Лактам образуется в результате замыкания кольца между C-3-цистеином и NH-группой валина. Этот процесс — первая стадия циклизации LLD-трипептида в первичный антибиотик — изопенициллин N.

Первоначально возникновение основного ядра молекулы пенициллина — 6-аминопенициллановой кислоты (6-АПК) — было показано при культивировании гриба в среде, не содержащей предшественника, а затем 6-АПК выделили из культуральной жидкости продуцента пенициллина и определили ее строение.

Позднее многие исследователи искали у *P. chrysogenum* фермент, превращающий молекулу 6-АПК в пенициллин, т.е. осуществляющий ее ацилирование. В результате в 1968 г. появилось сообщение о том, что в мицелии гриба найден фермент пеницилинацилтрансфераза, способный переносить ацильную группу разных пенициллинов на 6-АПК. Образование фермента совпадает с периодом активного биосинтеза пеницилина, следовательно, фермент непосредственно участвует в этом процессе.

Таким образом, можно утверждать, что изопенициллин N и 6-АПК и есть непосредственные предшественники процесса образования пеницилина.

На основе данных о механизме биосинтеза молекулы пеницилина весь процесс можно представить схематически (рис. 55).

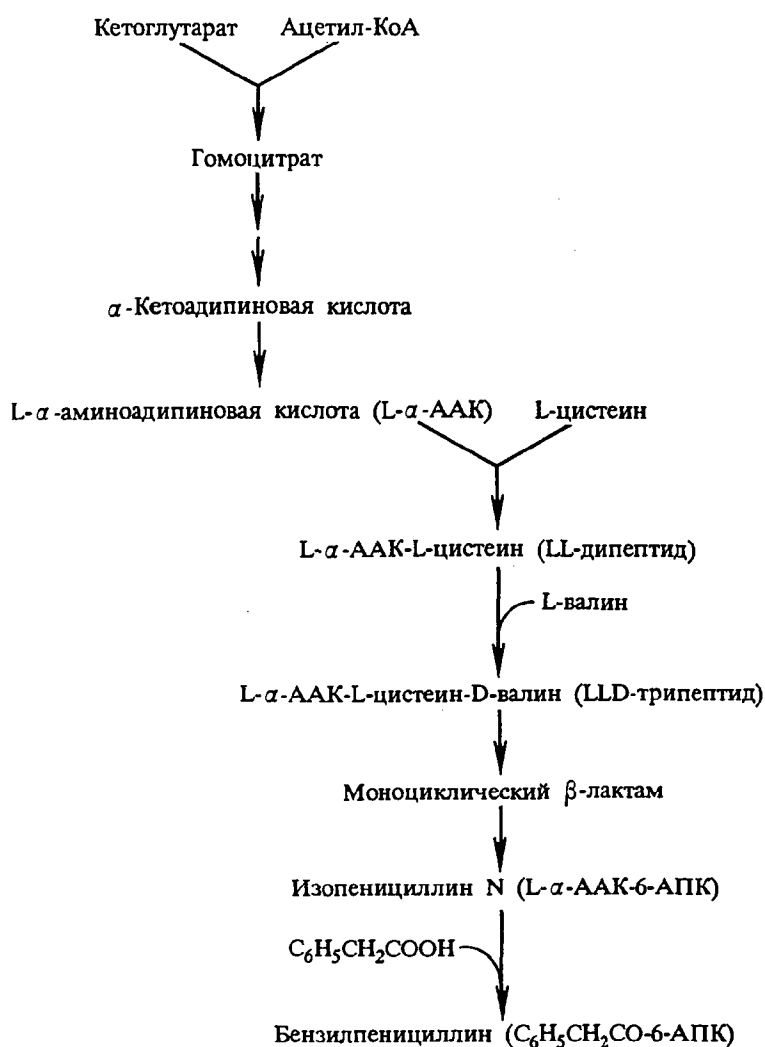


Рис. 55. Схема биосинтеза пеницилина
6-АПК — 6-аминопенициллановая кислота

Выделение пеницилина

Первый этап выделения пеницилина, как и многих других антибиотиков, накапливающихся в культуральной среде, связан с отделением мицелия гриба от культуральной жидкости путем фильтрации или центрифугирования. Во избежание потерь антибиотика мицелий гриба отделяют и промывают.

В настоящее время пенициллин из культуральной жидкости обычно извлекают методом экстракции антибиотика органическими растворителями, не смешивающимися с водой (амилацетат, хлороформ, бутилацетат, бутиловый спирт и др.).

Процесс экстракции антибиотика из культуральной жидкости основан на методе замены растворителей, состоящем в том, что пенициллин в виде свободной кислоты может быть экстрагирован каким-либо растворителем, а затем снова переведен в водный

раствор в виде соли путем добавления определенного количества щелочи. Соли пенициллина плохо растворимы в указанных органических растворителях, поэтому их можно почти количественно перевести из органического растворителя в водный раствор. Повторение таких операций способствует концентрации и очистке препарата.

Действие пенициллина на бактерии

Пенициллин* оказывает антимикробное действие в отношении некоторых грамположительных бактерий (стафилококки, стрептококки и некоторые другие) и практически неактивен в отношении грамотрицательных бактерий и дрожжей. Ниже приведен антимикробный спектр бензилпенициллина:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,004–0,03
<i>S. pneumoniae</i>	0,006–0,06
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,006–0,30
<i>Clostridium tetani</i>	0,02–0,30
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,02–0,30
<i>Streptomyces israeli</i>	0,06–0,30
<i>Nocardia asteroides</i>	30–100
<i>Escherichia coli</i>	20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	100

По характеру действия на микроорганизмы пенициллин — бактериостатический, а в определенных концентрациях — бактерицидный антибиотик. Разные типы природных пенициллинов обладают различной степенью биологической активности. Это особенно заметно в опытах *in vivo* (табл. 83).

Таблица 83

Сравнение биологической активности различных типов пенициллинов в отношении некоторых микроорганизмов в опытах *in vivo*

Тест-организм	Относительная активность			
	бензилпенициллина (G)	2-пенициллина (F)	p-пенициллина (K)	оксибензилпенициллина (X)
<i>Spirochaeta novyi</i>	100	55	35	22
<i>Pneumococcus</i> типа 1	100	85	17	140
<i>Streptococcus haemolyticus</i>	100	100	60	500
<i>S. pyogenes</i>	100	50	9	260
<i>Treponema pallidum</i>	100	17	9	5

* В этом случае имеется в виду бензилпенициллин.

Чувствительные к пенициллину микроорганизмы относительно легко и быстро приобретают устойчивость к антибиотику. Так, *S. aureus* прекращает развитие при концентрации пенициллина 0,05–0,06 ед./мл в среде, но уже при 20 последовательных пересевах с постепенно увеличивающимися концентрациями антибиотика устойчивость стафилококка возрастает в 700 раз, т.е. для остановки роста бактерий требуется концентрация пенициллина, равная 42 ед./мл, а после 40 пересевов их устойчивость возрастает более чем в 5500 раз.

Микроорганизмы, приобретшие устойчивость к определенному типу пенициллина, как правило, резистентны и к другим типам пенициллина. У бактерий устойчивость к пенициллинам связана с их способностью образовывать фермент β -лактамазу.

В ряде случаев микроорганизмы с приобретением устойчивости к пенициллину теряют вирулентность. Но вирулентность восстанавливается после нескольких пассажей через животных и при этом резистентность к антибиотику сохраняется.

Применение в медицине

Пенициллин — наиболее ценное и мощное из известных средств для лечения заболеваний, вызываемых кокками и некоторыми анаэробными палочками. Преимущество пенициллина состоит в том, что этот препарат — один из наименее токсичных антибиотиков, используемых в медицинской практике. Достаточно указать, что из 4200 больных, получавших пенициллин, только у семи человек отмечены клинически выраженные токсические реакции: температурная реакция у четырех больных, некротоксические реакции со стороны центральной нервной системы у двух больных и местная реакция со стороны слизистой оболочки полости рта у одного больного. Вместе с тем в последние годы наблюдаются случаи аллергических реакций больных на повторное применение пенициллина или его производных. Крайнее проявление аллергии — анафилактический шок после внутримышечного введения пенициллина, иногда заканчивающийся смертью.

Во избежание подобных явлений больным перед введением пенициллина необходимо делать кожные пробы для выяснения возможной чувствительности к антибиотику.

Высокие лечебные свойства и чрезвычайно низкая токсичность способствовали широкому применению пенициллина в медицине. Одним из первых заболеваний, при котором стали применять этот антибиотик, был сепсис (общая гнойная инфекция). Сепсис чаще всего вызывается стафилококками, стрептококками, а иногда и пневмококками. До открытия пенициллина в 90% случаев

септические заболевания кончались летально. В настоящее время процент смертности от сепсиса резко сокращен.

Пенициллин широко применяется в хирургии, успешно используется при лечении остеомиелитов (особенно острых остеомиелитов), карбункулов, инфицированных ран и других заболеваний. Использование пенициллина создало широкие возможности для лечения таких заболеваний, как перитонит и пневмония.

В педиатрической практике пенициллин имеет большое значение при лечении гнойных осложнений после скарлатины (острые лимфадениты, отиты и др.).

Пенициллинотерапия занимает важное место в лечении сифилиса (особенно его ранних форм), который в последнее десятилетие получил очень широкое распространение. С начала 80-х гг., как отмечают И.И. Мавров, М.Н. Бухаров и др. (1989), в мире ежегодно регистрируется 50 млн свежих случаев сифилиса.

Чаще бензилпенициллин применяют внутримышечно, так как при употреблении его в виде таблеток он разрушается под действием желудочного сока.

Применение кислотоустойчивого типа пенициллина — феноксиметилпенициллина — позволяет использовать антибиотик в виде таблеток, что имеет большое значение при лечении детей. В зависимости от характера заболевания суточная доза антибиотика составляет от 200 000 до 1 000 000 ед.

Наиболее широкое применение в медицинской практике находят полусинтетические пенициллины, полученные на основе 6-аминопенициллановой кислоты.

Цефалоспорины (Cephalosporins)

По химическому строению антибиотики принадлежат к группе β -лактамных соединений, близких к пенициллинам, в биосинтезе основного (цефемового) ядра которых участвуют две аминокислоты: L-цистеин и L-валин.

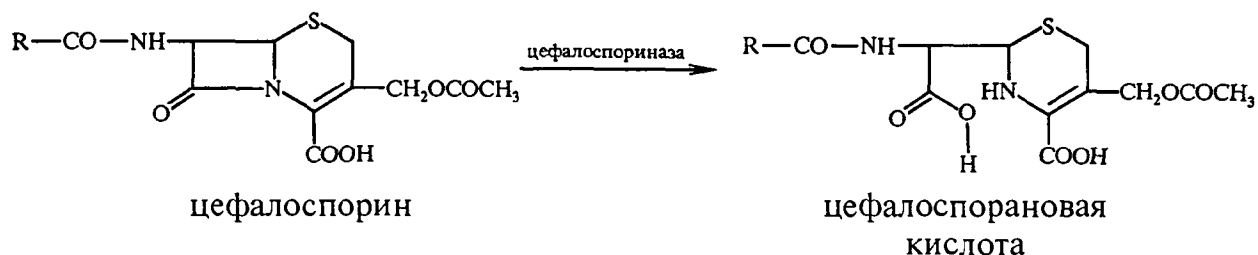
Цефалоспорины — антибиотики, образуемые грибами из рода *Cephalosporium*. Основной продуцент этих антибиотиков — гриб *C. acremonium*, позднее переименованный в *Acremonium chrysogenum*, был выделен в 1945 г.

Впервые сообщение о цефалоспорине было сделано в 1948 г. Джузеппе Бротцу. В культуральной жидкости гриба он обнаружил три варианта цефалоспорины: Р, N и С. Цефалоспорин С — главный антибиотик, на основе которого впоследствии были созданы многочисленные полусинтетические препараты с весьма ценными свойствами.

По биологическим свойствам эти антибиотики несколько отличаются от пенициллина. Цефалоспорины подавляют развитие

грамположительных и грамотрицательных бактерий, но антибиотическая активность их гораздо ниже, чем у пенициллина.

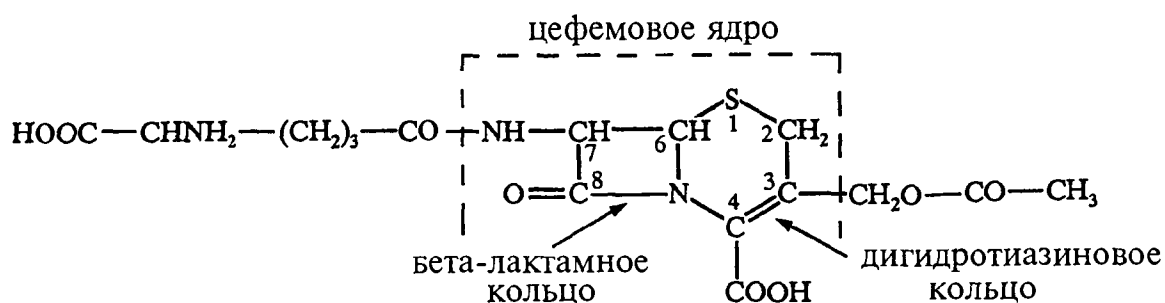
Подобно пенициллину, цефалоспорины содержат β -лактамное кольцо. Имеется аналогичный пенициллину фермент, катализирующий гидролиз β -лактамного кольца цефалоспориана С, — цефалоспориназа. Гидролиз β -лактамного кольца цефалоспориана С при участии цефалоспориназы идет по следующей схеме:



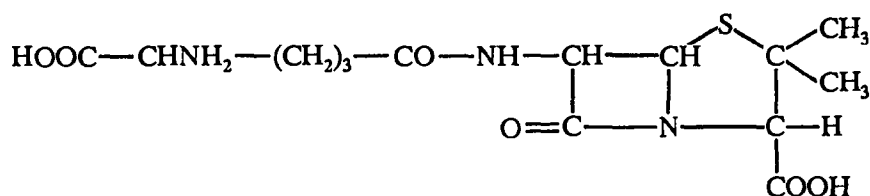
Фермент цефалоспориназа образуется некоторыми бактериями, в частности культурой *Enterobacter cloacae*. Молекула цефалоспориана имеет бициклическую структуру, состоящую из β -лактамного кольца и сопряженного с ним шестичленного дигидротиазинового кольца, и содержит D- α -аминоадипиновую кислоту.

При развитии *Acetomium* sp. как на синтетической, так и на натуральной среде неопределенного состава образуются три формы антибиотика: цефалоспорин С, цефалоспорин N (пенициллин N) и цефалоспорин Р. Пенициллин N впервые получен из культуры гриба в 1951 г. Позднее было установлено, что некоторые актиномицеты (*S. clavuligerus*, *S. lipmanii*, *S. lactamdurans*) наряду с биосинтезом цефамицина образуют и пенициллин N; *S. cinerioresctus* sp. пов. синтезирует только пенициллин N.

Ниже показано строение цефалоспориана С:



и цефалоспориана N (пенициллина N):



Избыток ионов аммония в среде меняет клеточную дифференциацию продуцента цефалоспориана С. У этого организма синтез щелочных экзопротеаз, пептидного антибиотика и конидиогенез контролируется единым механизмом — азотометаболитной репрессией.

По-видимому, репрессирующее действие аминокислот у продуцента этого антибиотика осуществляется путем влияния ионов аммония. Соли аммония подавляют фрагментацию мицелия гриба в артроспоры и конидиогенез в глубинной культуре продуцента цефалоспорина С. При добавлении к синтетической среде D-L-метионина или D-L-норлейцина не позднее чем через 24 ч после начала развития гриба, т.е. в период максимального роста организма, а не в период биосинтеза антибиотика, наблюдается максимальное образование цефалоспорина С. Исключение из среды для развития указанных аминокислот снижает биосинтез антибиотика. Лизин подавляет выработку цефалоспорина, тогда как близкие к нему ϵ -N-ацетил-L-лизин и ϵ -амино-н-капроновая кислота стимулируют биосинтез антибиотика. Однако одновременное добавление к среде D-L-метионина (0,3%) и L-лизина (0,2%) повышает выход цефалоспорина С на 40%.

По-видимому, основная роль метионина — стимулятора образования цефалоспорина — состоит в том, что аминокислота является источником серы для биосинтеза молекулы антибиотика.

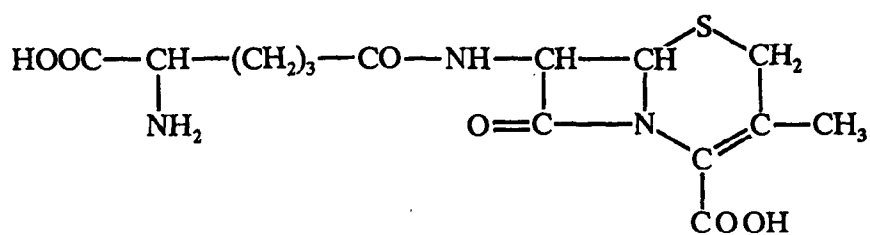
Добавление к среде бетаина $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ \cdot \text{CH}_2\text{COOH}$ или близкого к нему холина $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ \cdot \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, особенно одновременно с метионином, стимулирует образование цефалоспорина С.

Лучшими источниками углерода в среде оказались крахмал и декстрины.

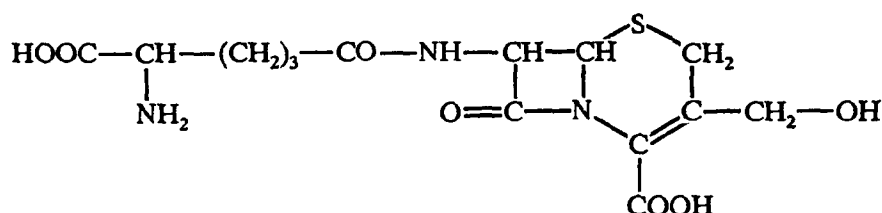
Механизм биосинтеза цефалоспорина

В процессе развития *A. chrysogenum* наряду с цефалоспорином С продуцируется пенициллин N, причем биосинтез последнего идет тем же путем, что и образование изопенициллина N в процессе биосинтеза бензилпенициллина. Следовательно, первичные стадии биосинтеза пенициллина и цефалоспорина идентичны.

Пенициллин N способен превращаться в цефалоспорин. При этом первым продуктом реакции является деацетоксицефалоспорин:



Продуцент цефалоспорина образует фермент, гидроксилирующий деацетоксицефалоспорин в деацетилцефалоспорин



который в результате ацелирования ферментом ацетил-Ко-трансферазой превращается в цефалоспорин С.

Весь процесс биосинтеза цефалоспорина С представлен на рис. 56.

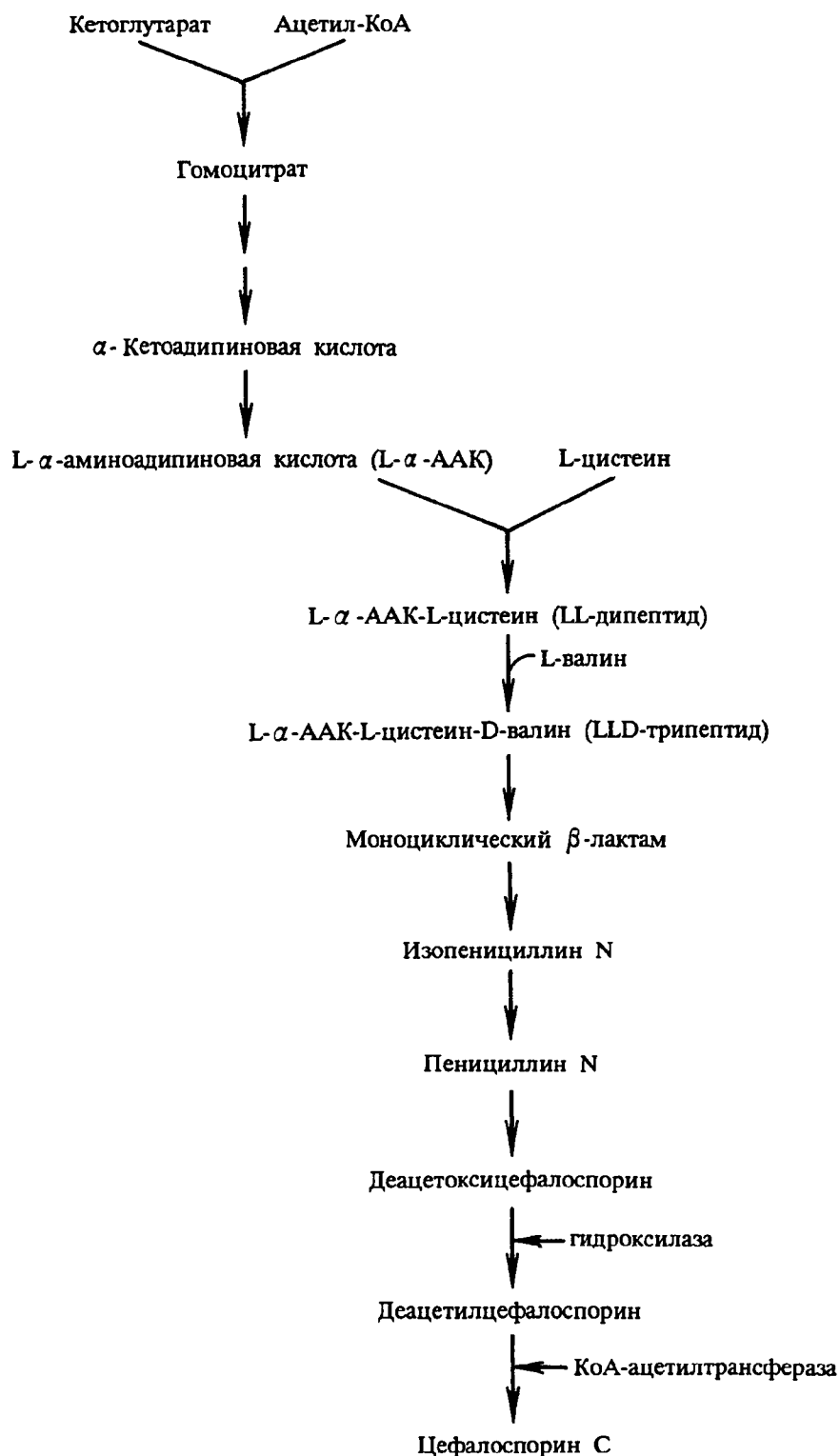


Рис. 56. Схема биосинтеза цефалоспорина С. Изопенициллин N содержит в качестве бокового радикала остаток L-α-аминоадипиновой кислоты (L-α-ААК), тогда как пенициллин N содержит D-α-ААК (образуется культурой *C. actemonium*)

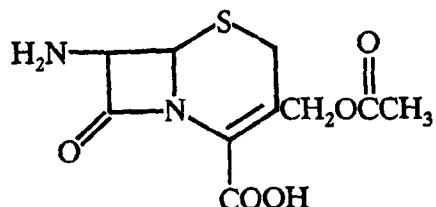
Сравнивая схемы биосинтеза цефалоспорина и пенициллина, можно заметить, что пути образования молекул названных антибиотиков на стадии до биосинтеза изопенициллина N одинаковы.

И лишь после появления этого промежуточного соединения пути биосинтеза молекул цефалоспорины и пенициллина расходятся.

Полусинтетические аналоги цефалоспорины

Методом смешанного (биологического и химического) синтеза получено большое число (более 30 тыс.) аналогов цефалоспорины с весьма разнообразными спектрами биологического действия. Многие из этих соединений имеют важное практическое (клиническое) значение.

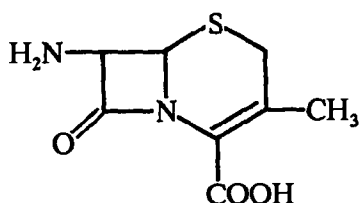
В результате химической модификации основного ядра цефалоспорины — 7-аминоцефалоспороновой кислоты



удалось получить ценные лечебные препараты.

7-Аминоцефалоспороновую кислоту легко получают в результате отщепления остатка аминокедроновой кислоты от молекулы цефалоспорины С под действием фермента ацилазы или химическим путем.

Модификация основного ядра цефалоспорины может происходить с двух сторон молекулы. Химическим или биокаталитическим (под действием фермента эстеразы) путем можно отщепить правую ацетокси-группировку ($-OOC-CH_3$) 7-аминоцефалоспороновой кислоты с образованием 7-аминодеацетоксицефалоспороновой кислоты



На основе 7-аминоцефалоспороновой и 7-аминодеацетоксицефалоспороновой кислот удастся получить большое число полусинтетических антибиотиков, широко применяющихся в медицинской практике.

Первые полусинтетические цефалоспорины (цефалоридин и цефалотин) были синтезированы в 60-х гг. Позднее были получены полусинтетические цефамицины (цефотетан, цефокситин и др.). К настоящему времени полусинтетических цефалоспоринов насчитывается уже более 30 тыс., из них около 100 внедрены в медицинскую практику или проходят клинические и доклинические испытания. Эти препараты имеют различную антимикробную активность, отличаются стабильностью к действию β -лактамаз

и эффективностью при лечении тех или иных заболеваний. В зависимости от названных свойств и времени их получения цефалоспорины подразделяют на четыре поколения.

Цефалоспорины I поколения (цефалоридин, цефалотин, цефазолин, цефалексин и др.) обладают высокой биологической активностью в отношении стафилококков, стрептококков, пневмококков, многих видов энтеробактерий, в том числе *E. coli*, *Proteus mirabilis*.

Цефалоспорины II поколения (цефамандол, цефокситин, цефуроксим и др.) характеризуются высокой активностью в отношении грамотрицательных бактерий, устойчивы к действию β -лактамаз. Они не оказывают заметного действия на энтерококки, *Pseudomonas aeruginosa*.

Цефалоспорины III поколения (цефотаксим, цефаклор, цефтазидим, цефтриаксон, цефтизоксим, цефоперазон, цефпирамид и ряд других) отличаются высокой антимикробной активностью в отношении энтеробактерий, в том числе устойчивых к другим антибиотикам. Группа цефалоспоринов, относящихся к III поколению, устойчива к действию β -лактамаз, образуемых грамотрицательными бактериями. Для них характерна повышенная антибиотическая активность в отношении *E. coli*, ряда штаммов *Proteus*, *Enterobacter*. Вместе с тем они обладают умеренной активностью по отношению к стафилококкам. Особый интерес представляет цефтриаксон, цефпирамид. Цефтриаксон способен в течение длительного периода времени сохраняться в организме больного: период его полувыведения из организма человека составляет 8 ч. Эта особенность препарата позволяет применять его всего лишь раз в день.

Цефпирамид (тамицин) обладает широким спектром антибактериального действия. Он подавляет рост аэробных и анаэробных форм грамположительных и грамотрицательных бактерий. Цефпирамид легко проникает через наружную мембрану грамотрицательных бактерий и взаимодействует с пенициллинсвязывающими белками. Находит применение в медицинской практике при лечении различных бактериальных инфекций, в том числе при лечении заболеваний верхних дыхательных путей, хирургических и гинекологических инфекций.

Цефалоспорины III поколения широко применяются в медицинской практике.

Цефалоспорины IV поколения (цефпиром, цефепим и др.). Цефпиром имеет биполярную структуру (несет один положительный и один отрицательный заряд). Он подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных микроорганизмов, устойчив к β -лактамазам. Высокий

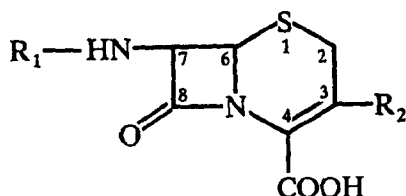
бактерицидный эффект цефпирома связан с тем, что антибиотик с большой скоростью проникает через клеточную стенку бактерий (быстрее в 5–20 раз, чем цефотаксим и цефтриаксон), обладает высоким сродством к пенициллинсвязывающим белкам, низкой степенью гидролиза β -лактамазами. Находит практическое применение при лечении инфекций нижних дыхательных и мочевыводящих путей, а также гинекологических и других заболеваний.

Цефепим обладает необычными биологическими свойствами: низким сродством к β -лактамазам и очень быстрым транспортом в периплазматическое пространство. Практически не обнаружена резистентность к нему чувствительных штаммов энтеробактерий.

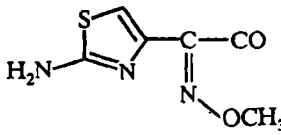
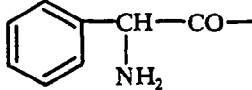
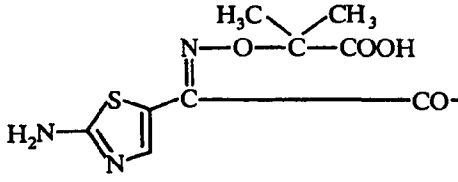
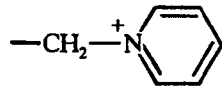
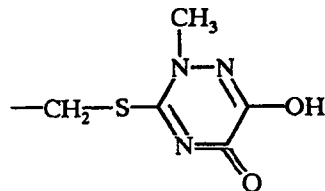
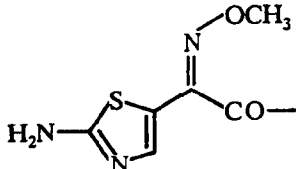
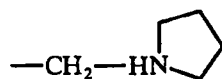
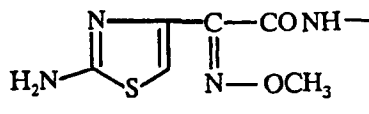
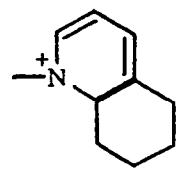
В табл. 84 приведено строение наиболее ценных полусинтетических цефалоспоринов, полученных на основе 7-аминоцефалоспоровой и 7-аминодезацетоксицефалоспоровой кислот.

Таблица 84

Строение наиболее ценных цефалоспоринов, отнесенных к четырем поколениям



Цефалоспорины	Строение радикалов	
	R ₁	R ₂
I поколения		
Цефалоридин		
Цефалотин		
Цефазолин		
Цефалексин		
II поколения		
Цефамандол		
Цефокситин *		
Цефуроксим		

Цефалоспорины	Строение радикалов	
	R ₁	R ₂
III поколения Цефотаксим		-CH ₃
Цефаклор		-Cl
Цефтазидим		-CH ₂ - 
Цефтриаксон	То же	-CH ₂ -S- 
IV поколения Цефепим		-CH ₂ - 
Цефпиром		- 

* Цефокситин — полусинтетический препарат из группы цефаминов.

В качестве примера в табл. 85 приведен антимикробный спектр некоторых цефалоспоринов.

В результате модификации цефалоспорины созданы специальные препараты, пригодные для приема внутрь. Среди этих соединений можно назвать цефиксим, цефетамет, цефтерам, цефуроксима аксетил, моноглициновый цефалоспорин LV164846 и др.

В табл. 86 показано строение названных препаратов.

Модификация молекулы цефалоспорины приводит к существенным изменениям антимикробных свойств, отношению к β-лактамазам и других свойств. Это зависит от того, в каком положении цефемового ядра изменяется структура. Так, замена серы в положении 1 кислородом приводит к повышению антибиотической активности препарата в отношении грамотрицательных бактерий, и в первую очередь тех, которые не образуют β-лактамазы. Это, по-видимому, связано с тем, что подобные препараты быстрее проникают через клеточные мембраны бактерий. Вместе с тем препараты, содержащие кислород вместо серы, менее активны в

Антимикробный спектр некоторых полусинтетических цефалоспоринов

(по Трескиной, Навашину, 1988)

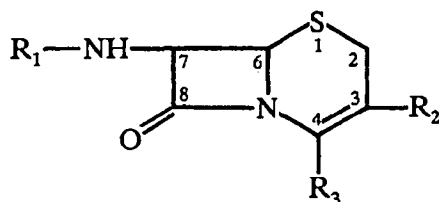
Микроорганизмы	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл				
	цефалотин	цефазолин	цефалексин	цефуроксим	цефотаксим
<i>Escherichia coli</i> :					
ампициллиночувствительные,	4	2	4	1	0,03
ампициллинорезистентные:					
образующие плазмидную					
β-лактамазу	16	16	4	2	0,12
образующие хромосомную					
β-лактамазу	64	32	128	8	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> :					
цефазолиночувствительные	4	4	4	2	0,03
цефазолинорезистентные:	128	128	128	4	0,12
<i>Enterobacter cloacae</i>	128	128	128	16	0,12
<i>Citrobacter</i> sbsp.	64	128	32	8	0,25
<i>Proteus mirabilis</i> :					
ампициллиночувствительные,	2	4	16	1	0,12
ампициллинорезистентные:	4	8	16	2	0,12
<i>Salmonella typhi</i>	2	2	2	4	0,25
<i>Shigella</i> sbsp.	2	2	4	2	0,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	128	128	128	128	81–128
<i>Halmophilus influenzae</i>	4	8	1	0,5	0,03
<i>Bacteroides fragilis</i>	64	64	128	32	32
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,12	0,12	0,5	0,03	0,03
<i>S. pneumoniae</i>	0,12	0,12	2	0,12	0,12
<i>S. faecalis</i>	32	32	64	128	128
<i>Nisseria meningitidis</i>	0,5	0,5	1	0,2	0,01
<i>N. gonorrhoeae</i>	0,5	2,0	2	0,12	0,01

отношении грамположительных бактерий и менее устойчивы к действию β-лактамаз.

Цефалоспорины, полученные в результате изменения группировки молекулы в положении С-3, обладают более широким спектром антимикробного действия.

При модификации карбоксильной группы в положении С-4 (ее этерификация) могут быть созданы препараты с повышенными липофильными свойствами, что дает возможность использовать их при приеме внутрь. Если же процесс модификации идет по группе в положении С-7, то это заметно увеличивает устойчивость препарата к β-лактамазам и несколько снижает их антибиотическую активность в отношении грамположительных бактерий.

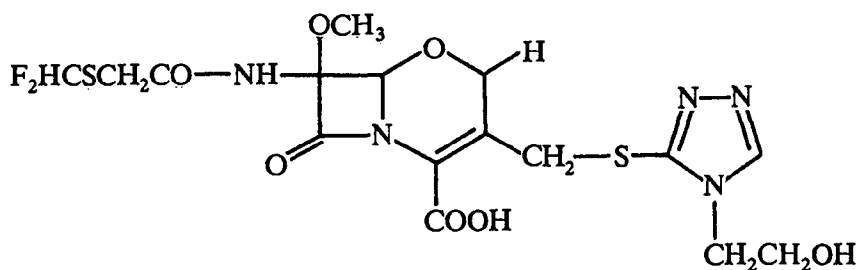
Полусинтетические цефалоспорины, пригодные для приема внутрь



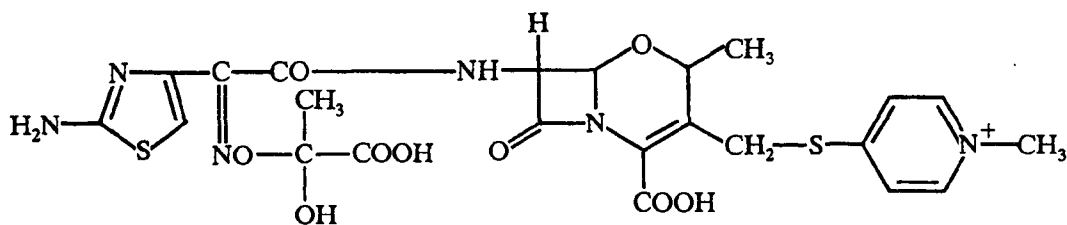
Препарат	Строение радикалов		
	R ₁	R ₂	R ₃
Цефиксим		-CH-CH ₂	-COOH
Цефетамет *	То же	То же	-COOCH ₂ OCOBu
Цефтерам *			То же
Цефуроксима аксетил		-CH ₂ OCONH ₂	-OCOCH ₂
Моноглициновый цефалоспорин LV 164846		-CH ₃	-COOH

* Цефетамет и цефтерам в положении R₃ имеют пивалоилоксиметильную группу.

К числу цефалоспоринов, у которых сера заменена на кислород и модифицируются другие группы, относятся фломоксеф



ОСР-9-176



и некоторые другие препараты, получившие название оксифемов.

Интерес к полусинтетическим антибиотикам значительно усилился во второй половине 60-х гг. В последнее время достигнуты

большие успехи в получении ценных препаратов путем химической модификации многих естественно образующихся антибиотиков (табл. 87). Следует отметить, что полусинтетические антибиотики вытесняют многие биологически активные соединения, образуемые микроорганизмами. К настоящему времени получено более 70 тыс. таких препаратов.

Таблица 87

Общее количество полусинтетических антибиотиков
(по Berdy, 1980)

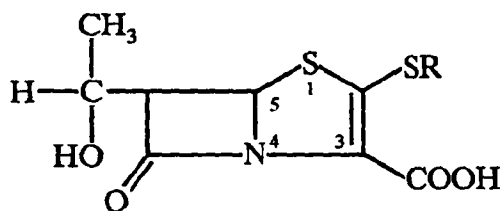
Исходный антибиотик	Число производных	Число применяемых препаратов
Пенициллин	25 000–30 000	30–35
Цефалоспорин	20 000–25 000	25–30
Другие β-лактамы	1 500–2 000	?
Тетрациклины	~2 500	5–6
Аминогликозиды	2 500–3 000	4–5
Рифамицин	1 500–2 000	3–4
Макролиды	800–1 000	2–3
Линкомицин	~500	1
Хлорамфеникол	~500	1
Антрациклин	200–400	1–2
Блеомицин	200–400	1–2
Коумермицин-новобиоцин	200–300	–
Гризеофульвин	100–200	–

Другие β-лактамные антибиотики

Кроме пенициллинов и цефалоспоринов, образуемых мицелиальными грибами, к группе β-лактамных антибиотиков относятся вещества, вырабатываемые другими микроорганизмами.

Сюда включен новый класс соединений, производных пенемов. Этот класс β-лактамных препаратов характеризуется особенностью строения серосодержащего кольца с пятичленным строением пенициллинов и сопряженной внутрикольцевой двойной связью цефалоспоринов.

Пенемы — это полусинтетические препараты. В качестве примеров можно назвать SCH-29482 и SCH-34343:

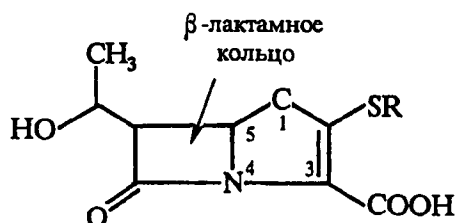


Пенем SCH-29482: R=CH₂CH₃

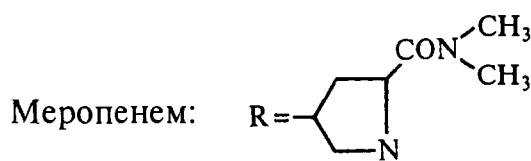
Пенем SCH-34343: R=CH₂CH₂NHCOCH₃

Представителями нового класса β -лактамных антибиотиков являются карбапенымы (тиенамицин, оливановая кислота, имипенем и меропенем), у которых в 1-м положении пятичленного кольца пенема сера замещена углеродом. Продукент тиенамицина — *Streptomyces cattleya*, оливановая кислота образуется *S. olivaceus*. Этот карбапенем обладает широким спектром антимикробного действия. Он устойчив к β -лактамазам.

Оливановая кислота (Olivanic acid) и ее производные (имипенем, меропенем) вырабатываются *S. olivaceus* и другими видами стрептомицетов:



Тиенамицин: $R = -CH_2CH_2NH_2$
 Оливановая кислота: $R = -CH = CHNH_2$
 Имипенем: $R = -CH_2CH_2NHC = NH$



Карбапенемы

Оливановая кислота проявляет высокую антибактериальную активность в отношении широкого ряда организмов. Особенностью этого антибиотика является способность ингибировать β -лактамазы, образуемые различными видами грамположительных и грамотрицательных бактерий.

Имипенем проявляет антибактериальную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Он уже на протяжении многих лет применяется в медицинской практике. Однако широкого распространения устойчивых к нему форм бактерий не обнаружено. Резистентные формы встречаются среди *Pseudomonas aeruginosa*, крайне редко среди *Serratia marcescens* и некоторых других микроорганизмов.

Устойчивость *P. aeruginosa* к имипенему может быть обусловлена в основном тремя факторами: а) уменьшением количества пориновых каналов во внешней мембране клеток; б) отбором мутаций, усиливающих энергозависимый выброс антибиотика из клеток, и в) распространением металло- β -лактамаз, гидролизующих имипенем и меропенем.

В 1993–1997 гг. появились сообщения японских исследователей о новом карбапенеме, активном в отношении устойчивых к имипенему штаммов *P. aeruginosa*, — меропенеме.

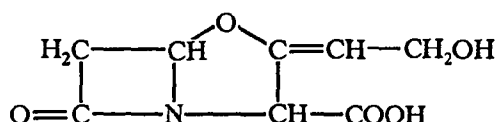
Меропенем обладает широким спектром антибактериальной активности. Он в большей степени подавляет развитие грамотрицательных и в меньшей степени грамположительных аэробных и анаэробных бактерий. Проявляет антибиотическую активность в отношении некоторых резистентных к имипенему штаммов *P. aeruginosa*, устойчив к инаktivации ферментом печеночной дегидропептидазой человека (имипенем чувствителен к действию названного фермента).

Механизм биологического действия меропенема связан с подавлением синтеза клеточной стенки бактерий в результате ковалентного связывания с PBP*s*.

Меропенем — один из наиболее мощных препаратов, используемых для лечения инфекций, вызываемых полирезистентными к антибиотикам возбудителями.

Хотя карбапенемы — весьма нестабильные препараты, они, в частности имипенем, способны подавлять рост не только развивающихся, но и покоящихся бактериальных клеток.

К β-лактамам относятся также продукты жизнедеятельности и некоторых других стрептомицетов, в том числе клавулановая кислота, цефамицины А, В и С и другие соединения. Клавулановая кислота (Clavulanic acid) продуцируется культурой *S. clavulgerus*. Она относится к оксипенемам и имеет следующее строение:



Клавулановая кислота не обладает антибактериальной активностью, но она тоже подавляет активность β-лактамаз, продуцируемых как грамположительными, так и грамотрицательными бактериями.

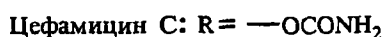
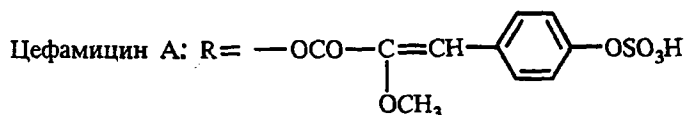
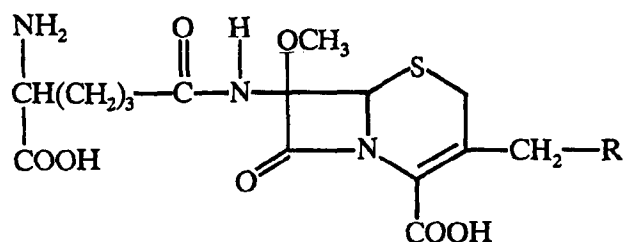
Цефамицины (Cephamycins) — антибиотические вещества, близкие по структуре цефалоспорином, они отличаются от последних тем, что в 7-м положении β-лактамного кольца вместо Н имеют метоксигруппу (СН₃О-) и в связи с этим относятся к оксоцефемам.

Известно несколько вариантов цефамицинов: А, В и С. Культура *S. clavuligerus* образует цефамицин С, а *S. lactamdurans* — цефа-

* PBR — penicillin-binding protein.

мицины А, В и С. Наибольшую ценность представляет цефамицин С, проявляющий высокую антибиотическую активность в отношении грамотрицательных бактерий, он устойчивей к действию β -лактамаз.

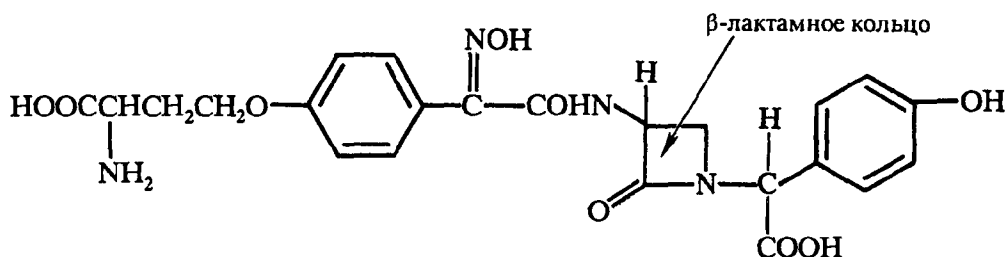
Строение цефамицинов А и С представлено следующей формулой:



В результате химической модификации цефамицинов получены ценные препараты, в том числе цефокситин (см. табл. 84), цефотетан и др.

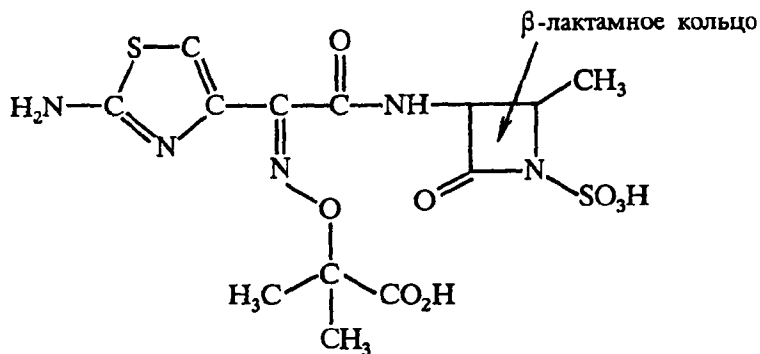
Натриевая соль цефокситина — мифоксин — обладает широким антибактериальным спектром, подавляя развитие аэробных и анаэробных грамположительных и грамотрицательных бактерий. Этот препарат устойчив к β -лактамазам и применяется при лечении перитонита, гинекологических инфекций, эндокардита, заболеваний мочевыводящих путей и др.

Некоторые виды *Nocardia* в процессе жизнедеятельности могут синтезировать своеобразные β -лактамные антибиотики, имеющие моноциклические структуры — монобактамы. Примеры таких монобактамов — нокардицин А (nocardicin А):



Нокардицин А обладает антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных бактерий, в том числе *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus*, видов *Serratia* и *Neisseria*. Этот антибиотик устойчив к действию β -лактамаз.

Первым представителем этого класса моноциклических β -лактамов можно назвать антибиотик бактериального происхождения азтреонам (aztreonam), описанный в 1981 г.:



Азтреонам находит применение в клинике. Он устойчив к β -лактамазам и не индуцирует их образование.

Антимикробная активность этого препарата в основном проявляется в отношении аэробных грамотрицательных бактерий (по Williams, 1986):

Организм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Escherichia coli</i>	0,50
<i>Proteus mirabilis</i>	0,25
<i>P. vulgaris</i>	0,25
<i>Enterobacter</i> sbsp.	4,00
<i>Serratia</i>	1,00
<i>Pseudomonas</i> sbsp.	8,00
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,12
<i>Haemophilus influenzae</i>	0,06

Механизм действия этого антибиотика идентичен таковому для других β -лактамных антибиотиков в отношении грамотрицательных бактерий, т.е. под влиянием азтреонама инактивируются пенициллинсвязываемые белки (РВР) клеточной стенки бактерий.

Азтреонам применяется в медицинской практике для лечения заболеваний, вызываемых грамотрицательными бактериями: инфекций мочевыводящего тракта, желчного тракта, гонореи, остеомиелитов.

Итак, суммируя сказанное об антибиотиках β -лактамной группы, следует подчеркнуть, что β -лактамное кольцо служит основой ряда ценных антибиотических веществ, продуцируемых различными микроорганизмами, в том числе мицелиальными грибами, стрептомицетами, нокардиями. К этой группе антибиотиков относятся: пенициллины, цефалоспорины, цефамицины, оксоцефемы, сульбактамы, карбапенемы, клавулановая кислота, монобактамы (рис. 57).

Возрастающий интерес к β -лактамным антибиотикам связан не только с их ценными лечебными свойствами, но и с тем, что

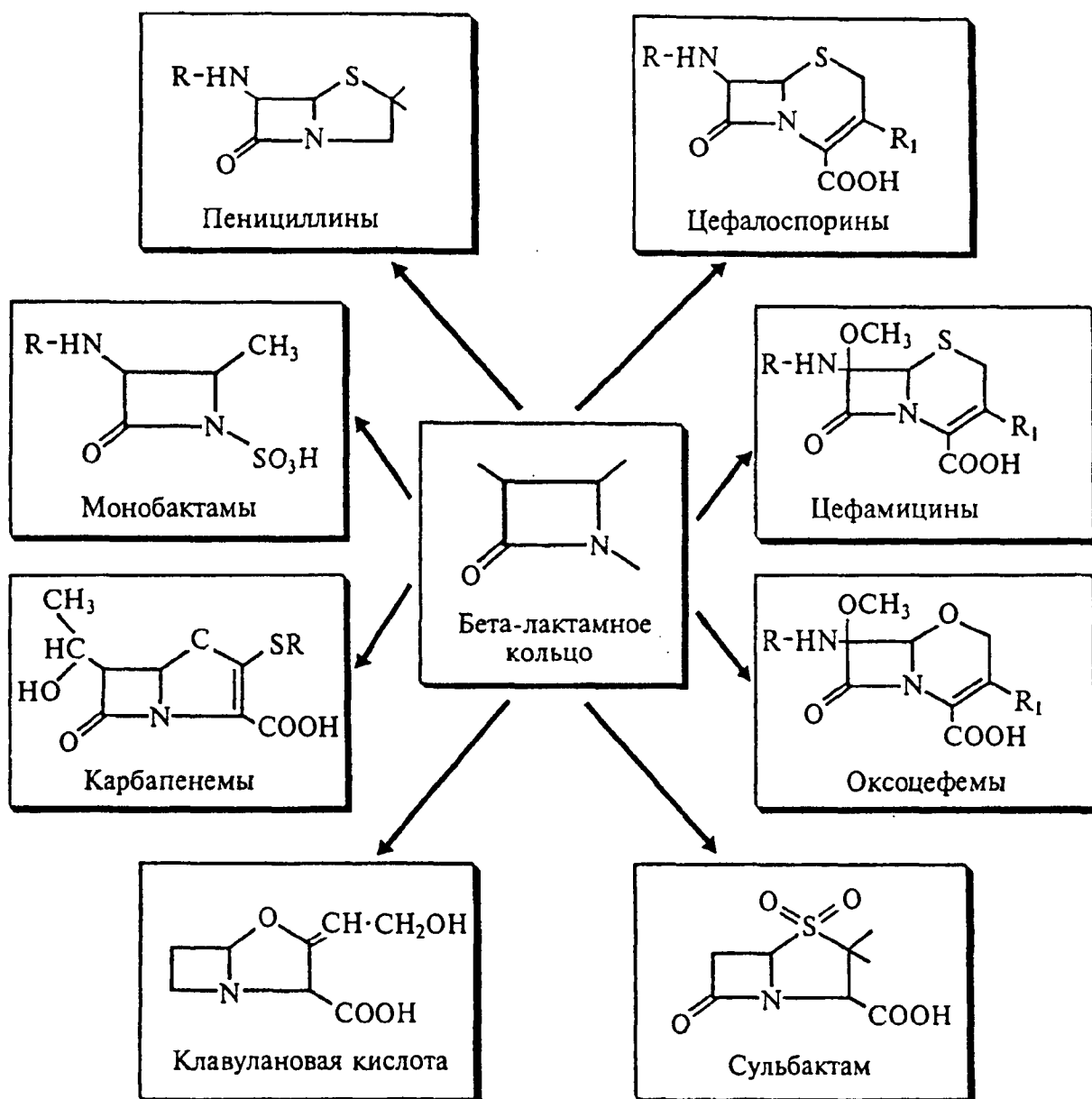


Рис. 57. Бета-лактамные антибиотики, нашедшие применение в клинике
(по Навашину, 1994)

химическая структура этих соединений обладает высокой реактивностью. А это позволяет на их основе создавать разнообразные полусинтетические биологически активные соединения с ценными антимикробными свойствами, свойствами иммуномодуляторов, ингибиторов ферментов, способностью расщеплять ксенобиотики.

Практическая ценность полусинтетических β -лактамных антибиотиков зависит прежде всего от скорости проникновения их через наружную мембрану грамотрицательных бактерий, от устойчивости к β -лактамазам и от скорости инактивирования защитных ферментов бактериальной клетки. Известно, что скорость проникновения β -лактамных антибиотиков через мембрану зависит не только от того, открыты или закрыты водяные пары, образуемые белками поринами, но и от гидрофобности препарата.

При этом следует стремиться получить антибиотик с меньшей степенью гидрофобности.

Устойчивость антибиотика к β -лактазам во многом зависит от структуры препарата. Так, введение метоксигруппы в положения 6 и 7 у пенициллинов и цефалоспоринов, замена серы на кислород в пятичленном кольце пенициллина или в шестичленном кольце цефалоспориона повышают устойчивость молекул этих антибиотиков к соответствующим β -лактазам.

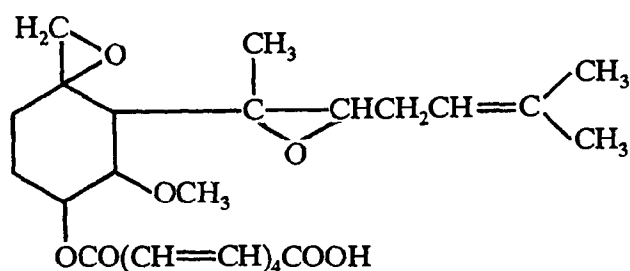
Среди получаемых β -лактамов обнаруживаются соединения, обладающие иммуностимулирующим действием, способностью подавлять биосинтез некоторых аминокислот у бактерий и синтез РНК у грибов и другими свойствами.

ДРУГИЕ ГРИБНЫЕ НЕ β -ЛАКТАМНЫЕ АНТИБИОТИКИ

Фумагиллин (Fumagillin)

Фумагиллин — один из немногих грибных антибиотиков, относящихся к группе полиеновых соединений. Он является тетраеном, т.е. имеет в своем составе четыре двойные связи $(-\text{CH}=\text{CH}-)_4$.

В 1960 г. была установлена структурная формула фумагиллина:



Фумагиллин образует культура *Aspergillus fumigatus*.

Антибиотик обладает противоамебным действием и активен в отношении бактериофага стафилококка. Фумагиллин практически не действует на бактерии и грибы. Есть указания на то, что фумагиллин обладает широким спектром противоопухолевого действия и значительной активностью. Нетоксические дозы антибиотика (5 мг/кг в сут) полностью разрушали клетки асцитного рака Эрлиха, сильно угнетали рост саркомы МА 387 и др. В концентрациях 10–100 мкг/мл и выше антибиотик подавляет рост и размножение опухолевых клеток асцитной формы и лимфолимфы NK/LY.

В 1956 г. З.Э. Беккер с сотрудниками выделила отечественный штамм *A. fumigatus* и разработала среду для биосинтеза антибиотика. В состав среды входят кукурузный экстракт и крахмал.

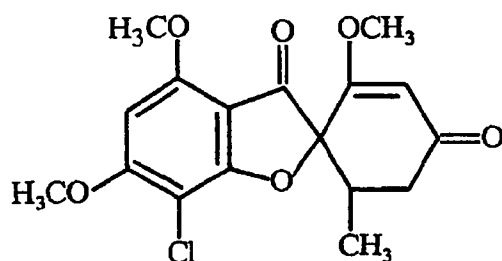
Антибиотик выделяют из культуральной жидкости экстракцией хлороформом или бутилацетатом с последующей очисткой методом кристаллизации из соответствующих растворителей.

Разработан также способ выделения антибиотика путем осаждения его кислотой с последующей перекристаллизацией из органического растворителя.

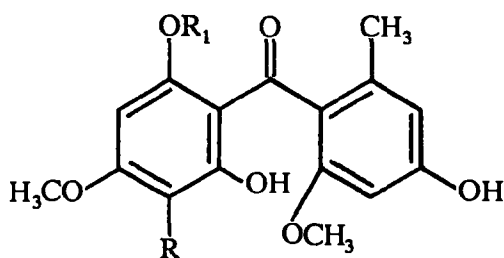
Фумагиллин применяется для лечения амебиоза и профилактики ноземы («поноса») пчел, вызываемой *Nosema apis*, а также при лечении шелковичных червей. Антибиотик слабо токсичен.

Гризеофульвин (Griseofulvin)

Гризеофульвин относится к группе ароматических соединений, представляющих собой конденсированные ароматические компоненты. Антибиотик образуют плесневые грибы из рода *Penicillium* (*P. griseofulvum*, *P. nigricans*, *P. raistrichi* и др.). Установлено строение гризеофульвина, молекула которого имеет следующую структуру:



Важное значение в процессе биосинтеза молекулы гризеофульвина имеет хлорирование. Подавление реакции хлорирования приводит к образованию гризеофенона С, который в процессе хлорирования превращается в гризеофенон В:



Гризеофенон С: $R = R_1 = H$

Гризеофенон В: $R = Cl, R_1 = H$

Последний в результате метилирования переходит в гризеофенон А, а затем в гризеофульвин.

Гризеофульвин получают при развитии гриба *P. griseofulvum* (синоним *P. patulum*) в глубинных условиях культивирования в среде, содержащей кукурузный экстракт, лактозу, KH_2PO_4 и KCl . Стимуляция образования антибиотика наблюдается при добавке к среде тартарата (виннокислого) аммония.

В нашей стране для получения гризеофульвина используется *P. nigricans*, который в процессе развития не образует весьма токсичного патулина.

Антибиотик обладает высокой биологической активностью в отношении грибов, имеющих хитиновую оболочку, вызывая у

них ненормальный рост с характерным закручиванием. Ниже приведен антимикробный спектр гризеофульвина:

Грибы	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Microsporum canis</i>	0,22–0,24
<i>M. audouinii</i>	0,40–0,46
<i>Epidermophyton floccosum</i>	0,38–0,42
<i>Trichophyton rubrum</i>	0,14–0,18
Другие патогенные грибы	25–30

Гризеофульвин — малотоксичный препарат. Антибиотик оказался хорошим средством против трихофитии (стригущего лишая), вызываемого грибом *Trichophyton rubrum*. Он проявляет положительное действие и при лечении ряда других кожных заболеваний и болезней ногтей.

Этот антибиотик — эффективный препарат для борьбы с мучнистой росой клубники, огурцов, с возбудителем увядания цитрусовых, он проявляет биологическое действие против возбудителя килы капусты.

В связи с широким применением гризеофульвина на практике интерес к нему за последнее время значительно возрос.

Трихотецин (Trichothecin)

Антибиотик трихотецин относится к семейству кислородсодержащих гетероциклических соединений. Он впервые получен Ж. Фриманом и Р. Моррисоном в 1948 г. Трихотецин образуется одним из штаммов плесневого гриба *Trichothecium roseum* (гриб широко распространен в природе и его легко можно выделить из растительных остатков).

Антагонистические свойства *T. roseum* были известны более 90 лет назад, однако антибиотическое вещество выделили спустя почти 40 лет. *T. roseum*, образующий антибиотик, — спорулирующая разновидность этого вида. При развитии на среде Чапека грибы этой разновидности, как отмечается в сообщении А.Б. Силаева и др. (1965), образуют широко растущую шерстистую колонию, приобретающую при спорообразовании розовый оттенок.

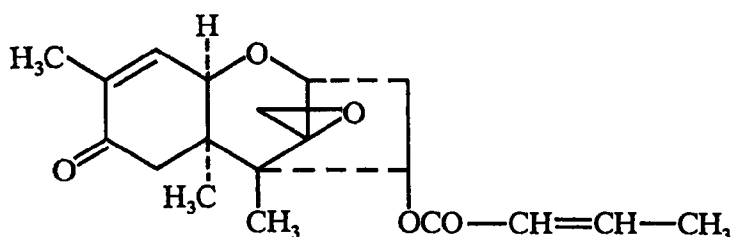
Вместе с биологически активной формой гриба в природе встречается другая разновидность, у которой обильно разрастается воздушный ватообразный белый мицелий, не способный к образованию трихотецина.

Трихотецин характеризуется широким прогивогрибным и антивирусным действием без проявления антибактериальных свойств.

Ценное свойство антибиотика — способность подавлять развитие некоторых фитопатогенных грибов, а также грибов, вызывающих дерматомикозы у животных. Антибиотик относительно низко токсичен.

Строение молекулы трихотецина было выяснено Ж. Фриманом с сотрудниками в 1959 г.; антибиотик принадлежит к группе соединений, содержащих в молекуле несколько O-гетероциклов.

Строение трихотецина может быть представлено следующей формулой:



В состав антибиотика входит циклическая структура кетонспирт — трихотекол C₁₅H₁₉O₃ и изокротоновая кислота CH₃CH=CHCOOH.

Трихотецин, как и близкие к нему соединения (трихотецин Р, образуемый *Cephalosporium*; розеины, выделенные из *Trichothecium*; триходермин, полученный из *Trichoderma*; роридины, веррукаринны, синтезируемые *Myrothecium verrucaria*, а также гиббереллины, продуцируемые рядом видов грибов), имеют терпеноидное строение и общий путь биосинтеза.

Трихотецин образуется при развитии гриба *T. roseum* на среде, содержащей кукурузный экстракт, сахарозу, сернокислый аммоний и другие минеральные соли. Добавление к среде глицерина (0,5 или 1,0%) значительно повышает выход антибиотического вещества (табл. 88). В присутствии глицерина (1%) в среде почти вдвое увеличивается потребление сахарозы

Таблица 88

Влияние глицерина на рост *T. roseum* и образование трихотецина
(по Максимовой и др., 1966)

Концентрация глицерина, %	Количество трихотецина, мкг/мл	Масса мицелия, мг/л
0 (контроль)	380	960
0,5	420	900
1,0	900	810

единицей биомассы гриба, однако увеличения массы мицелия не происходит. Наибольшее количество сахара при этом потребляется грибом непосредственно в период образования трихотецина; рост мицелия в это время не наблюдается.

На биосинтез антибиотика существенно влияет возраст посевного материала. Наибольший выход трихотецина отмечается

при использовании инокулята в возрасте 36–40 ч. Максимальный биосинтез антибиотика происходит в период 72–80 ч роста гриба на среде, содержащей в качестве источников углерода 1% глицерина и 3% сахарозы.

Выход трихотецина в 1,5–2,0 раза повышается также при совместном культивировании продуцента антибиотика и гриба из рода *Penicillium* (подробнее см. с. 89).

Трихотецин играет значительную роль в жизнедеятельности гриба, его синтезирующего. По всей вероятности, он обуславливает микропаразитизм *T. roseum*, обеспечивая грибу возможность использования поврежденных или убитых антибиотиком других грибов в качестве источника питания.

Изучение влияния трихотецина на продуцент этого антибиотика показало, что в концентрации 200 мкг/мл он угнетает рост гриба в первые часы культивирования. Наиболее остро токсическое действие трихотецина проявляется в том случае, если антибиотик вводить в 48-часовую культуру гриба. Антибиотик адсорбируется поверхностью мицелия, нарушает проницаемость клеточных стенок гриба и угнетает образование трихотецина.

В процессе развития гриба антибиотик в основной массе выделяется в окружающую среду. Поэтому трихотецин получают по следующей схеме: отделение культуральной жидкости от мицелия фильтрацией, экстракция трихотецина четыреххлористым углеродом и выделение антибиотика перекристаллизацией из спирта.

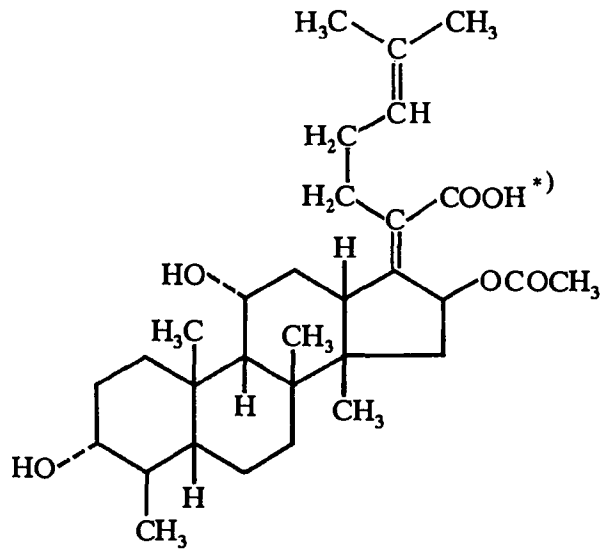
Трихотецин — антибиотик антифунгального действия. Он применяется в ветеринарии для лечения болезней сельскохозяйственных животных, вызываемых патогенными грибами (трихофития крупного рогатого скота и пушного зверя). Он также используется в растениеводстве против заболеваний, вызываемых *Fusarium*, отдельными видами *Penicillium* и *Aspergillus*.

Трихотецин может инактивироваться в почве под действием почвенных грибов, образующих фермент трихотециназу.

Фузидиевая кислота (фузидин) (Fusidic acid)

В. Годтфредсен и др. в 1962 г. из культуры гриба *Fusidium coccineum* выделили антибиотик под названием «фузидиевая кислота». По своему химическому строению он относится к алициклическим соединениям стероидной структуры. Из данного класса соединений это одно из наиболее ценных лекарственных соединений.

Фузидиевая кислота имеет следующее строение:



*) Фузидин Н→Na

Натриевая соль фузидиевой кислоты называется фузидином. Фузидиевая кислота подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных кокков (стафилококков, гонококков, менингококков) и обладает слабым противовирусным действием. Грамотрицательные бактерии, грибы и простейшие к действию этого антибиотика нечувствительны. Ниже приведен антимикробный спектр фузидиевой кислоты:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,04–0,1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4–16
<i>S. faecalis</i>	3,2–25
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0,4–1,5
<i>N. meningitidis</i>	0,6–0,1
<i>Corinobacterium diphtheriae</i>	0,004–0,05
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,5–1,6
<i>Escherichia coli</i>	100 и более
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100 и более
<i>Salmonella</i> sbsp.	100 и более
<i>Proteus</i> sbsp.	100 и более

Фузидин применяется при лечении инфекций, вызываемых стафилококками, в том числе устойчивыми к другим антибиотикам (сепсис, эндокардит, пневмонии, гастроэнтериты и некоторые другие), при лечении гонореи, возбудителем которой являются пенициллиноустойчивые организмы. Он накапливается в костной ткани, что делает его весьма эффективным при

стафилококковых остеомиелитах. Фузидин используется также для лечения нокардиозов.

Этот антибиотик применяют в виде таблеток, а также внутривенно.

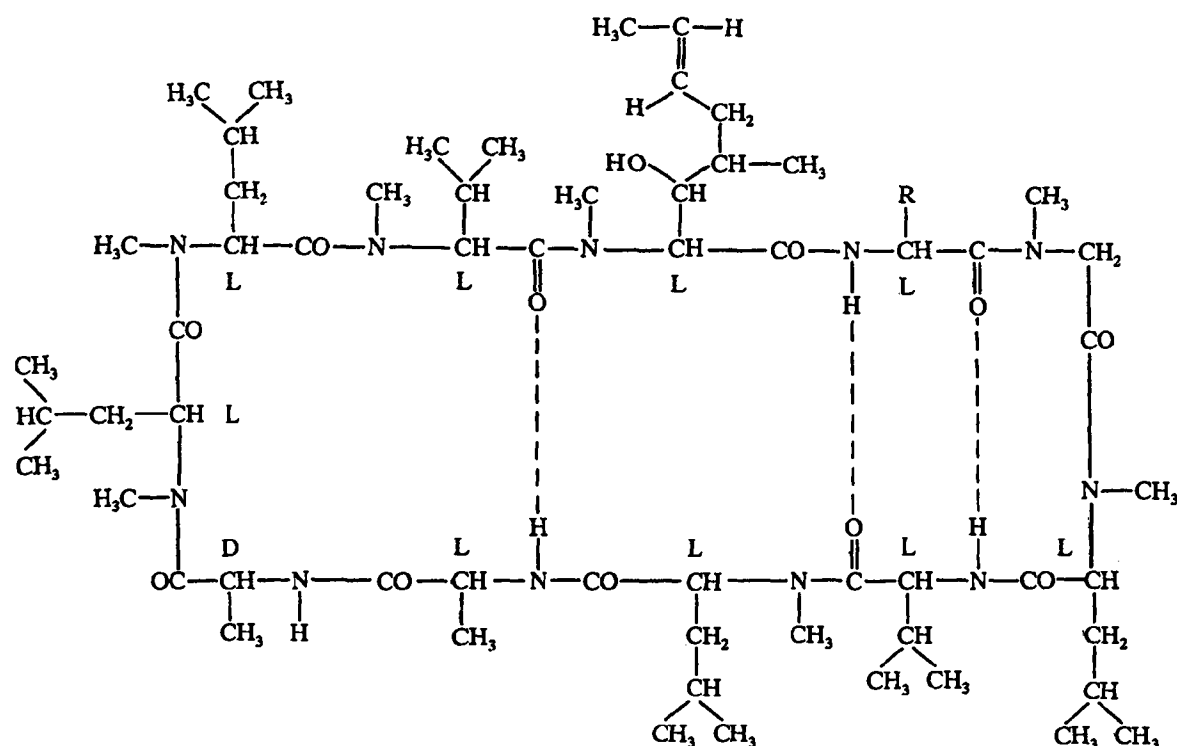
Механизм биологического действия фузицина связан с подавлением синтеза белка на последней стадии этой реакции, т.е. на уровне ингибирования переноса аминоксил-тРНК на рибосомы.

Циклоспорины (Cyclosporins)

Циклоспорины образуются мицелиальными грибами *Tolypocladium inflatum* (синоним *Beauveria nivea*), *Trichoderma polysporum* и *Cylindrocarpon lucidum*, выделенными из почв. Показано, что антибиотики типа циклоспорина способны синтезировать и некоторые виды актиномицетов. Впервые эти антибиотики описаны в конце 70-х гг. (M. Dreyfuss, E. Harri et al., 1976; R. Traber, M. Kuhn et al., 1977).

В последнее время этой группе антибиотиков уделяется большое внимание со стороны микологов, микробиологов, химиков и практических врачей.

По своему химическому строению циклоспорины относятся к циклическим полипептидам (олигопептидам), состоящим из 11 аминокислотных остатков. В процессе биосинтеза образуется ряд вариантов циклоспоринов — циклоспорины А, В, С, ..., U, V и W:



Циклоспорин А: R = CH₂-CH₃

Циклоспорин В: R = CH₃

Циклоспорин С: R = CH (OH) CH₃

Циклоспорин D: R = CH (CH₃)₂

Большой интерес к названной группе антибиотиков связан с тем, что циклоспорины обладают специфическим иммуносупрессорным действием. Циклоспорин А — это первый представитель нового поколения иммуномодуляторов. Указанное свойство циклоспоринов сделало возможным широкое применение их в медицинской практике при трансплантации отдельных органов и тканей, а также при лечении ряда аутоиммунных заболеваний (псориаз, ревматоидный артрит, пузырчатка, рассеянный склероз и др.). Это позволило глубже познать механизм различных иммунных реакций. Установлено, что циклоспорин в Т-лимфоцитах связывается с Ca^{2+} -зависимым белком (кальмодулином), в результате чего тормозится взаимодействие фермента протеинкиназы с ионами кальция.

Этот антибиотик, взаимодействуя с другим Ca^{2+} -зависимым белком — циклофилином, нарушает функцию неспецифических кальциевых каналов мембран в митохондриях животных.

Циклоспорины проявляют противогрибную активность, а циклоспорин А обладает антипаразитарными свойствами.

Рассматривается возможность использования циклоспоринона А при аутоиммунных заболеваниях, характеризующихся нарушениями иммунных реакций.

Следует, однако, обратить внимание на то, что применение циклоспоринона А сопровождается побочными реакциями, в том числе заметной нефротоксичностью. Для снижения нефротоксического эффекта этого препарата рекомендуется использовать его в комбинации с азатиоприном и стероидами. Побочные реакции, вызываемые циклоспорином А, предполагают ограниченное его применение в медицинской практике. В связи с этим перед исследователями стоит важная задача — получить новые, менее токсичные препараты циклоспоринона. Циклоспорин G не проявляет выраженных нефротоксических свойств.

Циклоспорин не только мощный иммуносупрессорный препарат. Начиная с 80-х гг. он стал применяться в офтальмологии при лечении воспалительных и аллергических заболеваний конъюнктивы, роговицы, склеры, внутренних оболочек глаз.

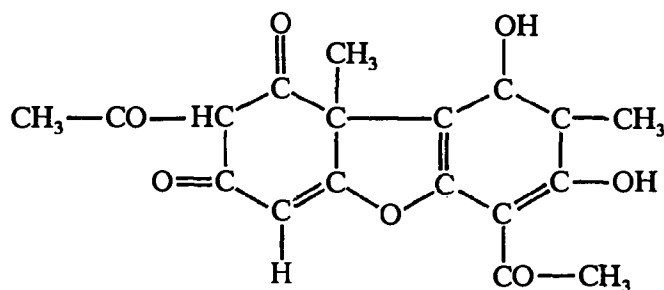
Ферментный препарат, выделенный из экстрактов гриба *Beauveria nivea*, способен синтезировать циклоспорин *in vitro* (Lawen et al., 1989). При этом образуются антибиотики, близкие природным циклоспоринонам.

Из других антибиотиков грибного происхождения, имеющих определенное значение, можно назвать цитринин, выделенный из культуры *Aspergillus niger*; аспергиллин, полученный из гриба *A. niger* и ряд других.

Лишайники продуцируют многие антибиотические вещества, свойства которых существенно отличаются от всех известных до настоящего времени антибиотиков растительного происхождения.

Начиная с 1946 г. исследователи обратили внимание на лишайниковые кислоты, и особенно на усниновую кислоту, обладающую сильными антибиотическими свойствами.

Усниновая кислота продуцируется многими видами лишайников, относящихся к семействам *Usneaceae*, *Parmeliaceae* и *Cladoniaceae*, имеет следующее строение:



В 1948 г. была получена растворимая натриевая соль усниновой кислоты — бинан. Изучение антимикробных свойств бинана показало, что он обладает избирательным действием по отношению к грамположительным бактериям (*B. subtilis*, *B. mesentericus*, *S. albus* и др.) и некоторым анаэробным формам. Особенно чувствительны к бинану дифтерийные палочки. По действию на организмы натриевая соль усниновой кислоты обладает бактериостатическим свойством.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте общую характеристику β-лактамных антибиотиков.
2. Охарактеризуйте пенициллин, историю его открытия, условия образования, свойства и применение.
3. Рассмотрите полусинтетические пенициллины, принципы их получения и свойства.
4. Какие имеются ферменты, инактивирующие молекулу пенициллина?
5. Опишите механизм биосинтеза молекулы пенициллина.
6. Дайте характеристику цефалоспоринов и механизма их биосинтеза.
7. Рассмотрите четыре поколения полусинтетических цефалоспоринов.
8. Какие имеются другие β-лактамные антибиотики?
9. Дайте характеристику других антибиотиков, образуемых мицелиальными грибами (фузидиевая кислота, гризеофульвин, трихотецин, циклоспорины).

АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ ВЫСШИМИ РАСТЕНИЯМИ И ЖИВОТНЫМИ

Антибиотические вещества высших растений

Многие отечественные исследователи, изучавшие высшие растения, обращали внимание на то, что сок некоторых из них обладает бактерицидными свойствами или инактивирует токсическое действие других организмов. Однако наиболее подробно антибиотические вещества высших растений были изучены Б.П. Токиным. Еще в 1928 г. он обратил внимание на то, что если под стеклянный колпак поместить ветку черемухи (весной или летом) и рядом с ней поставить стакан с *Protozoa* в воде, то через 15–20 мин все простейшие погибают. Следовательно, летучие вещества, выделяемые черемухой, обладают антипротозойным действием. Биологически активные вещества высших растений Б.П. Токин назвал фитонцидами. Фитонциды — продукты жизнедеятельности растений, обнаруженные у представителей всех групп высших растений. Наибольшим антибиотическим свойством обладают фитонциды лука, чеснока и некоторых других растений. Известно, что фитонциды представляют собой не отдельные вещества, а комплексы соединений. Фитонцидными свойствами обладают бальзамы, смолы, вещества хиноидного строения, дубильные вещества, содержащие лактонное кольцо, глюкозиды, антоцианы и другие соединения.

Фитонциды некоторых растений способны стимулировать или подавлять развитие других растений на расстоянии. Обнаружены летучие фитонциды, способные убивать пыльцу других растений или стимулировать ее развитие.

Внешние повреждения растений (ранения) способствуют образованию летучих фитонцидов. Этот факт указывает на их приспособительное значение.

Растения одного вида, выращенные в разных условиях, образуют несколько отличные друг от друга фитонциды. Биологическая активность фитонцидов одного и того же растения зависит от сезона года: например, осенью хвоя сосны менее бактерицидна, чем хвоя, собранная в мае или июне.

К настоящему времени из высших растений выделено более 700 антибиотических веществ, способных подавлять развитие бактерий, вирусов, угнетать рост опухолевых клеток.

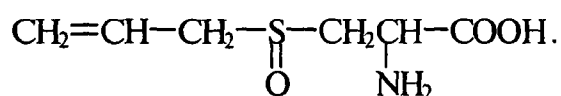
Антибиотики, выделенные из высших растений, имеют разнообразное химическое строение и относятся к различным группам соединений. Среди них встречаются алифатические соединения, алкалоиды и хиноны, эфирные масла и терпеновые соединения, полифенолы, кумарины и др.

К числу наиболее изученных растительных антибиотиков относятся аллицин, берберин, госсипол, хинин и многие другие.

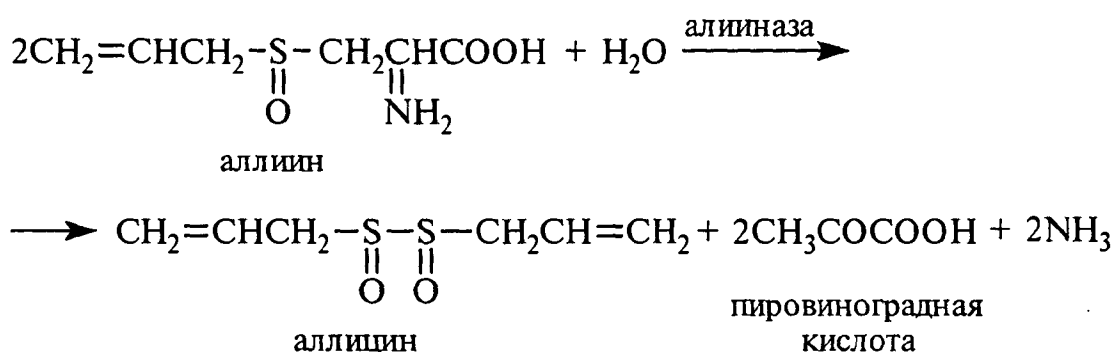
Аллицин (Allicin)

Аллицин — продукт жизнедеятельности чеснока (*Allium sativum*) — выделен и подробно изучен К. Коваллито с сотрудниками в 1944 г. Антибиотик выделяют из чеснока экстракцией органическими растворителями и очищают перегонкой с водяным паром.

Аллицин, выделенный из чеснока, — очень неустойчивое соединение: при комнатной температуре он разрушается в течение нескольких суток. Однако неповрежденный чеснок сохраняет антибиотическую активность в течение года и более. Изучение этого явления показало, что в чесноке аллицин содержится не в виде свободного соединения, а в виде вещества, которое может переходить в антибиотик. Это вещество было названо аллиином:



Аллиин не имеет запаха чеснока и не обладает антибиотическими свойствами. Превращение аллиина в аллицин происходит под влиянием специфического фермента аллииназы, содержащегося в соке чеснока. Из чеснока, охлажденного до -40°C , аллиин можно выделить методом экстракции 80–85%-м этиловым или метиловым спиртом, затем экстракт смешивают с твердой CO_2 . В этих условиях аллиин выпадает в осадок в виде игольчатых кристаллов. Под действием аллииназы аллиин превращается в аллицин с выделением пировиноградной кислоты и аммиака:

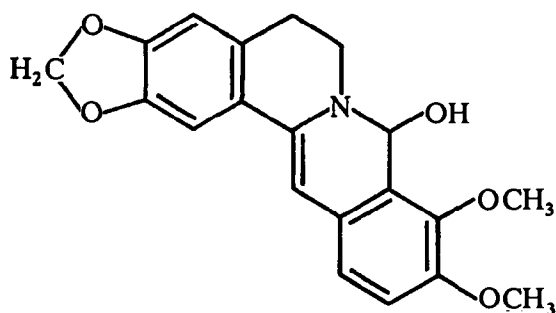


Аллицин принадлежит к группе серосодержащих алифатических соединений. Он подавляет развитие грамположительных и

грамотрицательных микробов и развитие туберкулезной палочки. Антибиотик относительно высокотоксичен. Летальная доза его при внутривенном введении мышам составляет 60 мг/кг, при подкожном — 120 мг/кг. Высокая токсичность алицина и неустойчивость препарата делают невозможным его применение в медицине.

Берберин (Berberin)

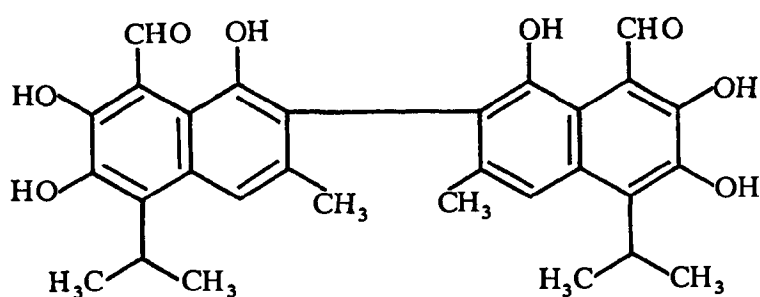
Берберин — антибиотик алкалоидной природы. Выделяется из ряда видов растений: лютиковых, луносемянниковых, барбарисовых. Ниже приведена структурная формула берберина:



Этот антибиотик подавляет развитие стафилококков, стрептококков, гонококков, сальмонелл.

Госсипол (Gossypol)

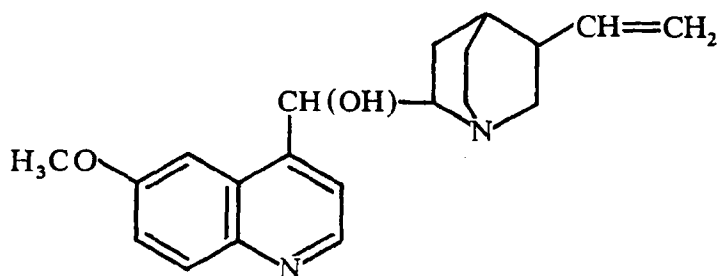
Антибиотическое вещество выделяется из семян хлопчатника мохнатого (*Gossypium hirsutum*). По химическому строению госсипол относится к полифенолам (димерное фенольное соединение):



Этот антибиотик обладает выраженным антивирусным действием, слабо активен по отношению к бактериям.

Хинин (Chinin)

Хинин известен с доисторических времен как средство для лечения больных малярией. Этот алкалоид выделяется из хинного дерева красносочкового (*Cinchona succirubra*). Структура хинина была установлена в 1907 г.:



Синтез соединения осуществлен в 1944 г.

Хинин наряду с угнетением жизнедеятельности эритроцитарных форм малярийных плазмодиев подавляет рост стрептококков, микобактерий, протей, кишечной палочки. Он нарушает функцию клеточных мембран, ингибирует отдельные флавопротеиновые ферменты и холинэстеразы.

Рицин (Ricin)

Рицин — это белковое, биологически высокоактивное вещество, продуцируемое высшими растениями: клещевиной (*Ricinus communis*) и омелой белой (*Viscum album*). Оно принадлежит к группе токсинов, образуемых бактериями *Corynebacterium diphtheriae* (дифтерийный токсин), *Shigella* sp. (шига-токсин) и *Pseudomonas* sp. (экзотоксин).

Этот растительный белок представляет особый интерес в связи с механизмом его биологического действия, приводящего к быстрой гибели клетки животных.

Было установлено (Sandvig, van Derus, 1999), что рицин — энзиматический белок, который состоит из двух полипептидных цепочек (А и В). Полипептид В связывается с гликопептидом и гликопротеином через концевую галактозу на поверхности клетки. А другой полипептид (цепочка А) проникает в цитоплазму клетки и, как фермент, подавляет синтез белка. Причем энзиматическая активность полипептида А молекулы рицина способна инактивировать функции около 2000 рибосом в минуту, приводя таким образом очень быстро клетки к гибели.

Фитоалексины

К антибиотическим веществам, образуемым высшими растениями, относятся также соединения, получившие название фитоалексинов. Фитоалексины вырабатываются в результате проникновения в растение определенного паразита.

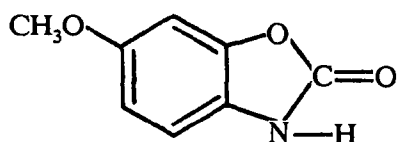
Процесс биосинтеза фитоалексинов индуцируется соответствующим сигнальным соединением, находящимся или в клеточной стенке паразита, или же в клеточных стенках самих высших

растений. Так, сигнальным веществом синтеза фитоалексина под влиянием фитопатогенного гриба *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* является гептаглюкозид клеточной стенки паразита.

Индукторами синтеза фитоалексинов могут быть также хитиназы, β -глюканазы и другие соединения, находящиеся в высших растениях. В клетках высших растений отсутствуют хитин и глюканы, но имеются ферменты хитиназа и β -глюканаза. Олигосахариды хитина и глюкана фитопатогенных грибов, образующиеся в результате действия хитиназы или β -глюканазы, могут вызывать образование фитоалексинов.

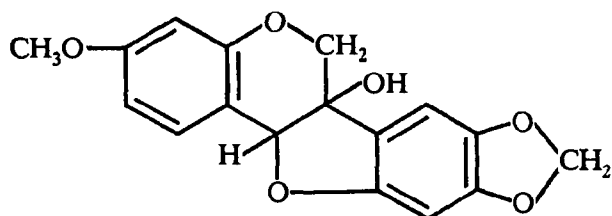
Характерно, что выработанный под влиянием определенного паразита фитоалексин обладает антибиотическим действием по отношению к этому паразиту. По-видимому, устойчивость ряда высших растений к некоторым грибным заболеваниям связана с образованием растениями указанных веществ.

В настоящее время изучено строение некоторых фитоалексинов. К ним относятся 6-метоксибензоксазолин, пизатин и фазеолин. Поврежденные ткани пшеницы, ржи и кукурузы образуют аналогичные вещества, угнетающие развитие некоторых видов бактерий, грибов, а также насекомых, повреждающих эти растения. Антибиотическое вещество, изолированное из кукурузы, представляет собой 6-метоксибензоксазолин и имеет следующее строение:

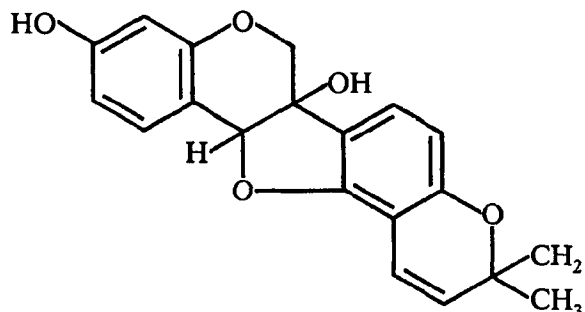


В растениях гороха (*Pisum sativum*) под влиянием некоторых видов фитопатогенных грибов образуется антибиотическое вещество пизатин, подавляющее развитие этих же фитопатогенных грибов.

В клетках фасоли (*Phaseolus vulgaris*), в которые попадает фитопатогенный гриб, образуется антибиотик фазеолин. Строение этого соединения близко структуре пизатина:



Пизатин



Фазеолин

Антибиотики животного происхождения

Антибиотики животного происхождения характеризуются свойствами, отличающими их от других антибиотиков. Обладая антибиотическими свойствами, они в то же время активизируют защитные силы макроорганизма. Сочетание этих свойств делает возможным применение их для профилактики и лечения ряда заболеваний.

Лизоцим (Lysozyme)

Еще в 1909 г. русский ученый П.Н. Лашенков обратил внимание на то, что белок куриного яйца обладает антибактериальным действием. Спустя 13 лет после опубликования наблюдений П.Н. Лашенкова английский ученый А. Флеминг отнес этот белок к энзимам, а также обнаружил, что аналогичным действием обладают выделения ряда тканей человека и животных, растений и микробов. Он назвал эти антибиотические вещества лизоцимом.

Н.А. Красильников и А.И. Кореняко в 1939 г. из культуры *Actinomyces (streptomyces) violaceus* выделили антибактериальный фактор, лизирующий кокки (лизоцим). А.Е. Крисс (1940) подробно изучил этот лизоцим и показал, что он идентичен актиномицетину.

Лизоцим обнаружен в белке куриного яйца, селезенке, сердце, печени, легком, в различных секреторных выделениях (слезы, слизь носа, слюна и др.), в соках некоторых растений, у микроорганизмов и бактериофагов. Приведем некоторые данные об источниках лизоцима в тканях и выделениях животных (по З.В. Ермольевой и Е.Д. Грищенко, 1952):

Источник получения лизоцима	Концентрация, ед./г или ед./мл
Яичный белок	12 500
Выделения слизистой носа	1800
Слезы	950
Слюна	80–100
Плацента	110
Ткань зародыша	13 100
Хрящ	40
Гранулирующая ткань	23–564
Слизистая влагалища	8–27
Сыворотка крови	1,0
Слизистая толстых кишок	3,5
Моча	17
Выделения кожи	10

Более полно изучен лизоцим, выделенный из белка куриного яйца. Кристаллический лизоцим получают непосредственно из яичного белка путем адсорбции на бентонитной глине. С глины лизоцим элюируют 5%-м водным пиридином при рН 5, затем фермент осаждают серноокислым аммонием, подвергают диализу и лиофильно сушат.

Лизоцим белка куриного яйца активен в отношении грамположительных бактерий (*Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*). Менее чувствительны к лизоциму грамотрицательные бактерии. Под влиянием лизоцина происходит лизис чувствительных к нему клеток, что связано прежде всего с действием этого вещества на клеточные стенки, которые при этом разрушаются, а цитоплазматическое содержимое клеток «изливается».

Лизоцим активно действует на клеточную стенку бактерий — непосредственно на пептидогликан, он гидролизует β-гликозидные связи между остатками N-ацетилмурамовой кислоты и N-ацетилглюкозамина в пептидогликане бактериальной стенки, что приводит к распаду полимера и лизису бактериальной клетки.

Под влиянием лизоцима некоторые виды грамположительных бактерий выделяют нуклеиновые кислоты.

Лизоцим — белок с относительно невысокой молекулярной массой (14 700–14 900), обладающий энзиматическими свойствами.

Этот фермент называют также м у р а м и д а з о й.

Изучен аминокислотный состав лизоцимов, выделенных из разных источников (куриные яйца, селезенка кролика, селезенка собаки, млечный сок дынного дерева и др.). Установлено, что молекула лизоцима белка куриного яйца содержит около 130 аминокислотных остатков 18 аминокислот.

Лизоцим не проявляет токсических свойств в отношении организма человека или животных, наоборот, он подобно биостимулятору активизирует защитные свойства макроорганизма. В организме животных лизоцим выполняет защитную функцию в отношении проникновения сапрофитных и патогенных микроорганизмов.

Лизоцим изучался и продолжает изучаться как лечебный препарат, применяемый при инфекционных болезнях, в дерматологии, офтальмологии, хирургии и при воздействии на злокачественные опухоли. Как показали исследования, чистый лизоцим и лизоцим в сочетании с экмолином оказались эффективным средством в борьбе с носительством патогенных и устойчивых к другим антибиотикам стафилококков среди медицинского персонала.

Дефензин (Defenzyn) и азуроцидин (Azurocidin)

Из полиморфонуклеарных* лейкоцитов человека выделены белки, обладающие антимикробным действием (Gabay Joelle et al., 1989). Среди этих белков-антибиотиков два не были ранее описаны. Это дефензин, обладающий высокой антимикробной активностью, и азуроцидин, имеющий широкий антимикробный спектр действия. По активности в отношении *E. coli* он сходен с бактерицидными факторами, увеличивающими проницаемость клеточных мембран.

В 1997 г. дерматологи Кильского университета обнаружили на коже человека антибиотическое вещество, которое они назвали β -дефензином-2. Этот антибиотик убивает некоторые виды бактерий и дрожжи. По химическому строению β -дефензин-2 — белок с небольшой молекулярной массой. Этот белок проникает через клеточную стенку микроорганизмов, проделывая многочисленные поры, и приводит к гибели чувствительные микробы.

Аналогичный β -дефензину-2 белок обнаружен в гортани и легких. Этот антибиотик вырабатывается кожей человека только в ответ на появление на ее поверхности болезнетворных микроорганизмов.

Скваламин (Squalamin)

Скваламин — антибиотик, выделенный в 1992 г. американскими исследователями из небольшой катрановой акулы семейства Squalidae, пойманной в заливе Мэн. Ученые еще ранее отмечали, что акулы крайне редко болеют. Это, по-видимому, связано с наличием практически во всех клетках тела акул мощного антибиотика.

Скваламин активен в отношении бактерий, грибов и паразитов. По химическому строению он родственен холестерину и не относится ни к одному из известных классов антибиотиков. Получен синтетический аналог акульего антибиотика, который в настоящее время изучается.

Экмолин (Ecmolin)

Антибиотический препарат экмолин выделен З.В. Ермольевой и ее сотрудниками в 1950 г. из рыб. Установлено, что органы и ткани

* Полиморфонуклеарные, или базофильные, лейкоциты — это крупные клетки от 9 до 15 мкм, циркулирующие в крови несколько часов, а затем перемещающиеся в ткани.

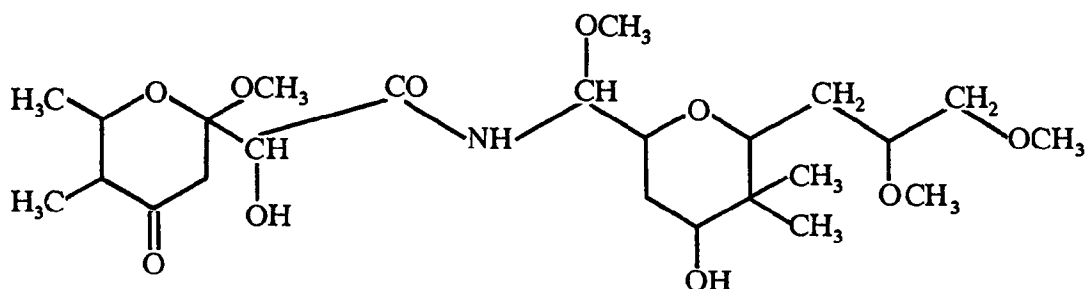
некоторых рыб оказывают антибактериальное действие в отношении грамположительных и грамотрицательной микрофлоры.

Экмолин подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий, активен в отношении дизентерийных и тифозных палочек, кишечной палочки и холерного вибриона, стафилококков, стрептококков и вируса гриппа.

Экмолин — это смесь белков протаминов (молекулярная масса не более 10 000), богатых диаминомонокарбоновыми кислотами. Он малотоксичен. В сочетании с пенициллином и новокаином увеличивает антибиотическую активность пенициллина в организме больного.

Педерин (Pederin)

Педерин — антибиотик, выделенный из жука *Paederus fuscipes* (С. Cardani et al., 1965). Это вещество обладает высокой цитотоксической активностью. Применяется в дерматологии. Антибиотик не обладает мутагенными свойствами и не вызывает хромосомных aberrаций. Педерин имеет следующее строение:



Механизм биологического действия антибиотика связан с тем, что он подавляет синтез белка и ДНК, но не оказывает влияния на РНК. Это предполагает участие педерина в метаболической модификации клеток.

Круцин (Cruzin)

Противораковый препарат круцин впервые получен Н.Г. Ключевой и Г.И. Роскиным в 1946 г. из культуры *Schizotrypanum cruzi*. Мысль об использовании *S. cruzi* в терапии рака была высказана Г.И. Роскиным еще в 1931 г.

S. cruzi — паразитическое простейшее, вызывающее трипанозомиоз, широко распространенный в Латинской Америке под названием болезни Шагоса. Возбудитель этого заболевания был открыт в 1909 г. Ш. Шагосом в Бразилии.

Важное свойство *S. cruzi* — то, что этот организм наряду с нормальными тканями и органами человека поражает и злока-

чественные опухоли, разрушая их. При этом опухоли поражаются паразитом гораздо активнее, чем нормальные ткани.

Круцин образуется в клетках паразита, причем величина антибластомной активности зависит от цикла развития *S. cruzi*.

Работами Г.И. Роскина и его сотрудников показано, что наиболее чувствительны к действию круцина опухоли эпителиального происхождения. Круцин не токсичен.

Интерферон (Interferon)

К антибиотикам животного происхождения следует отнести также белковое вещество интерферон, образующееся в клетках под действием вирусов, а также некоторых видов бактерий, бактериальных эндотоксинов или синтетических полимеров. Интерферон открыт в 1957 г. Айсексом и Линленманном. Известно несколько видов интерферона, определяемых характером индуцирующего фактора. Все эти препараты — слабокислые белки с молекулярной массой примерно 30 000.

Для получения больших количеств интерферона используют шестидневные однослойные культуры клеток куриного эмбриона или культивируемые лейкоциты крови человека, зараженные определенным видом вируса. Иными словами, для получения этого вещества создают определенную систему вирус-клетка.

В последнее время благодаря успехам генной инженерии удалось изолировать из клеток человека ген, ответственный за биосинтез интерферона, и встроить его в ДНК соответствующего вида микроорганизма. В результате получен микроб, способный в процессе развития синтезировать этот ценнейший биорегуляторный белок.

Интерферон подавляет размножение вирусов. В связи с этим в последнее время он привлекает внимание как лекарственный препарат при вирусных инфекциях.

Животный организм может вырабатывать интерферон в ответ на введение стимуляторов интерферонообразования. Это явление представляет большой интерес и может быть использовано в качестве профилактического фактора при заболеваниях, вызываемых вирусами.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте характеристику антибиотических веществ, образуемых высшими растениями и животными.
2. Что такое фитоалексины и интерфероны?

НАПРАВЛЕННЫЙ БИОСИНТЕЗ АНТИБИОТИКОВ

Как показывает практика, за последние 30 лет обнаружить среди продуктов жизнедеятельности организмов совершенно новые классы соединений антибиотиков практически не удалось. Выделяемые новые биологически активные соединения, как правило, представители уже известных основных групп антибиотиков. Поэтому в настоящее время ученые многих лабораторий мира изучают пути и способы направленного биосинтеза антибиотических веществ в целях получения биологическим путем различных модификаций уже известных антибиотиков с более ценными свойствами.

Под направленным биосинтезом антибиотиков следует понимать вмешательство экспериментатора в метаболизм организма-продуцента (главным образом микроорганизма) для получения одного либо нескольких антибиотиков или же новых по сравнению с обычно образующимися соединениями форм антибиотических веществ.

В результате направленного биосинтеза удастся модифицировать известные антибиотики, отличающиеся от исходных веществ рядом ценных свойств, которые не могут быть синтезированы химическим путем. Поэтому изучение вопросов, связанных с названной проблемой, имеет существенное теоретическое и практическое значение.

Многие микроорганизмы в процессе жизнедеятельности способны одновременно образовывать несколько антибиотических веществ, как близких по химическому строению и биологическому действию, так и значительно различающихся. Например, *Streptomyces albireticuli* вырабатывает три антибиотика: эйромицин, энтеромицин и карбомицин; *S. showdoensis* — четыре антибиотика: актиномицин в мицелии и три антибиотика в культуральной жидкости: макролид, шоудомицин и антибиотик неизвестной природы. В культуре *S. netropsis* одновременно образуются антигрибные полиеновые антибиотики (смесь тетраена, пентаена и гептаена) и антибактериальное вещество.

Brevi bacillus продуцирует 23 антибиотика полипептидной природы, отличающиеся аминокислотным составом. *B. subtilis* синтезирует более 60 различных антибиотиков. *Penicillium chrysogenum* образует 7 пенициллинов, имеющих близкую основную структуру. *Tolypocladium inflatum* в процессе развития вырабатывает большой ряд (более 20) циклических полипептидов, именуемых

циклоспоринами. Аналогичных примеров можно привести большое число.

К числу антибиотиков, близких по своей природе и биологическим свойствам и образуемых организмом одновременно, можно отнести такие соединения, как пенициллины, стрептомицины, тетрациклины, полимиксины, бацитрацины, цефалоспорины, низины, неомицины, родомицины, кандицидины, актиномицины и другие вещества.

Одновременное образование одним организмом антибиотиков, различающихся по химической структуре и биологическим свойствам, можно показать на следующих примерах: *S. griseus* наряду с биосинтезом стрептомицина может продуцировать маннозидострептомицин, актидион и гризеин; *Aspergillus fumigatus* одновременно может вырабатывать спинулозин, глиотоксин и фумигатин; *S. fradiae* синтезирует неомицин и фрадицин; *S. aureofaciens* наряду с биосинтезом тетрациклинов (хлортетрациклин и тетрациклин) образует антигрибное вещество; *S. rimosus* одновременно может продуцировать окситетрациклин и римоцидин.

Способность бактериальных культур, например *B. bacillus*, синтезировать разные по химическому составу полипептидные антибиотики показана в табл. 40 (см. с. 195).

Изучение закономерностей биосинтеза того или иного антибиотического вещества, выяснение условий развития организма, обеспечивающих преимущественное образование одного из возможных антибиотиков, дает возможность вмешиваться в биосинтетическую деятельность микроба и давать ей нужное направление. Так, достаточная аэрация культуры *S. griseus* обеспечивает благоприятные условия для преимущественного накопления стрептомицина и тормозит образование маннозидострептомицина. При хорошей аэрации среды создаются условия оптимальной деятельности фермента маннозидострептомициназы, расщепляющего менее активный антибиотик маннозидострептомицин на стрептомицин и маннозу.

Отсутствие в среде ионов хлора или наличие в субстрате наряду с хлором веществ, ингибирующих процесс биологического хлорирования, приводит к накоплению в культуре *S. aureofaciens* не хлортетрациклина, а тетрациклина или другого аналога из этой группы антибиотиков.

Однако, как уже отмечалось, наряду с изменением условий культивирования микроба не менее важную роль в проблеме получения того или другого антибиотика играет селекция организмов. В результате обработки продуцентов антибиотиков мутагенами и последующей селекции получены штаммы продуцентов,

образующие нежелательный антибиотик в небольшом количестве, а нужный препарат составляет при биосинтезе основную часть продукции. Так, продуцент стрептомицина *S. griseus* может вырабатывать одновременно со стрептомицином и значительное количество нежелательного антибиотика маннозидострептомицина. В результате селекции получены штаммы *S. griseus*, образующие маннозидострептомицина не более 5% от общего выхода антибиотика.

Для направленного образования преимущественно одного из ряда естественно синтезируемых антибиотиков или их модификации применяют различные методы вмешательства в обмен веществ микроорганизмов.

Во-первых, это достигается соответствующим изменением условий культивирования продуцентов антибиотиков, и прежде всего изменением состава среды.

Во-вторых, в среду для культивирования микроорганизма — продуцента антибиотического вещества могут вводиться специфические ингибиторы.

В-третьих, характер обмена веществ микроорганизма, связанного с модификацией структуры образуемого антибиотика, может быть изменен в результате получения от исходного штамма-продуцента соответствующих мутантов.

В-четвертых, свойства известных антибиотических веществ можно изменить в результате воздействия на эти антибиотики одного из микроорганизмов или ферментов, образуемых ими.

В-пятых, изменить характер метаболизма, связанный с биосинтезом антибиотика, можно путем применения комбинации перечисленных выше факторов. Например, используют соответствующие мутанты с одновременным внесением в среду для их развития специфических предшественников или ингибиторов.

Изменение состава питательной среды

Биосинтетической деятельностью микроорганизмов можно управлять путем изменения условий культивирования организма, и в первую очередь состава питательной среды. Рассмотрим основные способы изменения условий культивирования микроорганизмов, позволяющие осуществлять направленный биосинтез антибиотиков.

1. Введение в среду веществ, которые, включаясь в молекулу антибиотика, обеспечивают получение препарата с новыми свойствами, широко применяется при биосинтезе различных форм пенициллинов. Так, если в среду добавить фенилуксусную кислоту $C_6H_5CH_2COOH$, то *Penicillium chrysogenum* образует преимущественно

бензилпенициллин, содержащий в качестве радикала молекулы антибиотика фенилуксусную кислоту. Если же в качестве предшественника ввести в среду феноксиуксусную кислоту $C_6H_5OCH_2COOH$, то гриб начинает синтезировать новый тип пенициллина — феноксиметилпенициллин, отличающийся от бензилпенициллина рядом свойств.

В настоящее время в результате подобного вмешательства в процесс биосинтеза пенициллина удалось получить несколько десятков пенициллинов (см. 348).

2. Добавление в среду отдельных аминокислот, органических кислот (в виде солей) или иных компонентов, принимающих участие в обмене веществ организма, позволяет целенаправленно изменять биохимическую деятельность микроба в сторону преимущественного биосинтеза одного из ряда возможных антибиотиков или препарата с новыми свойствами.

В этом случае введенное в среду вещество может непосредственно не включаться в молекулу антибиотика, как в случае биосинтеза разных типов пенициллина. Иногда такое вещество не входит в состав молекулы антибиотика, но способствует изменению характера некоторых реакций обмена, ведущих к образованию антибиотика с измененной структурой.

Указанный принцип применяется при направленном биосинтезе ряда антибиотиков, и прежде всего антибиотиков, имеющих полипептидную структуру.

Образование различных актиномицинов в процессе развития стрептомицетов во многом зависит от источника азотного питания в среде. Если в среде присутствует треонин, то *Streptomyces antibioticus* вырабатывает только В-комплекс актиномицина. Однако при наличии в субстрате глутаминовой кислоты в качестве единственного источника азота вначале образуется В-тип, а затем синтезируется А-тип актиномицинов.

S. chrysomallus, образующий комплекс С-типа, в качестве основного компонента содержит актиномицин C_2 в том случае, если этот организм развивается в среде с нитратным (KNO_3) источником азота. Но этот же стрептомицет синтезирует актиномицин C_3 , если среда содержит единственный источник азота в виде глицина CH_2NH_2COOH .

Направление биосинтеза актиномицина культурой стрептомицета может быть изменено добавлением к синтетической среде некоторых аминокислот. Так, добавка D-L-изолейцина вызывает биосинтез нового вида актиномицина (E_1 - и E_2 -тип), в котором обнаружен N-метилизолейцин вместо N-метилвалина. Новые компоненты актиномицинов синтезируются культурой *S. antibioticus* при добавлении к среде L-изолейцина. Но амино-

кислота может быть введена в пептид актиномицина в форме N-метилизoleyцина. В зависимости от присутствия в среде той или иной аминокислоты изменяется соотношение различных компонентов актиномицинов при синтезе антибиотика (табл. 89).

Таблица 89

Влияние аминокислот на синтез актиномицинов
(no Katz, Goss, 1958)

Среда	Концентрация добавленной аминокислоты, %	Относительное процентное содержание актиномициновых компонентов					
		I	II	III	IV	V	*
Глутаминовая кислота	0,0	6,4	2,3	3,2	68,3	17,2	2,6
То же + гидроксил-L-пролин	0,25	31,0	3,8	7,1	25,3	30,0	3,0
» + саркозин	0,05	9,1	25,6	35,0	24,4	5,9	0,0
» + N-ацетилглицин	0,25	8,1	2,0	3,2	32,7	51,1	3,0
» + L-изолейцин	0,25	4,7	2,8	5,8	17,2	30,6	38,9

* Неидентифицированный компонент, передвигающийся на круговой бумажной хроматограмме быстрее, чем компонент V.

Изучение влияния валина на биосинтез аурантина, образуемого культурой *S. chrysomallus*, показало, что при развитии стрептомицета на среде с KNO_3 антибиотик состоит из 65% аурантина₁ (AU₁) и 35% аурантина₂ (AU₂). Если стрептомицет культивировать на среде с валином и через 48 ч от начала развития добавить KNO_3 , количество фракций AU₁ снижается до 33% и увеличивается количество фракций, содержащих валин: AU₂ — 43% и AU₃ — 24%. Таким образом, влияя на процесс биосинтеза, можно получать преимущественно образование аурантина той или иной формы, существенно отличающейся по токсичности (по Силаеву, Катрухе, 1977):

Форма аурантина	LD ₅₀ , мкг/кг
Аурантин	1000 ± 115
AU ₁	1480 ± 160
AU ₂	780 ± 144
AU ₃	750 ± 178
AU ₅	2650 ± 297
AU ₆	2800 ± 530
AU ₇	2450 ± 696

Из этих данных следует, что наименее токсичны формы аурантина, содержащие D-лейцин (AU₅, AU₆ и AU₇), более токсичны

формы, содержащие D-алло-изолейцин (АУ₁), и особенно токсичны формы аурантина, в состав которых входит D-валин (АУ₂ и АУ₃).

Обобщенные данные изучения влияния аминокислот лейциновой группы на рост стрептомицета и биосинтез им аурантина приведены в табл. 90, из которой видно, что изученные аминокислоты не оказывали влияния на рост стрептомицета, но заметно влияли на биосинтез актиномицина. Так, валин в D-форме и изолейцин в DL-форме подавляли биосинтез антибиотика. Однако такие аминокислоты, как лейцин, норвалин и норлейцин, вносимые в культуру также в D-форме, не ингибировали образование актиномицина.

Таблица 90

Влияние аминокислот лейциновой группы на рост стрептомицета и биосинтез актиномицина

(Нефелова, 1975)

Аминокислота	Биомасса, мг/мл	Актиномицин		Новые компоненты, %	
		мкг/мл	%		
Контроль	0,70	450	100	0	
Валин	L	0,75	480	109	30
	D	0,80	70	15	10
	DL	0,78	175	26	
Изолейцин	L	0,72	540	120	31
	DL	0,70	275	61	46
Лейцин	L	0,71	465	103	38
	D	0,70	505	112	15
	DL	0,72	490	110	
Норлейцин	L	0,70	450	110	8
	DL	0,75	490	110	4,2
Норвалин	L	0,69	500	110	42
	DL	0,71	520	120	31

Под влиянием различных аминокислот, вносимых в среду, стрептомицет вырабатывал новые компоненты антибиотика. Наибольший синтез этих компонентов наблюдался в случае присутствия в среде изолейцина (DL-форма) и норвалина (L-форма). Подобный путь получения новых актиномицинов с измененными свойствами имеет важное значение. Известно, что некоторые актиномицины из С-комплекса обладают противоопухолевым действием и в то же время эти антибиотики проявляют высокую токсичность в отношении макроорганизма.

Получение новых форм актиномицинов, обладающих антиопухолевым действием с одновременным снижением их токсичности в ходе направленного биосинтеза, имеет важное практическое и теоретическое значение.

При образовании новобиоцина культурой *S. spheriodes* (штамм 35) биосинтез биологически активных и неактивных форм антибиотика зависит от ряда факторов среды. Так, различные концентрации цитрата натрия в среде, содержащей в качестве источника углерода глюкозу (5%) и в качестве источника азота нитрат натрия (0,6%), значительно изменяют биосинтез не только общего количества антибиотика, но и его аналогов (см. табл. 72). Различные соотношения форм новобиоцина, синтезируемых актиномицетом, можно получить также при добавлении к среде различных органических кислот в количестве 0,25% перед началом развития продуцента антибиотика (см. табл. 73).

Таким образом, используя разные концентрации лимонной кислоты в среде или заменяя ее другими органическими кислотами, можно стимулировать или же, наоборот, тормозить выход как новобиоцина, так и его биологически неактивных форм.

3. Направление биосинтетической деятельности микроорганизма путем изменения соотношения концентрации источников углерода и азота в среде или же степени аэрации культуры. Культура *Bacillus licheniformis* продуцирует группу полипептидных антибиотиков лихениформинов. Однако в зависимости от состава среды этот организм может образовывать другие полипептиды — бацитрацины. Если в составе среды имеется лактат аммония и отношение углерода к азоту невысокое, то бактерии синтезируют лихениформины. Если же в субстрате содержится небольшое количество аммония, и главным образом аммония минеральных солей, т.е. созданы условия повышенного соотношения углерод-азот, организм начинает продуцировать бацитрацины (результаты влияния аэрации см. на с. 228–229).

4. Изменение активной кислотности (рН) среды. В результате изменения рН среды для культивирования микроорганизмов можно направленно получать различные формы антибиотиков. Так, при изменении рН среды для культивирования *Nocardia fructiferi* subsp. *ristomycini* образуются два основных антибиотика: ристомицин А и ристомицин Б. Биологическая активность ристомицина Б примерно в 2 раза выше биологической активности ристомицина А.

Отклонение биосинтеза в сторону продуцирования ристомицина определенного типа зависит от активной кислотности среды. При реакции среды, близкой к нейтральной, преимущественно образуется ристомицин А, повышение рН среды до 7,4–8,8 способствует одновременному биосинтезу ристомицинов А и Б. Дальнейшее подщелачивание среды, обычно происходящее к концу процесса развития нокардий, приводит к выработке биологически менее активных форм антибиотика: ристомицинов I и II, в которые превращаются исходные формы ристомицинов А и Б.

Введение специфического ингибитора

При культивировании продуцента антибиотического вещества в среду можно добавлять специфические ингибиторы. Так, добавление к среде сульфадиазина способствует образованию культурой *S. aureofaciens* наряду с 7-хлортетрациклином и 7-хлор-6-деметилтетрациклином. Сульфаниламид, добавленный к культуре *S. lincolnensis*, селективно подавляет N-метиляцию в процессе синтеза антибиотиков линкомицинового комплекса с выходом N-деметиллинкомицина. Таким образом, сульфадиазин и сульфаниламид выступают в этих случаях в качестве ингибиторов метилирования молекулы соответствующих антибиотиков с образованием модифицированных биологически активных соединений.

S. venezuelae при развитии на обычных питательных средах, содержащих хлориды, вырабатывает хлорамфеникол. Однако при культивировании стрептомицета в среде, свободной от хлора, вместо хлорамфеникола происходит биосинтез ряда его аналогов. У таких аналогов дихлорацетильная группа заменяется остатками уксусной, пропионовой, масляной или валерьяновой кислоты.

Добавление к питательной среде, содержащей хлориды, бромидов (NaBr) наряду с образованием хлорамфеникола способствует синтезу вышеперечисленных ацильных производных, а также биосинтезу других аналогов, содержащих в своем составе ионы Br (ClBrCHCO- и $\text{Br}_2\text{CHCO-}$ групп вместо $\text{Cl}_2\text{CHCO-}$ группы хлорамфеникола). В данном случае ионы брома — ингибиторы биологического хлорирования в процессе биосинтеза молекулы хлорамфеникола.

При выращивании *S. aureofaciens* в среде, в составе которой присутствуют хлориды, происходит в основном биосинтез хлортетрациклина, который составляет 90–95%, и тетрациклина — 5–10%. Однако если культивировать тот же организм в среде, свободной от хлоридов, то выход тетрациклина увеличивается за счет уменьшения образования хлортетрациклина. Тетрациклин может синтезироваться и на обычных средах с хлоридами, но в присутствии специфических веществ, подавляющих процесс хлорирования (бромиды и тиоцианиты, а также тиомочевина, тиоурацил и меркаптобензотиазол).

При применении веществ, тормозящих процесс хлорирования, наблюдается образование тетрациклина — до 90% и более от общего количества антибиотиков, т.е. соотношение хлортетрациклина и тетрациклина диаметрально противоположно соотношению этих антибиотиков при развитии стрептомицета на обычных средах (см. рис. 40).

Димеркаптотиадиазол — активное вещество, тормозящее процесс хлорирования при развитии *S. aureofaciens*. Однако торможение приостанавливается в присутствии ионов серебра (Ag^+) и особенно ионов меди (Cu^{2+}).

Таким образом, тиомочевина, 2-тиоурацил, 2-меркаптобензотиазол и тионамид действуют как ингибиторы хлорирования, по-видимому, посредством влияния на медьсодержащую оксидазу.

Ионы брома не просто подавляют процесс хлорирования и, следовательно, резко снижают образование хлортетрациклина. Избыток их в среде приводит к синтезу нового аналога тетрациклиновых антибиотиков — бромтетрациклина.

Следовательно, зная факторы, влияющие на биосинтез того или иного тетрациклинового антибиотика культурой *S. aureofaciens*, можно направлять этот процесс в нужную сторону.

Использование мутанта исходного штамма

Получение модификации структуры синтезируемого антибиотика возможно в результате выделения из исходного штамма продуцента антибиотика соответствующего мутанта. Применение мутантов от исходных штаммов микроорганизмов дает возможность вести направленный биосинтез ряда антибиотических веществ.

Streptomyces caelestis образует антибиотик целестицетин. Мутант, полученный при обработке этого штамма нитрозогуанидином, способен синтезировать 7-О-деметилцелестицетин (последний не вырабатывается исходным штаммом продуцента).

От продуцента хлортетрациклина получен мутант, способный синтезировать преимущественно тетрациклин. В литературе об антибиотиках имеется ряд аналогичных примеров.

Воздействие микроорганизма или его фермента

Направленно изменять свойства антибиотиков в процессе развития продуцента можно воздействуя на них определенным микроорганизмом или образуемым им ферментом. Применение микроорганизмов для трансформации различных органических соединений, в том числе и антибиотиков, — широко распространенное явление. Трансформация веществ может осуществляться развивающейся культурой соответствующих микроорганизмов, экстрактами, выделенными из клеток, или чистыми ферментными системами.

Реакции, которые могут проявлять микроорганизмы в отношении антибиотических веществ, весьма разнообразны: реакции окисления, восстановления, гидролитические реакции, реакции конденсации, изомеризации, образование новых С=С-связей и осуществление гетерофункций.

Основные реакции микробной трансформации антибиотиков приведены ниже (Betina, 1983):

Реакция	Антибиотики, способные подвергаться модификации
Ацилирование	Хлорамфеникол, неомицины, канамицины, гентамицины, сизомицин, циклогексамид, спирамицин
Фосфорилирование	Канамицины, стрептомицин, дегидрострептомицин, неомицины, паромамин, паромомицин, гентамицины, линкомицин, клиндамицин, туберцидин
Аденилирование	Стрептомицин, маннозидострептомицин, блуэнзомицин, спектиномицин, гентамицин С, клиндамицин
Деметилирование	Гризеофульвин, линкомицин, клиндамицин
Дегидрогенизация	Дегидроабиковиромицин, гризеофенон А
Карбоксиметилирование	Рибостамицин
Гидроксиметилирование	Н-деметилклиндамицин, гризеофульвин
Окисление, гидроксильрование	Фузидиевая кислота, формицин В, микофеноловая кислота, дауномицин, маридомицин
Сульфоксидирование	Линкомицин, клиндамицин
Гидратация	Тойокамицин, 5а-6-ангидротетрациклин
Восстановление	Хлорамфеникол, тилозин, дегидрогризеофульвин, маридомицин, низин, субтилин
Деаминирование	Формицин А, пурамицин
Гидролиз:	
лактона	Актиномицин, эхиномицин, этамицин, антимицин А, вернамицин В ₂
лактама	Пенициллин, цефалоспорин
амида	Пенициллин, цефалоспорин, новобиоцин, блеомицин В ₂ , хлорамфеникол, полимиксины, тироцидин, грамицидин С
сложного эфира	Цефалоспорин, лейкомицин, маридомицин
гликозида	Маннозидострептомицин
Изомеризация	Шоудомицин
Трансгликозилирование	Неамин, канамицин А, моненсин

В большинстве случаев антибиотики, модифицированные биологическим способом, *in vitro* существенно теряют биологическую активность. Однако в организме больного они могут проявлять антибиотические свойства. Клиндамицин-2-фосфат и клиндамицин-3-фосфат не обладают биологической активностью *in vitro*, но, попадая в организм, легко гидролизуются с образованием биологически активного соединения клиндамицина.

При добавлении клиндамицина к среде, в которой развивается *Streptomyces punipalus*, происходит модификация антибиотика

и он в основной массе превращается в деметилклиндамицин. Аналогичный процесс происходит и в случае линкомицина, который в результате воздействия *S. punipalus* превращается в деметилсоединение. При этом необходимо отметить, что активность деметиллинкомицина гораздо ниже активности линкомицина.

Ниже показана относительная антибиотическая активность (тест-организм *Sarcina lutea*) линкомицина и его производных (из Betina, 1983):

Антибиотик	Относительная активность
Линкомицин	1,0
1-Деметиллинкомицин	0,05
Линкомицина сульфоксид	0,01
Клиндамицин	4,0
1-Деметилклиндамицин	8,0
Клиндамицина сульфоксид	1,0

Как видно из приведенных данных, клиндамицин и его производные в 4 раза активнее линкомицина и его производных. Эти антибиотики обладают широким антимицробным спектром в отношении анаэробных организмов. Клиндамицин находит применение при лечении инфекций, вызываемых стафилококками. Установлена высокая биологическая активность клиндамицина по отношению к *Plasmodium falciparum* — возбудителю малярии.

Мутасинтез

Использование комбинации мутантов — продуцентов антибиотических веществ и предшественников позволяет направлять биосинтез антибиотиков по нужному пути и в результате получать вещества с измененными свойствами (метод мутасинтеза).

Мутасинтез — один из перспективных методов получения новых антибиотиков методом направленного биосинтеза. Суть его состоит в том, что в результате генетических манипуляций получают мутант продуцента, который потерял способность синтезировать один или несколько фрагментов молекулы антибиотика. При внесении в среду для культивирования такого мутанта недостающих фрагментов, синтезированных химическим путем, или других, близких им по химической структуре соединений, мутант способен включать их в молекулу образуемого антибиотика.

Этот процесс мутасинтеза можно представить в виде схемы (рис. 58).

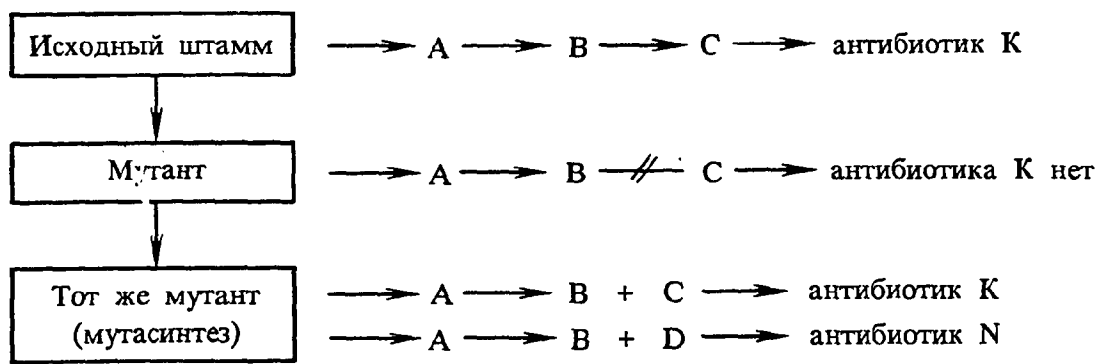


Рис. 58. Принципиальная схема мутасинтеза

Как видно из схемы, мутант исходного штамма продуцента антибиотика К лишен возможности синтезировать компонент С. В этом случае антибиотик К не образуется. Если в среду, где развивается мутант, внести компонент С, то начнется синтез антибиотика К. Если же вместо компонента С внести в среду близкий по структуре компонент D, то этот же мутант будет образовывать новый антибиотик N.

Так, в лаборатории Д. Готтлиба (США) в 1969 г. был получен мутант *S. fradiae* — продуцент неомицина, который способен синтезировать молекулу антибиотика, за исключением ее 2-дезоксистрептаминовой части.

Биосинтез неомицина этим мутантом отмечается только в том случае, если в среду для его развития добавлялся 2-дезоксистрептамин. При замене этого соединения его аналогами удалось получить новые биологически активные неомицины.

Сходный метод был использован и для получения аналогов других антибиотиков (новобиоцина, стрептомицина, гентамицина и некоторых других).

* * *

Итак, пути регулирования обмена веществ у синтезирующих антибиотики микроорганизмов связаны в основном с изменениями условий их культивирования, с характером их развития. При этом следует иметь в виду, что продукты жизнедеятельности микроорганизмов, или так называемые конечные продукты метаболизма, по-видимому, оказывают на биосинтез антибиотиков большее влияние, чем, например, предшественники образования антибиотических веществ.

Рассмотренные здесь основные способы вмешательства в метаболизм микроорганизмов, позволяющие осуществить направленный синтез антибиотиков, и отдельные примеры такого процесса показывают, что проблема направленного получения антибиотических веществ имеет огромное теоретическое и практическое значение. Однако успешное решение этой проблемы возможно

на основе глубокого изучения физиологии обмена веществ организма и путей биосинтеза антибиотиков.

Вместе с тем необходимо иметь в виду, что направлять биосинтетическую деятельность того или иного организма можно только в пределах его наследственной способности образовывать в процессе жизнедеятельности те или иные антибиотики. Иными словами, создание различных условий культивирования, например, для *Penicillium chrysogenum* или любого другого продуцента пенициллина и введение в субстрат предшественников позволяют ожидать биосинтез только пенициллинов. Такой организм, по-видимому, никогда не сможет синтезировать антибиотики типа стрептомицина, фумагиллина или полимиксина. Те же самые закономерности имеют место и в отношении любых других продуцентов антибиотиков.

Продуцент хлортетрациклина *S. aureofaciens* под влиянием изменения условий культивирования (состав среды) способен изменять направление биосинтеза, но только в пределах образования тетрациклиновых антибиотиков.

Эти примеры еще раз показывают, что образование антибиотиков носит не случайный характер, зависящий только от условий культивирования организма. Биосинтез антибиотиков — это биологическое свойство организма, возникшее в ходе эволюционного развития вида и наследственно закрепленное. Условиями культивирования можно стимулировать или, наоборот, подавлять способность к биосинтезу антибиотика, но нельзя вызвать образование вещества, не характерного для обмена определенного организма.

Направить биосинтетическую деятельность организма на получение нового, не свойственного данному штамму антибиотика теоретически возможно лишь в том случае, если под влиянием внешних условий коренным образом будет изменена природа (генотип) организма; в этом случае образуется новый вид микроорганизма с новым типом обмена веществ. С помощью генно-инженерных манипуляций можно сконструировать организм, который будет синтезировать тот или иной не свойственный исходному штамму антибиотик. Однако это не имеет отношения к вышеприведенной оценке естественно существующих видов (штаммов) микроорганизмов.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое направленный биосинтез антибиотиков? Его значение в процессе получения антибиотических веществ.
2. Охарактеризуйте основные пути достижения целенаправленного биосинтеза антибиотиков.

ХАРАКТЕР И МЕХАНИЗМ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АНТИБИОТИКОВ

Общие сведения о действии антибиотиков

Характер и механизм биологического действия антибиотиков зависит прежде всего от их химической природы, от концентрации препарата, вида организма и микроструктуры его клеток, от условий проявления действия и других факторов.

Уже первое знакомство с действием антибиотиков на микроорганизмы показывает, что одни из них — бензилпенициллин, фумагиллин, бацитрацин, сарцидин — подавляют развитие сравнительно ограниченного числа видов бактерий, другие — тетрациклины, хлорамфеникол, эритромицин, карбомуцин — подавляют рост многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий, риккетсий и некоторых других групп организмов. Таким образом, антибиотики не обладают универсальным свойством убивать все живое, что находится в контакте с ними. Одни организмы оказываются чувствительными, а другие — устойчивыми к действию антибиотиков. Иногда под влиянием антибиотиков (например, стрептомицина) из числа вначале чувствительных форм бактерий возникают антибиотикозависимые варианты, не развивающиеся в отсутствие данного антибиотика (см. рис. 31).

Действие антибиотика на определенные организмы характеризуется его антимикробным спектром.

В зависимости от природы антибиотика, его концентрации, времени действия, микроструктуры клетки организма, в контакте с которым находится антибиотик, и внешних условий — температуры, рН, γH_2 , а также других факторов антибиотические вещества могут проявлять цитостатическое (задерживать рост клеток), цитоцидное (убивать клетки) или цитолитическое (растворять клеточную стенку и в результате приводить клетки к гибели) действие. Антибиотики близкого химического строения обычно имеют сходный антимикробный спектр (см. данные о тетрациклинах, полиенах и др.).

Каждый антибиотик имеет свои оптимальные границы рН, где проявляется его максимальная антимикробная активность (Рожавин, 1988):

Антибиотик	Границы оптимальных значений pH
Бензилпенициллин	6,0–6,5
Ампициллин	5,0–6,0
Карбенициллин	6,0–8,0
Цефалоридин	7,5–8,5
Цефалотин	6,0–7,3
Цефалексин	6,0–7,0
Тетрациклины	6,2–6,5
Левомецетин	2,0–9,0
Эритромицин	8,0–8,5
Розамицин	8,0–8,5
Олеандомицин	7,5–8,0
Рифамицин SV	5,5–6,0
Рифампицин	5,5–8,0
Стрептомицин	7,5–8,0
Канамицин	7,6–8,0
Неомицин	7,0–8,0
Гентамицин	7,5–8,0
Тобрамицин	7,0–8,0
Сизомицин	7,5–8,0
Полимиксин В	6,5–7,5
Ристомицин	5,0–7,0
Ванкомицин	5,0–7,0
Фузидин	6,0
Нистатин	4,5–6,5
Трихомицин	5,0

Большое влияние на характер действия антибиотиков оказывает их концентрация. Суббактериостатические дозы некоторых антибиотических веществ не только не угнетают рост чувствительных к ним микробов, но, наоборот, стимулируют их развитие. Как правило, при концентрации антибиотика выше дозы, вызывающей бактериостатический эффект, наблюдается бактерицидное действие препарата.

Если вещество обладает бактериостатическим, бактерицидным или бактериолитическим свойством, то это указывает лишь на конечный результат действия антибиотика, а не на механизм, при помощи которого получен тот или другой биологический эффект.

Под механизмом биологического действия антибиотика следует понимать те изменения в биохимической деятельности клетки или, точнее, те нарушения путей обмена веществ микроорганизма, контролируемые соответствующими генами, которые вызываются данным препаратом и в конечном счете прекращают развитие или ведут к гибели организма. Исследование действия антибиотика помогает вскрыть причины его биологического эффекта в отношении как микробной клетки, так и макроорганизма.

Изучение механизма биологического действия антибиотических веществ ставит своей целью определение нарушений обмена веществ, вызываемых антибиотиком в микробной клетке, установление точки или точек его главного, основного приложения в цепи обменных реакций, определение мишеней (фермента или ферментов*) действия антибиотика, выявление молекулярных основ действия антибиотического вещества, а также установление причин отсутствия аналогичного действия антибиотика на резистентные к нему формы микробов и макроорганизмы.

Изучение механизма действия антибиотиков дает возможность выявить и решить ряд очень важных вопросов (Demain, 1975).

1. Определение функции нормальных клеток.
2. Отношение между мишенями, на которые направлено действие антибиотика, и функциями клетки.
3. Размещение в клетке мишени для антибиотика.
4. Установление антибиотика для лечения определенного больного.
5. Открытие новых лекарственных препаратов.
6. Использование селективных мишеней для поиска новых антибиотиков.
7. Планирование получения новых полусинтетических антибиотиков.
8. Определение наиболее эффективных комбинаций антибиотиков.
9. Обоснованный подбор антибиотиков против резистентных форм микроорганизмов.
10. Применение антибиотиков, не связанное с подавлением бактерий.

Как отмечает Ф. Хан, при определении механизма биологического действия антибиотика необходимо учитывать ряд критериев.

1. Подавляемая реакция должна быть жизненно необходимой для клетки.
2. Подавление должно быть специфичным, т.е. обнаруживаться только у организмов, чувствительных к действию определенного антибиотика.
3. Антибиотик должен подавлять реакцию примерно в тех же концентрациях, в которых он вызывает подавление роста.
4. Подавление должно следовать закону «все или ничего».
5. Подавление данной реакции должно определяться химической структурой антибиотиков точно так же, как и подавление роста.

* В бактериальной клетке обнаружено около 3 тыс. ферментов, регулирующих метаболизм.

Несмотря на многообразие химического строения антибиотиков, образуемых разными группами организмов, все они обладают некоторой общностью первичного действия на микробные клетки: а) все антибиотики в той или иной степени адсорбируются клеткой (клеточной стенкой); б) все антибиотики подавляют рост чувствительных культур, даже в очень низких концентрациях; в) все антибиотики обладают избирательным биологическим действием в отношении видов (штаммов) бактерий.

Вместе с тем характер и особенно механизм биологического действия каждого антибиотического вещества специфичны. Даже биологическое действие одного и того же препарата в зависимости от условий среды, в которой он проявляет эффект, неодинаково.

При взаимодействии антибиотика с микробной клеткой он должен проникнуть в клетку и вступить в контакт с соответствующими ферментами, регулируемыми те или иные жизненно важные процессы (синтез клеточной стенки, биосинтез белка, функции мембран и т.д.).

ПОГЛОЩЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ КЛЕТКАМИ МИКРОБОВ

Первый этап взаимодействия микроорганизмов с антибиотиком — адсорбция его клетками. А.Г. Пасынский и Т.Л. Косторская в 1947 г. впервые установили, что одна клетка *Staphylococcus aureus* поглощает примерно 1000 молекул пенициллина. При дальнейших исследованиях эти расчеты были подтверждены. Так, по данным И. Мааса и М. Джонсона, приблизительно $2 \cdot 10^{-9}$ М пенициллина поглощается 1 мл стафилококков, причем около 750 молекул антибиотика необратимо связываются одной клеткой микроорганизма без видимого влияния на ее рост.

Х. Игл с сотрудниками в 1955 г. определил, что при связывании бактериальной клеткой 1200 молекул пенициллина рост бактерий не угнетается. Угнетение роста микроорганизма на 90% наблюдается в тех случаях, когда клеткой будет связано от 1500 до 1700 молекул пенициллина, а при поглощении клеткой до 2400 молекул культура быстро гибнет.

Количество адсорбированного клеткой пенициллина не зависит от концентрации антибиотика в среде. При низких концентрациях препарата (порядка 0,03 мкг/мл) он может весь адсорбироваться клетками, и дальнейшее повышение концентрации вещества не увеличивает количество связанного антибиотика. Имеются данные о том, что фенол препятствует поглощению пенициллина клетками бактерий, однако он не способен освободить их от антибиотика.

Антибиотики-полипептиды адсорбируются микробными клетками в большей степени, чем, например, пенициллины и стрептомицин. Грамицидин С адсорбируется как чувствительными, так и устойчивыми к нему бактериями, причем адсорбция происходит сразу же после внесения антибиотика в суспензию клеток и достигает значительных величин (до 500 мкг/мг сухой биомассы).

В присутствии положительно заряженных ионов (Na^+ , K^+ , NH_4^+ , Mg^{2+}), а также при рН среды, равном 4, поглощение грамицидина С бактериальными клетками заметно снижается. Адсорбированный чувствительными клетками грамицидин С прочно связывается с бактериями и удаляется с них лишь при длительной экстракции подкисленной спиртово-водной смесью. С устойчивого штамма *Escherichia coli* при промывании клеток раствором NaCl удается снять лишь до 30% адсорбированного грамицидина С.

Ванкомицин, образуемый *Streptomyces orientalis* и относящийся к гликопептидным антибиотикам, необратимо и относительно быстро связывается клетками бактерий, чувствительных к нему. При концентрации антибиотика в среде, равной 30 мкг/мг массы сухих бактерий, около 90% ванкомицина связывается с бактериями. Показано, что максимальное связывание ванкомицина бактериальными клетками достигает 10^7 молекул антибиотика на клетку.

Связанные клеткой антибиотики способны проявлять двойное действие: с одной стороны, некоторые из них могут действовать как поверхностно-активные вещества, а с другой стороны, проникая в глубь клетки, антибиотики нарушают отдельные звенья метаболизма.

Гибель клеток под действием поверхностно-активных антибиотиков может быть связана с повреждением механизма осмотического равновесия на поверхности микробной клетки, а также в результате скопления этих веществ у поверхности раздела жидкая фаза — микробная клетка. Изменения в регулировании осмотического давления сопровождаются повреждением клеточной стенки микроба. Нарушение проницаемости клеточной стенки является результатом или прямого влияния антибиотических веществ, или вторичных процессов.

Действие антибиотиков как поверхностно-активных веществ может вызывать диссоциацию белка с отделением от него простетических групп или нуклеиновых кислот. Такие антибиотики могут также денатурировать белки и, следовательно, непосредственно влиять на ферментативные системы, связанные с клеточной стенкой (инвертазы, фосфатазы, различные дегидрогеназы, цитохромные системы).

Таким образом, если антибиотик способен нарушать системы, регулирующие осмотические свойства клеточной стенки, иными словами, если антибиотик выступает в качестве поверхностно-активного соединения, то он может оказывать бактерицидное действие. К числу антибиотических веществ, механизм действия которых связан с поверхностно-активными свойствами, относят грамицидин С, тироцидин, полимиксины, а также тетрациклины, если последние применяются в концентрациях, во много раз превышающих бактериостатические.

Вместе с тем антибиотики, попадая в микробную клетку, могут нарушать отдельные этапы метаболизма организма.

Они могут образовывать комплексы с определенными компонентами клетки, что способно привести к нарушению ее функций, подавлять некоторые звенья в цепи биохимических процессов как путем необратимого связывания антибиотиком одного из компонентов реакции, так и в результате конкурентного подавления биологически важных метаболитов клетки.

ИНАКТИВАЦИЯ СУЛЬФИДРИЛЬНЫХ ГРУПП ФЕРМЕНТОВ

Существует гипотеза, впервые высказанная К. Кэвеллитом, что биологическая активность многих антибиотиков (бензилпенициллина, стрептомицина, алицина, пиоцианина и др.) обусловлена тем, что они вступают в связь с сульфгидрильными группами ($-SH$) ферментов, превращая их в неактивные вещества, но такая точка зрения на механизм действия антибиотиков не была строго обоснована. Однако в литературе появились указания на то, что механизм биологического действия антибиотика низина связан с взаимодействием его с сульфгидрильными группами метаболически важных пептидов (глутатион) и ферментов (ацетилкоэнзим А).

Основные механизмы биологического действия антибиотиков

По механизму биологического действия антибиотические вещества условно подразделяют на несколько основных групп.

1. Антибиотики, ингибирующие синтез клеточной стенки бактерий, а точнее, синтез пептидогликана (пенициллины, бацитрацин, ванкомицин, цефалоспорины, D-циклосерин) и грибов (полиоксины, никкомицин).

2. Антибиотики, нарушающие функции мембран (альбомицин, аскозин, грамицидины, кандицидины, нистатин, трихомицин, эндомицин и др.).

3. Антибиотики, избирательно подавляющие синтез (обмен) нуклеиновых кислот:

а) ингибирующие синтез РНК (актиномицин, гризеофульвин, канамицин, неомицин, новобиоцин, оливомицин и др.);

б) подавляющие синтез ДНК (актидион, брунеомицин, новобиоцин, саркомицин, эдеин и др.).

4. Антибиотики — ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов (азасерин, декоинин, саркомицин и др.).

5. Антибиотики, подавляющие синтез белка (бацитрацин, виомицин, канамицин, метимицин, неомицин, тетрациклины, хлорамфеникол, эритромицин и др.).

6. Антибиотики — ингибиторы энергетического метаболизма (антимидины, олигомицины, патулин, пиоцианин, усниновая кислота и др.).

7. Антибиотики — ингибиторы окислительного фосфорилирования (валиномицин, грамицидины, колицины, олигомицин, тироцидин и др.).

8. Антибиотики с антиметаболитными свойствами (пуромицин, ациодомицин, D-циклосерин и др.).

9. Антибиотики с иммуномодуляторными свойствами (актиномицины С и D, оливомицин, брунеомицин, рубомицин, циклоспорин, макролидный антибиотик К-506 и др.).

Кроме перечисленных процессов антибиотики могут подавлять и другие жизненно важные реакции в клетке.

Антибиотик, включенный в ту или иную группу на основе специфики механизма биологического действия, в зависимости от концентрации препарата и других условий может выступать в роли ингибитора других процессов. Например, тетрациклин в небольших концентрациях оказывает специфическое действие на биосинтез белка бактериями. Но если концентрацию антибиотика увеличить в 100 и 1000 раз то он будет выступать в качестве разобщителя окислительного фосфорилирования.

Следовательно, приведенное деление антибиотиков на группы условно.

Ниже рассматриваются наиболее полно изученные механизмы действия антибиотиков.

АНТИБИОТИКИ, ПОДАВЛЯЮЩИЕ СИНТЕЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ БАКТЕРИЙ

В ходе развития бактерий происходит непрерывный процесс синтеза клеточной стенки, представляющей собой полифункциональную и физиологически активную структуру, через которую происходит взаимодействие между микроорганизмом и средой.

Состав стенки у разных видов неодинаков. Особенно существенные отличия наблюдаются у грамположительных и грамотрицательных бактерий (рис. 59).

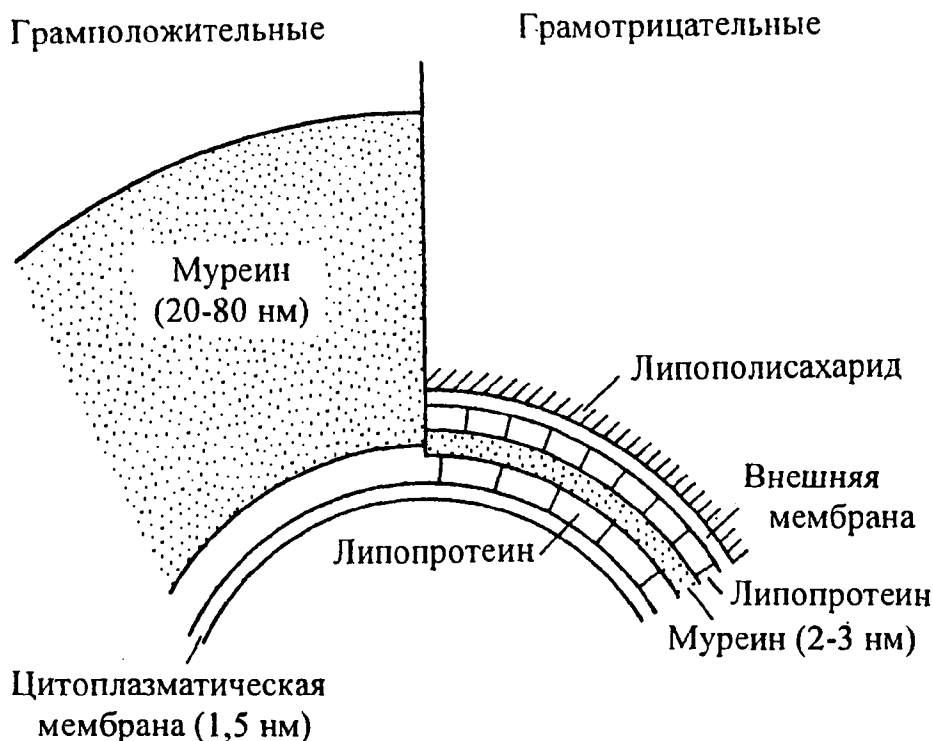


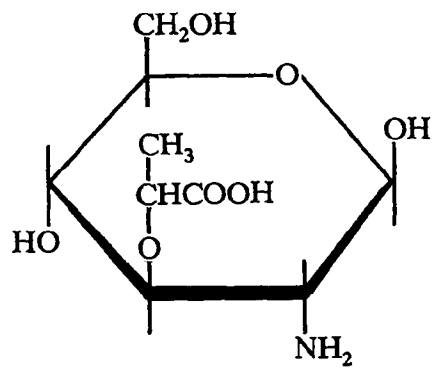
Рис. 59. Схема строения клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий (по Szabo, 1988)

Грамположительные бактерии имеют более просто устроенную клеточную стенку, которая составляет от 20 до 35% массы клетки. Основную массу (от 40 до 90%) клеточной стенки составляет пептидогликан (муреин); толщина его слоя достигает 80 нм.

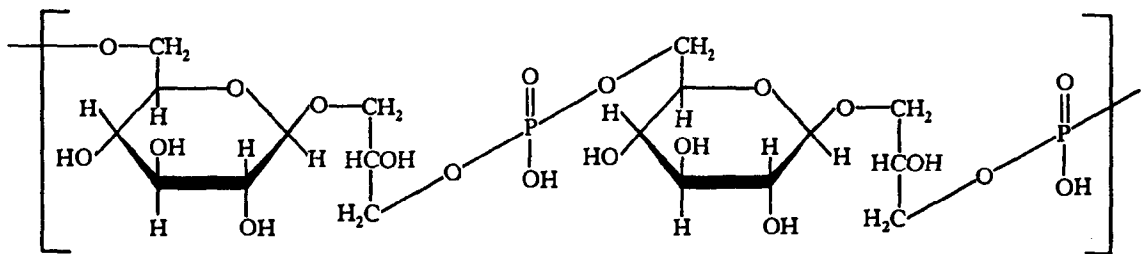
Пептидогликан — это гетерополимер, состоящий из ряда типов субъединиц. Ацетилмурамовая кислота и диаминопимелиновая кислота (в некоторых случаях она заменена лизином) — характерные компоненты пептидогликанов, отсутствующие в других известных биополимерах.

У грамположительных бактерий, в том числе и актиномицетов, пептидогликан — основной компонент клеточной стенки. Он присутствует во всей толще стенки в форме комплекса матрикса с другими полимерами. Пептидогликан образует многослойную структуру с поперечными сшивками. Он обладает опорной функцией полимера в оболочке бактерий, а также регулирует гидролитические процессы в жизнедеятельности бактериальной клетки.

В состав пептидогликана грамположительных бактерий входят четыре сахара, N-ацетилмурамовая кислота (эфир молочной кислоты и ацетилглюкозамина), аминоксахара (глюкозамин, галактозамин и производное глюкозамина — мурамовая кислота), α-глутаминовая кислота, аланин, лизин или диаминопимелиновая кислота. Ниже приведено строение мурамовой кислоты:



С пептидогликаном ковалентно связан кислый полимер, в состав которого входят тейхоевые и тейхуроновые кислоты. Тейхоевые кислоты — это полимерные структуры, построенные на основе глицерина или рибита (пятиатомного спирта), остатки которых соединены между собой фосфодиэфирными связями:



Звено глицеринтейхоевой кислоты из клеток *Streptomyces kanamyceticus*

У грамположительных бактерий между стенкой и цитоплазматической мембраной встречаются так называемые мембранные тейхоевые кислоты.

Клеточные стенки грамположительных бактерий содержат 2–3% липидов от массы клеточной стенки, при гидролизе выделяют ряд аминокислот, среди которых редко встречаются ароматические и серосодержащие.

Образование пептидогликана — хорошо сбалансированный процесс, где наряду с включением определенных субъединиц происходят реакции, связанные с действием специфических литических ферментов. Эти реакции способствуют возникновению новых точек роста клеточной стенки.

Грамотрицательные бактерии имеют сложно организованную (многослойную) клеточную стенку, которая значительно тоньше, чем у грамположительных, она составляет от 6 до 9% массы клетки. В клеточной стенке этих бактерий пептидогликан содержится в небольшом количестве, не превышающем 5–10% от массы стенки. Пептидогликан образует тонкую (до 3 нм) непрерывную сетку, как правило, состоящую из мономолекулярного слоя. Между слоем пептидогликана и цитоплазматической мембраной расположен липопротеиновый слой. Такой же слой липопротеина имеется между внешней мембраной и муреином.

Клеточная стенка грамотрицательных бактерий (в отличие от грамположительных) содержит не только цитоплазматическую, но и так называемую внешнюю мембрану, покрытую снаружи тонким слоем липополисахарида. Через эту мембрану в периплазматическое пространство проникают питательные вещества и выводятся наружу продукты метаболизма. Внешняя мембрана обеспечивает устойчивость бактерий к антибиотикам и другим вредным для них веществам, находящимся в окружающей среде. Так, у грамотрицательных бактерий кишечной группы внешняя мембрана служит барьером для таких антибиотиков, как макролиды, новобиоцин, рифампицин и др.

Внешняя мембрана грамотрицательных бактерий представляет собой липидную бислойную структуру: верхний слой состоит в основном из липополисахаридов, нижний — из фосфолипидов. Эти два слоя связываются белками, расположенными в обеих половинах мембраны.

Во внешней мембране находятся белки-порины, способные образовывать поры (каналы), обеспечивающие неспецифическое прохождение через мембрану веществ с относительно небольшой молекулярной массой. Эти каналы, заполненные водой, располагаются строго перпендикулярно поверхности мембраны.

В зависимости от величины электрического потенциала пориновые каналы могут находиться в открытом или закрытом состоянии. Чем дольше каналы находятся в закрытом состоянии, тем в большей степени обеспечивается резистентность бактерий к антибиотикам. Это характерно, например, для синегнойной палочки.

Клеточные стенки грамотрицательных бактерий содержат 18–20% липидов (от массы клеточной стенки) и при гидролизе выделяют большое число аминокислот, среди которых присутствуют серосодержащие.

Бактериальные клеточные стенки — это нерастворимые полимеры. Сшитые пептидные боковые цепи пептидогликана имеют меньше степеней свободы, чем точки роста пептидогликана, содержащие несшитые пептидные цепи; последние и служат центрами комплексообразования с антибиотиками.

Необходимо отметить, что при действии большинства антибиотиков (в том числе и типично бактерицидных) на чувствительные микробные клетки у микроорганизмов наблюдается определенный период, в течение которого при освобождении клеток от действия препарата восстанавливается их жизнеспособность.

К числу антибиотиков, подавляющих синтез клеточной стенки чувствительных бактерий, относятся D-циклосерин, пенициллины, цефалоспорины и др.

D - ц и к л о с е р и н, образуемый некоторыми видами стрептомицетов (*S. roseochromogenes*, *S. lavendulae* и др.), является антагонистом D-аланина — аминокислоты, входящей в состав пептидогликана. Этот антибиотик подавляет работу ферментов: аланинрацемазы, превращающей L-аланин в D-аланин, и D-аланил-D-аланинсинтетазы, катализирующей образование пептидной связи между двумя молекулами D-аланина. Иными словами, D-циклосерин подавляет ферменты, катализирующие процесс включения D-аланина в пептидогликан.

Среди пенициллинов высокой антибиотической активностью в отношении некоторых грамположительных бактерий обладает бензилпенициллин. В очень малой степени он влияет на отдельные грамотрицательные бактерии, не проявляя заметного действия на клетки животных, высших растений, грибов и протозоа. Ряд полусинтетических пенициллинов подавляет развитие и грамотрицательных бактерий.

Полусинтетические пенициллины проникают в клетку грамотрицательных бактерий через пориновые каналы внешней мембраны.

Пенициллин G специфически тормозит синтез некоторых аминокислот, входящих в мукокомплекс клеточной стенки бактерий, и подавляет синтез полимеров, входящих в состав бактериальной стенки. Антибиотик блокирует реакцию транспептидирования, приводящую к образованию новых полиглициновых поперечных связей в клеточной стенке. Это обусловлено прежде всего подавлением активности транспептидазы, катализирующей образование сшивок. В результате нарушается синтез пептидогликана и подавляется рост бактерий.

Избирательность антимикробного действия природного пенициллина, по-видимому, связана с тем, что состав клеток грамположительных и грамотрицательных бактерий неодинаков.

Бензилпенициллин препятствует образованию пептидогликана клеточной стенки на определенной стадии ее синтеза. Антибиотик, взаимодействуя с транспептидазами и карбоксипептидазами пептидогликана, препятствует завершению его синтеза. Под действием пенициллина происходит образование так называемого растворимого пептидогликана — соединения, лишенного поперечных или перекрестных сшивок.

Таким образом, нарушение синтеза клеточной стенки под действием пенициллина вызывает лизис обнаженной цитоплазмы и гибель клетки, что является основным фактором в механизме действия пенициллина.

Клеточная стенка бактерий имеет специфическую структуру, отличающуюся по составу от стенок клеток других организмов, и

поэтому ее синтез обеспечивает возможность избирательного действия антибиотика. Вместе с тем структура клеточных стенок, включающая своеобразные полисахариды, белки, липиды, полипептиды, обеспечивает устойчивость ряда бактерий к действию этих антибиотических веществ.

Цефалоспорины имеют сходный с пеницилинами механизм биологического действия. Они, так же как и модифицированные пенициллины, проникают в бактериальную клетку через пориновые каналы внешней мембраны клеточной стенки грамотрицательных бактерий. Следовательно, в основе механизма биологического действия пенициллинов и цефалоспоринов лежит процесс подавления активности двух ферментов (транспептидазы муреина и D-аланин-карбоксипептидазы), которые участвуют в образовании основного полимера клеточной стенки бактерий на его заключительном этапе.

Под действием β -лактамов на бактериальные клетки происходит выделение тейхоевых кислот в среду, в результате чего активируются ферменты (фермент), гидролизующие пептидогликан. В итоге это приводит к тому, что клеточная мембрана остается без механической опоры и наступает лизис клетки. В клетках животных и человека указанный полимер отсутствует, и там нет названных выше ферментов. Поэтому пенициллины и цефалоспорины не оказывают действия на животные организмы; основная точка их приложения — биосинтез клеточных стенок бактерий. β -Лактамные антибиотики обладают способностью резко снижать устойчивость клеточных мембран к действию лизоцима.

Обобщая имеющиеся данные по механизму антибактериального действия антибиотиков, относящихся к β -лактамам, следует отметить, что в цитоплазматической мембране бактерий имеется множество мишеней для этих антибиотиков, т.е. в ней заключен не один, а ряд ферментных белков, ковалентно связывающих β -лактамную структуру. У большинства чувствительных к пенициллину микроорганизмов все пенициллинсвязывающие белки (РВР) относятся к группе сериновых ферментов, участвующих в биосинтезе пептидогликана. По своим функциям РВР, как правило, транспептидазы, которые катализируют сборку пептидогликана клеточной стенки на внешней стороне цитоплазматической мембраны и служат основной мишенью действия β -лактамных антибиотиков на грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Резистентность к новым цефалоспорином обусловлена в основном мутациями в хромосомных генах, кодирующих ферменты, которые связывают эти антибиотики и гидролизуют β -лактамное кольцо.

Одним из хромосомных механизмов резистентности микроорганизмов к β -лактамным антибиотикам следует считать снижение сродства РВР к этим антибиотикам.

АНТИБИОТИКИ, ПОДАВЛЯЮЩИЕ СИНТЕЗ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ ГРИБОВ

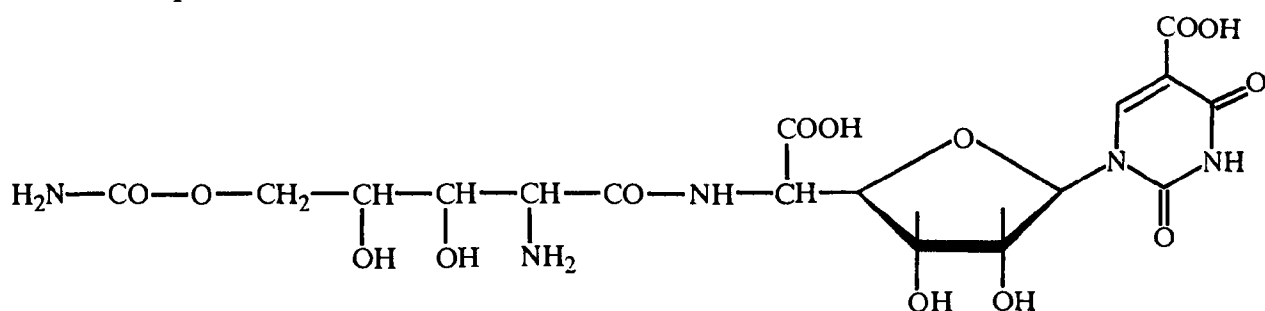
В состав клеточной стенки дрожжей входят глюканы, маннаны, хитин, белки (в основном маннанпротеины и глюканосвязанные) и липиды. Клеточные стенки мицелиальных грибов содержат сходные с дрожжами полисахариды. Основными компонентами стенок этих грибов являются хитин (полимер поли-N-ацетилглюкозамина), хитозан (неацетилированный полимер глюкозамина) и некоторые другие полисахариды.

Содержание хитина в клеточных стенках некоторых грибов достигает 20% и более. Этот полисахарид, образуя с глюканами прочный комплекс, во многом обеспечивает ригидность клеточной стенки грибов.

Биосинтез хитина, обычно входящего в состав полисахарида стенок грибов, наиболее активен в кончиках растущих гиф, где образуются микрофибриллы полимера. Выработка хитина катализируется единственным ферментом — хитинсинтетазой.

К числу антибиотиков, подавляющих синтез клеточной стенки грибов, относится группа полиоксинов, обозначаемых буквами латинского алфавита от А до М. Эти антибиотики имеют своеобразное химическое строение: они относятся к пептидипиридиннуклеозидным соединениям. Полиоксины образуются культурой *Streptomyces coisae*. Среди этих антибиотиков полиоксин D — наиболее сильный ингибитор синтеза хитина в клеточной стенке грибов. Он подавляет синтез хитина у гриба *Neurospora crassa*.

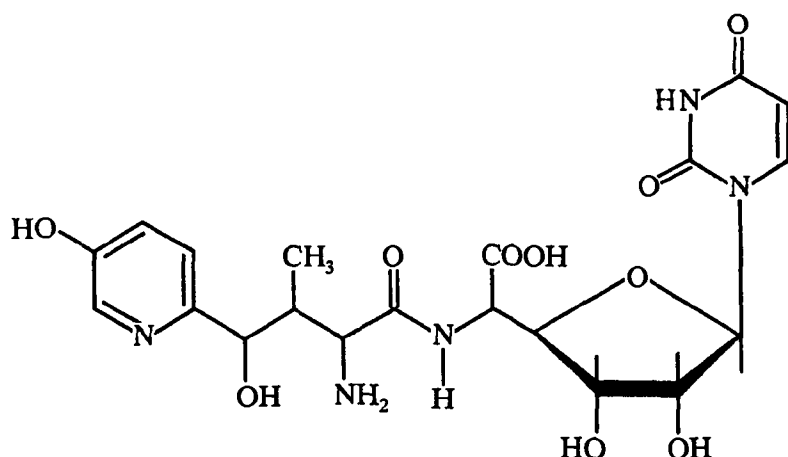
Полиоксины могут использоваться в качестве фунгицидов, подавляющих рост многих фитопатогенных грибов, относящихся к *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Piricularia*. Полиоксин D имеет следующее строение:



Способностью ингибировать биосинтез хитина обладают также антибиотики никкомицин, синтезируемый в процессе раз-

вития *S. tendae*, и туникамицин, образуемый культурой *S. lysosuperificus* sp. nov.

Никкомицин относится к нуклеозидным антибиотикам. У него следующая химическая структура:



Никкомицин подавляет развитие многих грибов, в том числе *Mortierella isabellina*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus circinans*, *Botritis cinerea* и ряд других.

Туникамицин в процессе развития стрептомицета накапливается как в мицелии продуцента, так и в культуральной жидкости. Из мицелия антибиотик экстрагируется метанолом, а из культуральной жидкости может извлекаться н-бутанолом. Туникамицин подавляет рост грамположительных бактерий, грибов, вируса табачной мозаики, герпеса.

Антибиотические вещества, способные подавлять биосинтез хитина, могут найти практическое применение в сельском хозяйстве при борьбе с фитопатогенными грибами.

АНТИБИОТИКИ, НАРУШАЮЩИЕ ФУНКЦИИ МЕМБРАН

По составу мембраны бактериальных клеток — липопротеидные структуры, в которые включены молекулы белка.

Липиды, образующие бимолекулярный слой, составляют структурную основу мембран. В мембранах микроорганизмов (бактерий, грибов) наиболее широко представлены гликолипиды. В бимолекулярный слой включены белки, набор которых определяет свойства и специфику функционирования мембраны. Толщина мембраны составляет 6–8 нм.

Мембраны выполняют ряд функций, основными из которых являются следующие:

- реакция на изменения, происходящие во внешней среде, и передача информации внутрь клетки;
- регуляция внутриклеточного содержимого, связанная с активным выбросом продуктов метаболизма или инородных веществ,

проникших через мембрану, а также накоплением в клетке субстратов метаболизма.

Перенос (транспорт) веществ через цитоплазматическую мембрану может осуществляться тремя основными путями.

1. Пассивная диффузия. Переносимые вещества должны быть растворимы в гидрофобной среде мембраны.

2. Облегченная диффузия. Вещества, взаимодействуя со специфическим переносчиком, образуют комплекс переносчик — вещество, который и может проходить через мембрану.

3. Энергозависимый транспорт. Для переноса вещества необходим источник энергии. При этом вещество может транспортироваться против градиента концентрации. Иногда концентрация веществ в клетке на два-три порядка выше концентрации веществ во внешней среде, но и в этом случае происходит транспорт их из среды в клетку.

Поступление антибиотиков в клетку микроорганизмов — процесс активного транспорта. Следует подчеркнуть, что на транспортные нужды бактериальная клетка расходует в среднем 20–30% энергии, образуемой в процессе обмена веществ.

Накопление внутри клеток микроорганизмов антибиотика — этого неметаболизирующего ингибитора — объясняется тем, что антибиотики «пользуются» транспортными системами, предназначенными для переноса обычных метаболитов, «подменяя» последние. Такая «подмена» возможна благодаря определенному химическому сходству антибиотиков и нормальных продуктов обмена.

В.К. Плакунов, в частности, показал, что тетрациклиновые антибиотики переносятся в клетки микроорганизмов с помощью транспортной системы, предназначенной для кислых аминокислот: аспарагиновой и глутаминовой.

Устойчивые к тетрациклинам штаммы *Escherichia coli* К-12, *Staphylococcus aureus* 209 и *Mycobacterium citreum* поглощают значительно меньшее количество ^{14}C -хлортетрациклина, чем исходные чувствительные штаммы.

Устойчивые к тетрациклинам микроорганизмы сохраняют типичную для чувствительных штаммов систему транспорта антибиотика с неизменной стереоспецифичностью. Однако они способны (в отличие от чувствительных штаммов) длительно поддерживать внутриклеточную концентрацию антибиотика на уровне более низком, чем концентрация его в среде. Такое «противодействие» поглощению антибиотика требует затраты энергии и подавляется в присутствии цианида и 2,4-динитрофенола.

Антибиотические вещества, оказывающие действие на цитоплазматическую мембрану, можно разделить на три группы

1. Вещества, вызывающие дезорганизацию структуры мембран. В группу входят грамицидин С, полимиксины, полиены.

Грамицидин С — антибиотик, нарушающий организацию липопротеидных систем и проницаемость клеток, создаваемую мембраной. Степень этих нарушений зависит от концентрации антибиотика. Грамицидин медленно снижает поверхностное натяжение. Он может вступать в связь с клеточными мембранами. В основе механизма биологического действия грамицидина С лежит нарушение им состояния и функционирования мембран клеток в результате связывания антибиотика с мембранными компонентами. Это вызывает, с одной стороны, изменение проницаемости мембран и быструю потерю клетками жизненно важных соединений типа нуклеотидов, неорганического фосфора, аминокислот, а с другой — угнетение процесса энергетического обмена, особенно его начальной стадии — дегидрирования. Грамицидин С ингибирует активность ряда ферментов, локализованных в мембране (дегидрогеназы, оксидазы).

Полимиксины — соединения, которые связываются с мембраной бактериальной клетки и нарушают ее нормальную функцию. Под влиянием антибиотиков этой группы при относительно невысоких концентрациях (25 мкг на 1 мг массы сухих клеток) происходит выход из клеток низкомолекулярных веществ (фосфора, пентоз) и распад нуклеиновых кислот. Как уже отмечалось, эти антибиотики обладают высокой биологической активностью в отношении грамотрицательных бактерий. Однако причина включения в клетки именно грамотрицательных бактерий до сих пор не ясна. Такая селективность может объясняться лишь специфической структурой клеточной стенки грамотрицательных бактерий, которая благодаря рецептору связывает антибиотик с наружной, а затем и с цитоплазматической мембранами.

Показано, что протопласты многих грамположительных бактерий чувствительны к действию полимиксинов. Это также указывает на то, что полимиксиннепроницаемые клеточные стенки защищают от названных антибиотиков интактные бактериальные клетки.

Пока нет достоверных данных о точной мишени действия полимиксинов в клетках чувствительных к ним микроорганизмов. Установлено, что рецепторами этих антибиотиков могут быть фосфолипиды, в результате взаимодействия с которыми полимиксины вызывают дезорганизацию структуры мембран.

Полимиксины используют в качестве своеобразной системы для изучения взаимодействия антибиотик—мембрана *in vivo*.

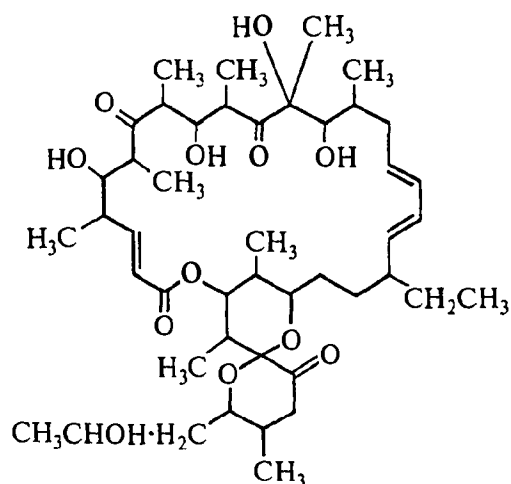
Полиеновые антибиотики (нистатин, римоцидин, филипин, эндомицин, кандицидин, трихомицин и др.) — биологически активные соединения, способные изменять проницаемость клеток, чувствительных к их действию. Как известно, проницаемость клетки зависит прежде всего от цитоплазматической мембраны. Полиены, специфически присоединяясь к цитоплазматической мембране клетки гриба, лишают мембрану способности функционировать в качестве барьера, обеспечивающего избирательную проницаемость.

Специфическая токсичность полиеновых антибиотиков обусловлена их взаимодействием с одним из компонентов цитоплазматической мембраны чувствительных клеток, принадлежащих к стеринам. В результате меняется селективность проницаемости мембран, приводящая к выходу из клетки важнейших метаболитов и нарушению способности мембран контролировать усвоение питательных веществ.

Все полиеновые антибиотики подавляют развитие эукариотных организмов (грибов, простейших, водорослей), содержащих в своих мембранах стерина. Полиены вызывают лизис протопластов и эритроцитов.

Актиномицины, не относящиеся к полиенам, в животном организме превращаются в свободный радикал. В виде свободного радикала молекула антибиотика вызывает изменения белков мембран. В результате этого нарушаются транспортные функции мембран, что в конечном счете приводит к гибели клеток.

2. Антибиотики, ингибирующие связанный с мембраной белок (фермент), принимающий участие в процессах транспорта. В эту группу веществ можно включить олигомицин В, образуемый *Streptomyces* sp., близким *S. diastatochromogenes*. Это соединение относится к антибиотикам, имеющим макроциклическое лактонное строение ($M = 805$):



Антибиотик подавляет митохондриальную аденозинтрифосфатазу (АТФ-азу), которая связана с клеточными мембранами и участвует в синтезе или использовании АТФ.

3. Антибиотические вещества — ионофоры. Некоторые антибиотики (валиномицин, энниатины, нонактин, нигерицин, моненсин, салиномицин, грамицидины) способны индуцировать проницаемость ионов через мембраны клеток; это послужило основой для их названия — антибиотики-ионофоры.

Обычно биологические мембраны непроницаемы для ионов K^+ . В опытах с митохондриями и клетками *Streptococcus faecilis* было показано, что в присутствии антибиотиков валиномицина или грамицидина С мембраны становятся проницаемыми для этих ионов, но не для ионов Na^+ и Li^+ . Установлено, что подавление роста *S. faecilis* в присутствии валиномицина, грамицидина, нонактина связано с потерей клеткой ионов K^+ , которая индуцируется этими антибиотиками.

Антибиотики-ионофоры широко используются в качестве соединений, применяемых при изучении процессов транспорта ионов через мембраны.

По принципу действия ионофоры делятся на две группы: 1) ионофоры-переносчики (валиномицин, нонактин, энниатины), 2) ионофоры, образующие ионпроницаемые поры («каналы»). К последним относятся линейные грамицидины А, В и С, полиеновые антибиотики (амфотерицин В, нистатин), а также пептидный антибиотик аламетицин.

Основные принципы действия ионофоров можно представить схематически (рис. 60).

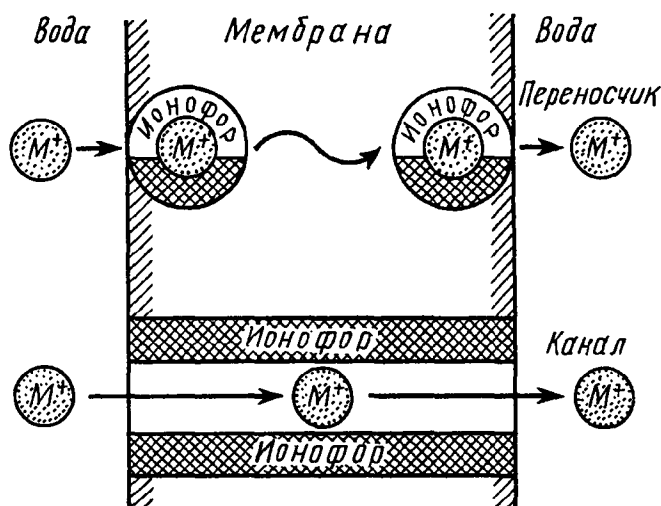
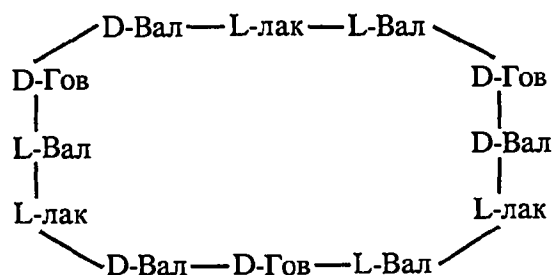


Рис. 60. Основные принципы действия ионофоров на мембранах (по Овчинникову, 1981)

В а л и н о м и ц и н образуется *S. fulvissimus*. Это — макроциклический депсипептид, в состав которого входят 12 аминокислотных остатков, состоящих из трех идентичных фрагментов:

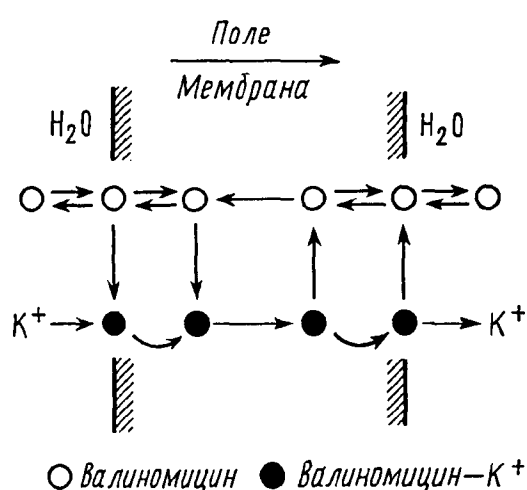


Вал — валин; Гов — α -гидроксиизовалериановая кислота; лак — лактат

Этот антибиотик подавляет рост грамположительных бактерий, обладает высокой биологической активностью по отношению к кислотоустойчивым бактериям и некоторым грибам. Ниже приведен антимикробный спектр валиномицина:

Микроорганизм	Минимальная подавляющая концентрация, мкг/мл
<i>Bacillus subtilis</i>	50,0
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5,0
<i>Micrococcus pyogenes</i>	33,0
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	0,5
<i>Piricularia oryzae</i>	0,2

Валиномицин способен связывать многие катионы, образуя соответствующие комплексы (валиномицин-ион). Однако наибольшей специфичностью к комплексообразованию этот антибиотик обладает с ионом калия. Причем высокую индуцирующую способность проводить калий через мембраны валиномицин проявляет в очень низких концентрациях (10^{-8} М и ниже).



После выполнения функции переноса калия антибиотик восстанавливается в прежнюю форму (рис. 61). Антибиотик проявляет универсальность действия на мембранах: индуцирует проводимость ионов калия на природных и искусственных мембранах.

Рис. 61. Схема переноса валиномицином ионов калия через липидную мембрану

В присутствии типичного ионофора валиномицина мембраны чувствительных бактериальных клеток становятся избирательно проницаемыми для ионов калия. Валиномицин связывает именно ионы калия и транспортирует их через мембрану в тысячу раз активнее, чем ионы натрия.

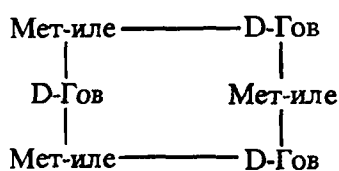
Аналогичное действие проявляют макротетралиды и энниатины.

Макротетралиды благодаря специфической структуре способны образовывать комплексы с такими однозарядными катионами, как аммоний, калий, натрий и др., при избирательности к ионам аммония и изменять проницаемость мембран для этих ионов.

Энниатины по своей структуре близки к валиномицину. Они образуются плесневыми грибами из рода *Fusarium*: энниа-

тин А — культурой *F. orthocerus* subsp. *enniatinum*, другие штаммы *F. sp.* синтезируют энниатины В и С.

Строение молекулы энниатина А представлено следующей схемой:



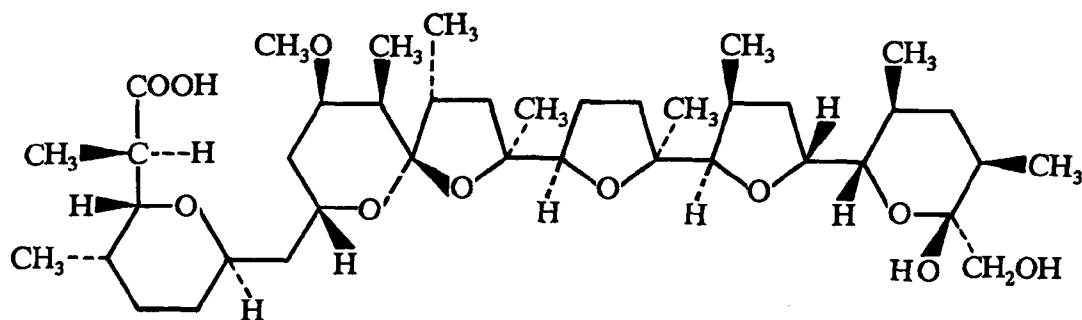
Мет-иле — N-метилизoleyцин;

D-Гов — D-α-гидроксиизовалериановая кислота

Комплекс энниатин—K⁺ менее устойчив, чем комплекс валиномицин—K⁺.

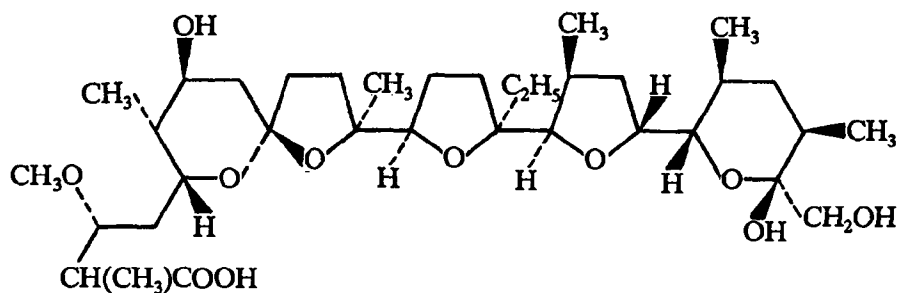
К антибиотикам-ионофорам, имеющим полиэфирное строение, относятся нигерицин, моненсин и салиномицин.

Н и г е р и ц и н образуется культурой стрептомицета, близкой к *S. violaceoniger*. Он имеет следующее строение:



Этот антибиотик способен переносить через биологические мембраны ионы одновалентных металлов, и главным образом ионы K⁺.

М о н е н с и н вырабатывается *S. cinnamonensis* и *S. hygrosopicus* и имеет следующее строение:

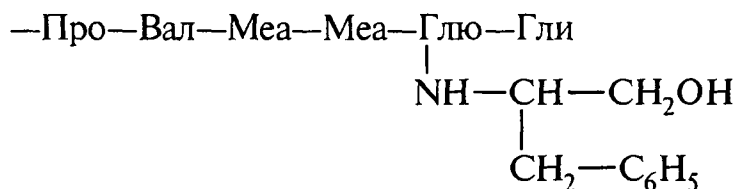


Он переносит через мембраны преимущественно ионы Na⁺.

Моненсин и салиномицин находят применение в животноводстве в качестве стимуляторов роста животных и как лечебные препараты (см. с. 499).

А л а м е т и ц и н — полипептидный антибиотик грибного происхождения, который описали в 1967 г. Мейер и Рейссер. Его биосинтез идет не по рибосомальному пути. Он продуцируется грибом *Trichoderma viridae*. Содержит 20 аминокислотных остатков:

Ак—Меа—Про—Ала—Меа—Ала—Гли—Меа—Вал—Меа—Гли—Лей—Меа—



Меа — 2-метилаланин

Антибиотик подавляет развитие только грамположительных бактерий. Обладает ионофорным действием, образуя в мембранах бактерий водные каналы меняющегося диаметра. Отмечается, что в образовании одного канала участвуют порядка шести молекул аламетицина. Антибиотик индуцирует проницаемость через мембрану как катионов, так и анионов.

К антибиотикам, образующим ионпроницаемые мембранные каналы, относятся также полиеновые антибиотики (амфотерицин В).

А м ф о т е р и ц и н В (см. формулу на с. 279), взаимодействуя с эргостеринами мембраны грибов, образует каналы, в результате чего нарушается бимолекулярный слой мембраны и меняются ее функции.

Все вышеуказанные антибиотики выступают в роли специфических «проводников» катионов через мембраны.

АНТИБИОТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА, ПОДАВЛЯЮЩИЕ СИНТЕЗ БЕЛКА

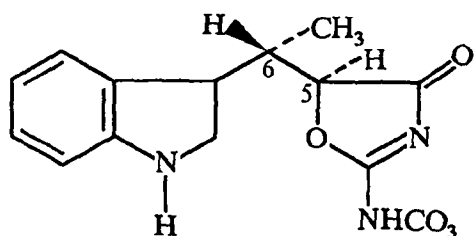
Впервые специфическое ингибирование синтеза белка бактерий антибиотиками было установлено в 1951 г.

Синтез белка у организмов происходит в основном в цитоплазме на рибосомах. Рибосомы — это рибонуклеопротеидные частицы, в состав которых входят высокополимерные РНК и белки. У прокариотных организмов эта структура диссоциирует на две субъединицы: 50 S и 30 S. В бактериальной клетке рибосомы рассеяны по всей цитоплазме, где их в среднем насчитывается 10^4 на клетку.

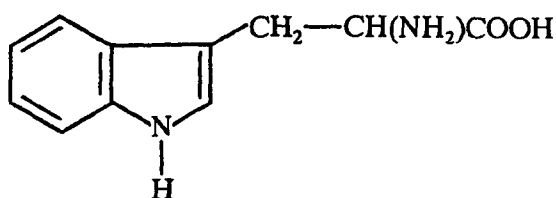
Биохимическая роль рибосом — синтез белка. На рибосомах происходит соединение отдельных аминокислот в полипептиды, завершающееся образованием вторичной и третичной структуры белков.

Синтез белка в клетках происходит в результате постепенного вовлечения аминокислот в этот процесс через три последовательные стадии: активации, переноса и собственно синтеза.

1. Активация аминокислот. В процессе биосинтеза белка могут участвовать лишь активированные L-аминокислоты — амино-



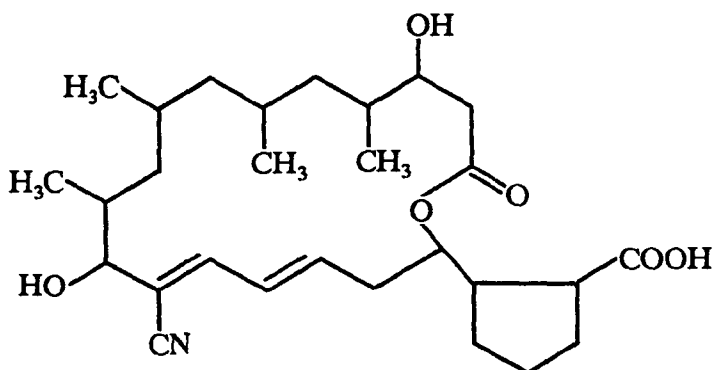
Индолмицин



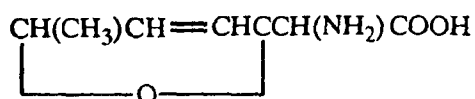
Триптофан

Индолмицин конкурирует с триптофаном в реакции активации.

Боррелидин продуцируется культурой *S. rochei*. Он выступает в качестве конкурента треонина $\text{CH}_3\text{CHOH}-\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ и ингибирует реакцию переноса. Ниже приведена формула боррелидина:



Фураномицин, образуемый *S. threomyceticus*, конкурирует с изолейцином $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ и ингибирует реакцию переноса этой аминокислоты. Фураномицин имеет следующее строение:



Более подробно рассмотрим антибиотики, подавляющие синтез белка, в их числе аминогликозиды, тетрациклины, хлорамфеникол.

Аминогликозиды. Аминогликозидные антибиотики в процессе воздействия на синтез белка связываются с 30 S субъединицами рибосом. Некоторые из них подавляют реакцию инициации (стрептомицин, неомицин), другие — транспептидации (неомицин, канамицины) или транслокации (неомицин, канамицины, гентамицин и др.).

Стрептомицин и другие аминогликозиды благодаря поликатионной природе их молекул быстро проходят через водные пориновые каналы внешней мембраны грамотрицательных бактерий только в аэробных условиях. В процессе взаимодействия этих антибиотиков с клетками бактерий аминогликозиды вытесняют ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} из внешней мембраны и благодаря этому дезорганизуют мембрану, стимулируя свое проникновение. Вместе с тем эти антибиотики очень слабо проникают через цитоплазматическую мембрану анаэробных организмов.

Как уже отмечалось (см. с. 244), с повышением рН среды возрастает биологическая активность стрептомицина, связанная в первую очередь с тем, что при этом увеличивается степень поглощения стрептомицина бактериальной клеткой.

Стрептомицин оказывает глубокое и разнообразное влияние на обмен веществ чувствительных к нему микроорганизмов. Антимикробное действие препарата в основном состоит в том, что он тормозит синтез белка в клетке бактерий.

Перед полным подавлением синтеза белка антибиотик успевает нарушить последовательность аминокислот в белках и в результате этого вызвать образование дефектных белков, которые, накапливаясь в мембране, приводят к нарушению ее барьерных функций.

Стрептомицин и другие аминогликозиды ингибируют синтез белка на конечных этапах этого процесса — они тормозят образование белковой молекулы на стадии переноса аминоацил-тРНК к рибосомам, не затрагивая начальную стадию, т.е. стадию активации аминокислот. Основной мишенью действия аминогликозидов является бактериальная рибосома и связанный с нею синтез белка.

Антибиотик ингибирует белковый синтез благодаря избирательному взаимодействию с 30 S субчастицами рибосомы, вызывая изменение ее А-участка и нарушая, таким образом, процесс поступления аминоацил-тРНК в рибосому и его правильную ориентацию. При таком вмешательстве аминогликозидов происходит ошибочное считывание генетического кода (матрицы), что приводит к неправильному образованию полипептидов, содержащих большое число ошибок. В итоге проявляется бактерицидный эффект антибиотиков.

Т е т р а ц и к л и н ы. Химическое родство тетрациклина, хлортетрациклина, окситетрациклина и других антибиотиков тетрациклиновой группы дает основание считать, что механизм их биологического действия очень близок. Подтверждается это и тем, что формы микробов, устойчивые к одному из тетрациклинов, резистентны и к другим антибиотикам этой группы. Однако есть данные, указывающие на некоторые количественные различия в физиологическом действии антибиотиков этой группы.

При низких концентрациях тетрациклиновые антибиотики проявляют бактериостатический эффект, а при повышении концентрации примерно в 10 раз наблюдается бактерицидное действие. Такие вещества, как глицин и цистеин, в определенной степени снимают действие тетрациклинов. Некоторые грамотрицательные бактерии способны образовывать вещества, инактивирующие бактериостатическое действие хлортетрациклина.

Отсутствуют данные о наличии бактерий, зависимых от тетрациклинов.

Бактериостатические концентрации тетрациклинов нарушают клеточный обмен чувствительных микроорганизмов, приводят к разобщению биосинтеза белка и нуклеиновых кислот: синтез белка в клетках приостанавливается, а биосинтез нуклеиновых кислот продолжается, иногда даже стимулируется.

Тетрациклин, накапливаясь в устойчивых к его действию клетках, не подвергается деградации, а сохраняется в активной форме. Вместе с тем в этих условиях антибиотик не способен подавлять синтез белка. По-видимому, в механизм такого действия вовлечен внутриклеточный «ингибитор». У ряда устойчивых к тетрациклину микроорганизмов выделены мутанты по детерминантам устойчивости к этому антибиотику.

Наиболее существенный момент их биологической активности — подавление синтеза белка на рибосомах. Антибиотик специфически подавляет связывание аминоацил-тРНК с А-участком бактериальной рибосомы, расположенным в малой субъединице. Главное действие тетрациклинов — это подавление синтеза белка на одной из поздних стадий указанного процесса — на стадии связывания аминоацил-тРНК с 30 S субчастицами рибосом.

Благодаря наличию в цитоплазматической мембране бактерий системы интенсивного энергозависимого транспорта тетрациклины активно проникают в клетку. Через пориновые каналы эти антибиотики проникают с небольшой скоростью. Через мембраны эукариотических клеток тетрациклины проникать не могут — в этом заключается избирательность их антимикробного действия. Как уже отмечалось, у резистентных форм бактерий существует система энергозависимого активного выброса тетрациклинов из клетки.

Изучение влияния на макроорганизм хлортетрациклина показало, что он воздействует на кровяное давление: при быстром введении понижает давление крови, а затем повышает его, по-видимому, непосредственно влияя на выделение адреналина. Антибиотик производит определенный эффект на условные рефлексы, увеличивает рост животных независимо от качества пищи.

Тетрациклины оказывают действие на каталазу крови. В больших дозах они вызывают у животных стойкое нарушение регенерации клеток крови.

Окситетрациклин снижает активность каталазы, а тетрациклин не изменяет активность каталазы крови.

Х л о р а м ф е н и к о л. Основа антибиотического действия хлорамфеникола — подавление синтеза белка.

При низких концентрациях антибиотик в значительной степени тормозит синтез белка у чувствительных к нему бактерий, высокие концентрации подавляют процессы дыхания, образования и накопления глутаминовой кислоты и фенилаланина, блокируют синтез нуклеиновых кислот. Антибиотик препятствует усвоению аминокислот и аммиака бактериями.

Хлорамфеникол, с одной стороны, подавляет синтез белка у бактерий на стадии переноса аминокислот от аминоацил-тРНК к рибосоме, т.е. на конечном этапе биосинтеза белковой молекулы, а с другой — тормозит освобождение рибосомы от пептида, что также приводит к прекращению синтеза белка. Антибиотик блокирует связывание аминоацилолигонуклеотидного фрагмента аминоацил-тРНК с 50 S субъединицами рибосомы. Он тормозит процесс образования из аминокислот полипептидной цепочки и в конечном счете биосинтез белков.

В результате ингибирования биосинтеза белков у чувствительных к хлорамфениколу клеток накапливаются свободные аминокислоты и выделяются в окружающую среду. Под действием антибиотика нарушение включения аминокислот в белки сопровождается изменением физико-химических свойств рибосом. Антибиотик влияет на формирование и самих рибосомных частиц, приводя к появлению недостроенных рибосом с резко ослабленной способностью к синтезу белка.

Таким образом, искаженный синтез белка под действием хлорамфеникола на конечной его стадии осуществляется несколькими путями: во-первых, хлорамфеникол может нарушать функцию рибосом клетки; во-вторых, взаимодействуя с тРНК, он может прерывать ее связь с рибосомой; в-третьих, возможно образование комплекса антибиотик—рибосома, что также неблагоприятно влияет на функцию рибосом.

Под действием хлорамфеникола немедленно прекращается синтез белка микроорганизмов, а синтез нуклеиновых кислот и пептидогликана при этом продолжается, хотя идет с меньшей скоростью. Все это указывает на то, что первичная мишень действия хлорамфеникола — синтез белка. Антибиотик ингибирует трансферазы бактериальных рибосом. Он легко взаимодействует с 50 S субъединицей. Это позволяет использовать хлорамфеникол в качестве ингибитора белкового синтеза при различных лабораторных исследованиях, связанных с данным процессом (изучение системы фаг—хозяин, синтез адаптивных ферментов и др.).

Под влиянием антибиотика нарушается нормальный синтез РНК, в то время как синтез ДНК непосредственно не тормозится им.

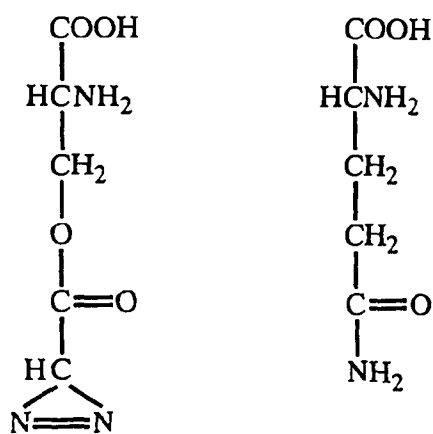
Хлорамфеникол избирательно подавляет рост многих видов бактерий, но в тех же концентрациях не оказывает заметного действия на развитие грибов, простейших и клеток животных. Устойчивость этих организмов может быть объяснена, с одной стороны, способностью их мембран не пропускать антибиотик, с другой — отличием путей биосинтеза белка у бактерий.

К числу антибиотиков, подавляющих синтез белка, относятся также циклогексамид (подавляет пептидилтрансферазную активность 50 S рибосомальных субъединиц), эритромицин (связывает 50 S субъединицы и ингибирует транслокацию), пуромицин (этот антибиотик — аналог тРНК, подавляет образование пептидных связей в процессе биосинтеза белка) и некоторые другие антибиотики.

АНТИБИОТИКИ — ИНГИБИТОРЫ СИНТЕЗА ПУРИНОВ И ПИРИМИДИНОВ

Подавление синтеза нуклеотидов (пуриновых и пиримидиновых оснований) необходимо рассматривать как определенный этап (стадию) подавления синтеза нуклеиновых кислот. К числу антибиотиков, блокирующих синтез нуклеотидов, относятся такие соединения, как азасерин, саркомицин и некоторые другие.

Азасерин — антибиотик противоопухолевого действия, образуемый *Streptomyces fragilis*; он подавляет включение глицина в процессе биосинтеза пуринов. Азасерин — структурный аналог глутамина:



Азасерин

Глутамин

В его составе имеется диазогруппировка.

По-видимому, антибиотик вступает в конкуренцию с глутамином за связывание с ферментом, который он необратимо инактивирует. Группа $-\text{N}=\text{N}-$ молекулы азасерина путем ковалентного присоединения по сульфгидрильной ($-\text{SH}$) группе вступает в связь с группой фермента, ответственного за перенос $=\text{NH}$ от амидной группы глутамин к субстрату при синтезе пуринов.

Азасерин подавляет биосинтез пуринов в результате связывания с ферментом, обеспечивающим превращение формилглицин-амидрибонуклеотида в формилглицинамидинрибонуклеотид*. Цистеин — основная мишень для действия азасерина.

Азасерин проявляет мутагенные свойства, практического применения в медицине антибиотик не имеет.

С а р к о м и ц и н (продуцент *Streptomyces erythrochromogenes*) обладает множественным действием на обмен клеток асцитной опухоли: подавляет включение ^{14}C глицина в белок, синтез пиридиннуклеотидов, включение фосфора в нуклеотиды и нуклеиновые кислоты. Обладает слабой антибактериальной активностью.

АНТИБИОТИКИ, ИНГИБИРУЮЩИЕ СИНТЕЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

А к т и н о м и ц и н ы способны подавлять синтез белка и ДНК-зависимую РНК-полимеразу в результате образования комплексов с ДНК через дезоксигуаниновые остатки, но не оказывают влияния на образование ДНК, что привлекло внимание многих исследователей. Так, актиномицин D в концентрации 5 мкг/мл полностью останавливает у *B. subtilis* синтез белка и РНК и не влияет на синтез ДНК. При использовании суббактериостатических количеств актиномицина С повышается даже концентрация ДНК у *B. subtilis*.

При более высоких концентрациях актиномицин ингибирует ДНК-полимеразу.

Таким образом, под действием актиномицинов происходит лишь ингибирование синтеза белка и РНК. Возможно, однако, что подавление синтеза белка является функцией подавления синтеза РНК.

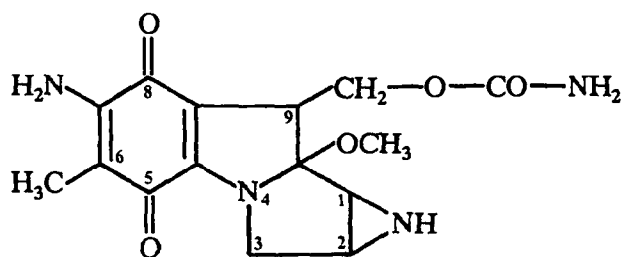
Актиномицины тормозят также синтез РНК в клетках животной ткани и в опухолевых клетках в результате образования высокоспецифичного комплекса с ДНК-матрицей. Установлено, что антибиотик препятствует продвижению РНК-полимеразы вдоль молекулы ДНК-матрицы. В образовавшемся комплексе актиномицин — ДНК пептидная часть молекулы антибиотика размещается в малой борозде двойной спирали ДНК.

Образование комплекса актиномицин — ДНК обуславливает биологическое действие этого антибиотика, связанное с изменением функции нуклеиновых кислот.

М и т о м и ц и н ы, образуемые *S. caespitosus*, — антибиотики широкого спектра антибиотического действия, подавляют развитие

* Амидиновая группа $-\text{NH}-\text{C}=\text{NH}$.

многих видов бактерий, простейших, а также задерживают рост опухолевых клеток. Митомицин С имеет следующее строение:



Механизм биохимического действия этих биологически активных веществ противоположен действию актиномицинов: митомицины приостанавливают синтез ДНК, практически не влияя на синтез РНК и белка. Бактерицидное действие антибиотика очень быстрое. Более того, имеются данные, показывающие, что под действием митомицинов ДНК расщепляется на кислоторастворимые фрагменты. Причина расщепления ДНК под действием митомицинов окончательно еще не выявлена. Вместе с тем имеются указания на то, что митомицин С способен образовывать поперечные сшивки в молекуле ДНК.

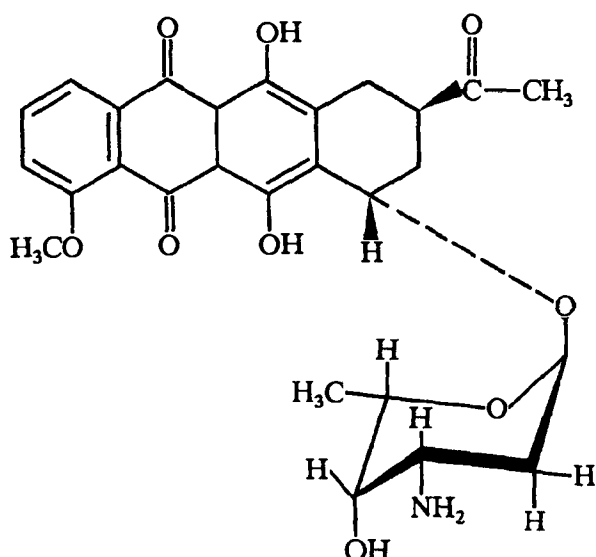
Однако синтез вирусной ДНК весьма устойчив к действию митомицина.

Митомицин С обладает мутагенными свойствами, а также способностью индуцировать (активизировать) фаги бактерий.

Дауномицин (синонимы: даунорубин, рубомицин) образуется стрептомицетами *S. peuceticus*, *S. coeruleorubidus*.

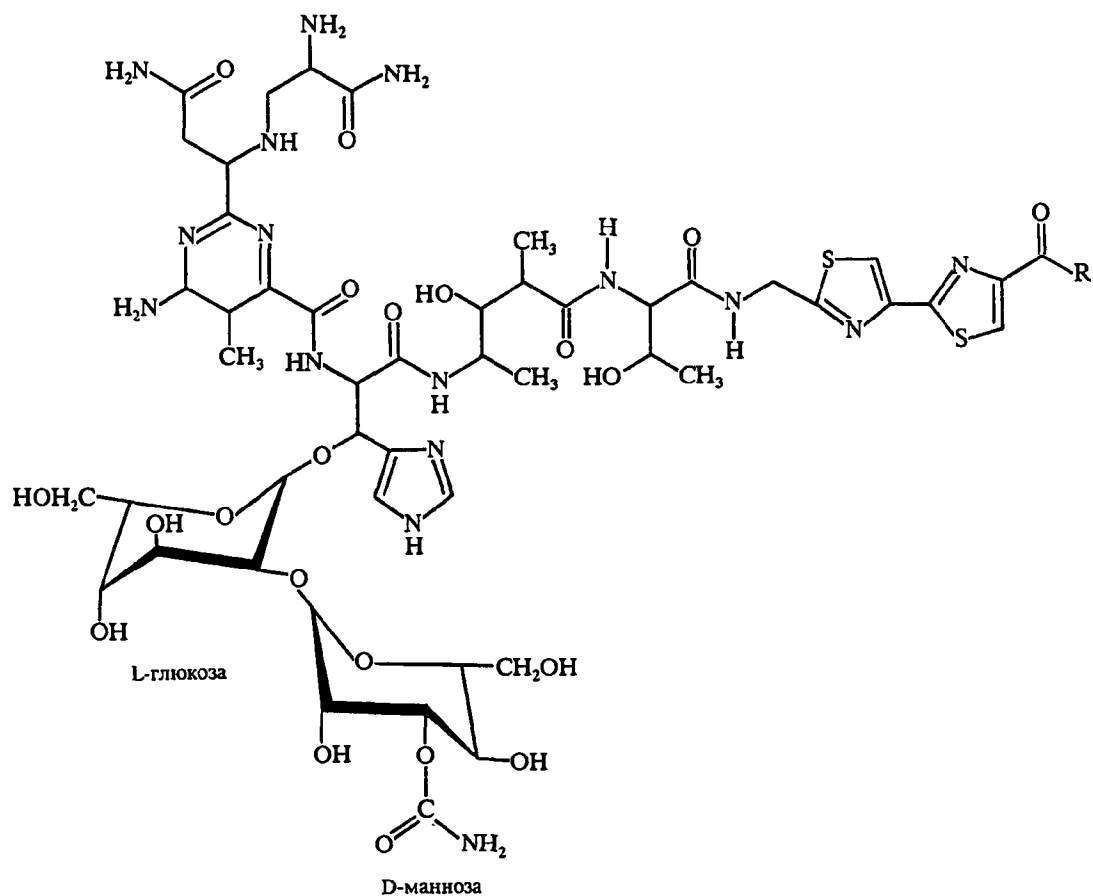
Антибиотики проявляют противоопухолевое действие.

Механизм биологического действия дауномицина определяется способностью «встраиваться» между парами оснований ДНК. Антибиотик связывается с теми участками ДНК, где есть Г-Ц-пары. Хромофор дауномицина как бы раздвигает пары оснований в ДНК и располагается между ними. Дауномицин имеет следующее строение:



Блеомицины — группа гликопептидных антибиотиков, образуемых *S. verticillus*. Группа объединяет не менее 16 близких по химическому строению антибиотиков. В состав блеомицинов входят аминокислоты, амины, L-глюкоза и карбамоил-D-манноза.

Строение основной молекулы блеомицинов можно представить общей формулой:



R — терминальный амин

Блеомицин А₂: $R = \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 - \text{S}^+ = (\text{CH}_3)_2 \text{Cl}^-$ (3-аминопропилдиметилсульфонат)

Блеомицин В₂: $R = \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_4 - \text{NH} - \text{NH}_2$ (агматин)

Блеомицины — противоопухолевые антибиотики. Основной механизм их биологического действия — деградация молекулы ДНК. Блеомицины в зависимости от концентрации тормозят синтез ДНК и в меньшей степени синтез РНК. Высокая концентрация антибиотика (300 мкг/мл) приводит клетки к гибели.

Новобиоцин. Под действием новобиоцина происходит внутриклеточное накопление уридиннуклеотидов и подавление синтеза РНК. Антибиотик подавляет также клеточное деление и снижает содержание ДНК в растущих клетках.

Основной процесс в механизме биологического действия новобиоцина — подавление синтеза ДНК и в меньшей степени — РНК. Подавление синтеза белка, роста бактерий и увеличение проницаемости клеточной мембраны наблюдается на более поздней стадии биохимического воздействия новобиоцина и, возможно,

представляет собой вторичный процесс, связанный с нарушением синтеза ДНК. Новобиоцин подавляет также синтез тейхоевой и тейхуроновой кислот.

Коумермицин А. По химическому строению этот антибиотик, в сущности, является димером новобиоцина. Как и новобиоцин, он подавляет синтез ДНК и РНК, ингибирует гиразу (фермент, участвующий в скручивании спирали ДНК). Однако для ингибирования гиразы концентрация коумермицина должна быть в 10 раз выше, чем новобиоцина.

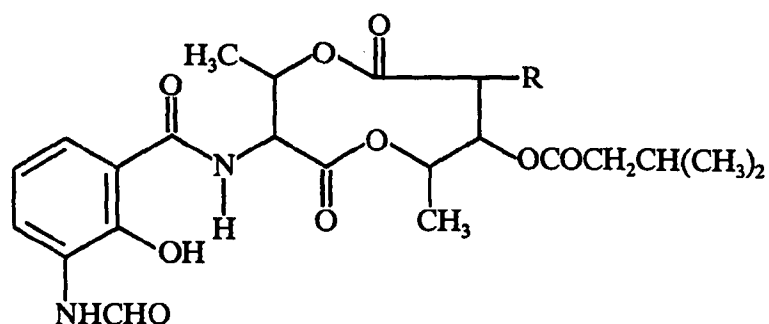
Суммируя данные по ингибированию антибиотиками синтеза ДНК у микроорганизмов, следует отметить, что взаимодействие антибиотика с ДНК может происходить по следующим направлениям: а) поперечно-связанное ковалентное взаимодействие; б) встраивание в молекулу ДНК; в) нековалентное взаимодействие и г) деградация молекулы ДНК.

АНТИБИОТИКИ — ИНГИБИТОРЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА

Антимицины образуются определенными видами стрептомицетов, в том числе *S. kitazawaensis*, *S. blastmyceticus* и некоторыми другими. Пристальное внимание привлекла их способность подавлять рост ряда грибов, и в первую очередь фитопатогенных (*Piricularia oryzae*, *P. grisea*).

Интерес к ним проявился после того, как была установлена способность этих антибиотиков ингибировать аэробное дыхание.

Антимицины имеют общую структурную формулу:



Антимицин А₁: R = n-гексил (M = 548)

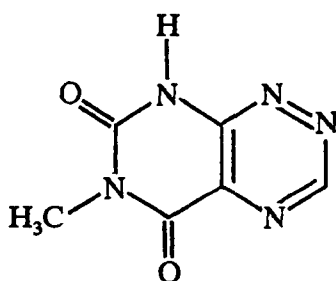
Антимицин А₃: R = n-бутил (M = 520)

Антимицин А — мощный ингибитор окисления сукцината, подавляет активность сукцинатдегидрогеназы. Антибиотик действует на компонент дыхательной цепи, общей для сукцинатоксидазной и НАД-Н₂-оксидазной систем.

Чувствительность к антимycinу А обнаруживают лишь те дыхательные системы, которые чувствительны к цианиду (цитохромы *b*, *c*, *c*₁ и *a*). Антибиотик специфически ингибирует электронный транспорт между цитохромами *b* и *c*.

Олигомицины образуются стрептомицетами (см. с. 428), подавляют рост некоторых грибов. Они ингибируют отдельные этапы трансформации энергии, связанные с терминальными системами переноса электронов, а также митохондриальную АТФ-азу, препятствуя переносу связанной с мембраной фосфорильной группы. Однако это, по-видимому, не прямое действие антибиотиков на фермент, а вторичный эффект. Эти антибиотики можно назвать ингибиторами митохондриального дыхания, так как они угнетают лишь аэробные организмы.

Реумицин. Этот отечественный противоопухолевый антибиотик образуется культурой *Streptomyces rectus bruneus* subsp. *xanthothricini*. По своему химическому строению реумицин относится к группе пиримидотриазиновых антибиотиков и имеет следующее строение:



Антибиотик является ингибитором тканевого дыхания. Механизм его биологического действия связан с нарушением энергетического обмена опухолевых клеток.

Реумицин *in vitro* оказывает цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека (меланома, рак почки, опухоли яичка), он показал хорошие результаты при лечении злокачественных опухолей головного мозга. Препарат не обладает антимикробной активностью.

Патулин (синтезируется определенными видами *Penicillium* и *Aspergillus*) обладает весьма широким спектром биологического действия: подавляет аэробное дыхание бактерий, грибов и фагоцитов. Непосредственное место приложения действия патулина и механизм его действия пока еще не установлены. Известно лишь, что терминальный перенос электронов представляет один из уязвимых участков.

АНТИБИОТИКИ — ИНГИБИТОРЫ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ

Валиномицин образуется культурой *Streptomyces fulvissimus*. Антибиотик содержится в мицелии стрептомицета и экстрагируется из мицелия органическими растворителями (петролевым эфиром, метанолом, ацетоном).

Валиномицин подавляет рост грамположительных бактерий, особенно активен в отношении кислотоустойчивых бацилл. Антибиотик способен разобщать окислительное фосфорилирование, не оказывая практически никакого влияния на потребление кислорода в присутствии АТФ, гексокиназы и глюкозы.

Процесс переноса электронов в присутствии валиномицина сопровождается выходом ионов водорода из митохондрий. Способность валиномицина разобщать окислительное фосфорилирование зависит от присутствия ионов калия, при этом митохондрии поглощают в 10^4 раз больше ионов калия, чем ионов натрия, так как валиномицин является мощным ионофором K^+ .

К ингибиторам окислительного фосфорилирования относятся также линейные грамицидины, олигомицины и другие антибиотики.

АНТИБИОТИКИ-АНТИМЕТАБОЛИТЫ

Одной из форм механизма биологического действия антибиотиков, выступающих в роли антиметаболитов, является конкурентное подавление, суть которого состоит в следующем.

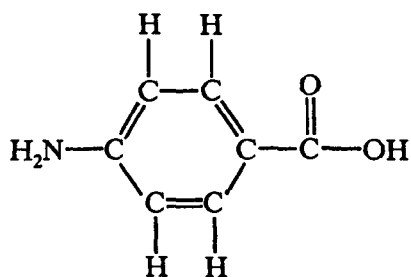
Если в организме или в среде одновременно присутствуют два вещества — обычный для организма субстрат S и ингибитор I, сходный по структуре с субстратом, и оба они могут вступать в связь с ферментом (E), как это показано в уравнениях (1) и (2):



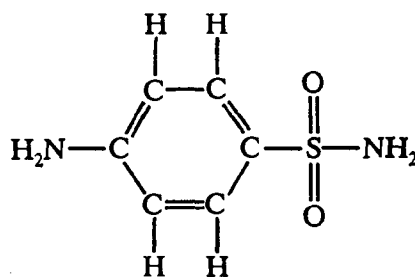
то это типичный пример конкурентного подавления, или конкурентного обмена.

Ингибитор как антиметаболит соответствующего субстрата, взаимодействуя с ферментом, нарушает его функцию и таким образом дезорганизует определенное звено в метаболизме клетки.

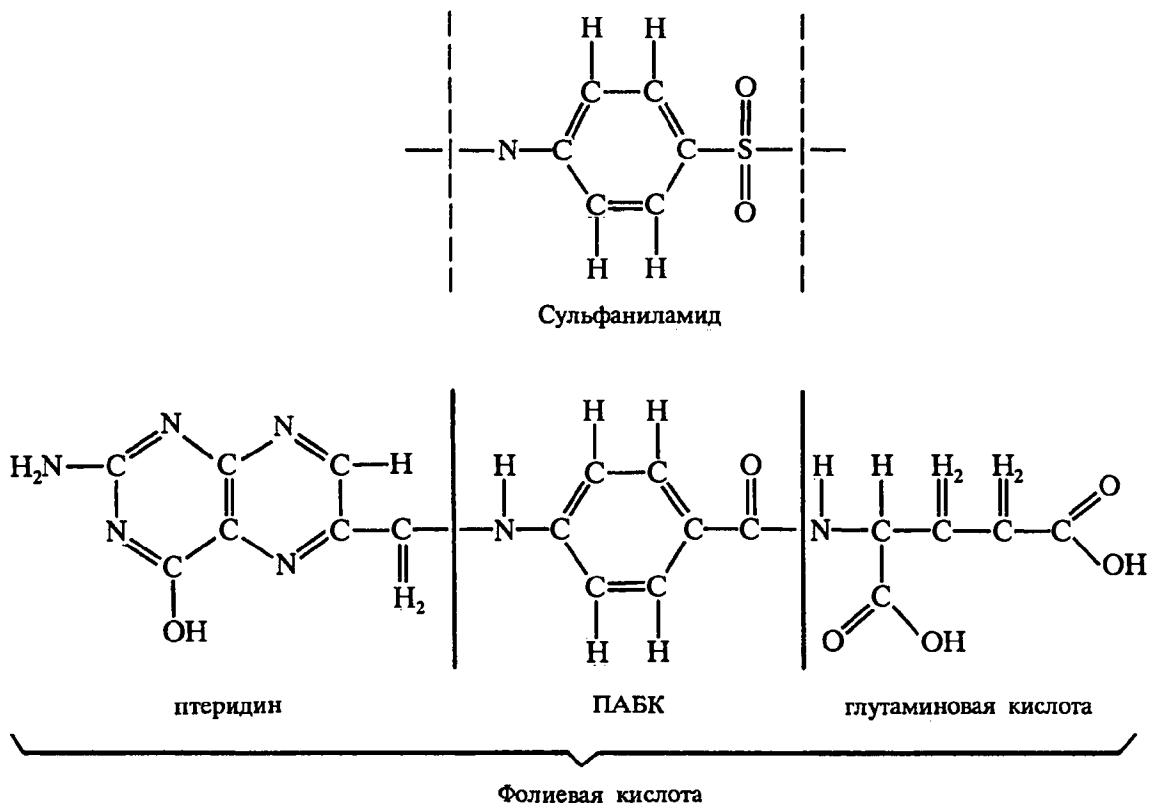
В качестве примера конкурентного обмена можно привести участие сульфаниламида как антиметаболита п-аминобензойной кислоты в составе фолиевой кислоты:



п-Аминобензойная кислота (ПАБК)

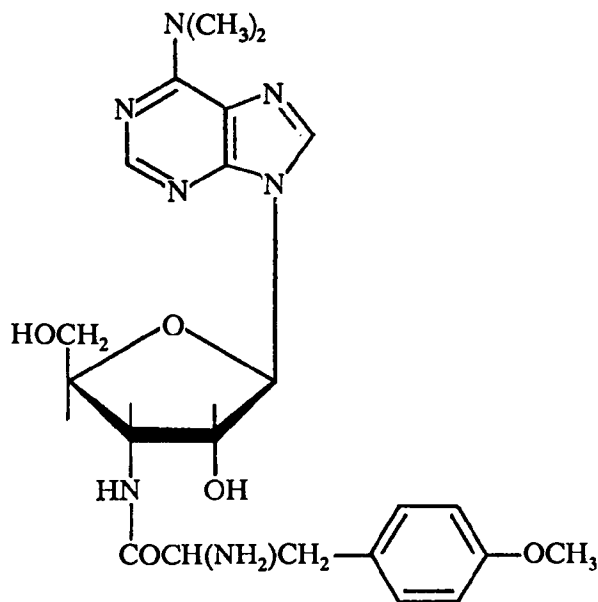


Сульфаниламид
(стрептоцид)



Как только сульфаниламид в случае его присутствия в клетке включается в фолиевую кислоту вместо ПАБК, ферментативные функции бактериальной клетки блокируются. В свою очередь, это приводит к нарушению механизма обмена веществ клетки и затем к ее гибели.

Рассмотрим конкурентное действие пуромидина в биосинтезе белка. Этот антибиотик образуется культурой *Streptomyces alboniger*. По химическому строению пуромидин — нуклеозидное производное пурина. Пуромидину соответствует следующая формула:

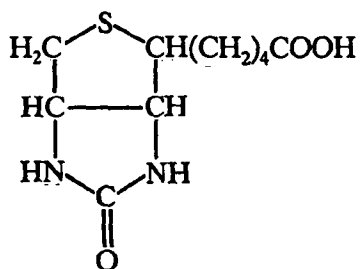


Анализ химической структуры пуромидина показывает, что он представляет собой структурный аналог 3-конечной аминоацелированной группировки тРНК.

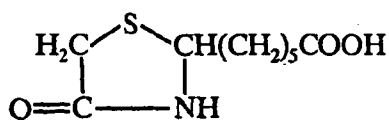
Пуромицин выступает в качестве конкурентного аналога аминоксил-тРНК, заменяя последнюю в реакции с пептидил-тРНК, что приводит к освобождению из рибосомы пептидила в виде пептидил-пуромицина и таким образом прекращает синтез белка.

Есть указания на то, что окситетрациклин выступает в качестве конкурентного ингибитора дифосфопиридиннуклеотида при действии его на *E. coli*.

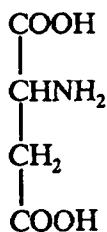
Установлено, что актитиазовая кислота, или ацидомицин (антибиотик актиномицетного происхождения), — конкурент витамина биотина, сходного по строению с кислотой. Конкурентами биотина выступают также антибиотики дегидробиотин, α -метилбиотин и α -метилдетиобиотин (см. с. 447). Антибиотик хадацидин, образуемый определенным штаммом *Penicillium frequentans*, выступает в качестве конкурентного вещества по отношению к L-аспарагиновой кислоте, а D-циклосерин — к D-аланину:



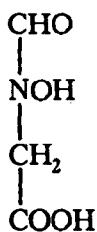
Биотин



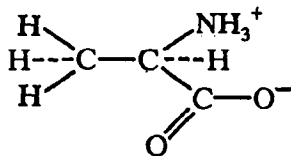
Актитиазовая кислота
(Ацидомицин)



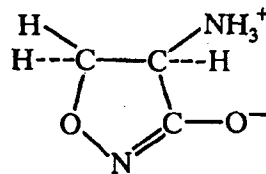
L-аспарагиновая
кислота



Хадацидин



D-аланин



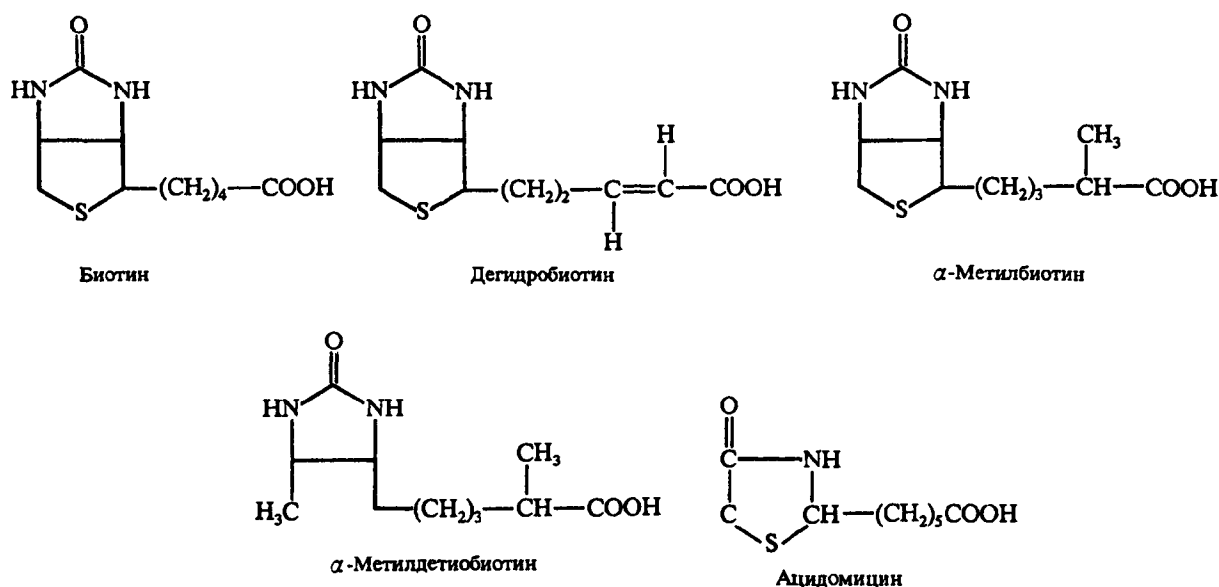
D-циклосерин

Хадацидин подавляет биосинтез нуклеотидов. Он активен в отношении некоторых раковых опухолей (аденокарцинома яичек, эпидермальная карцинома, саркома) и обладает низкой токсичностью.

Антиметаболитные свойства антибиотиков состоят в том, что они подавляют развитие чувствительных организмов лишь в том случае, если в среде отсутствует один из метаболитов (аминокислота, нуклеозид, витамин).

К антиметаболитам аминокислот относятся такие антибиотики, как боррелидин, кетомицин, фураномицин, азасерин, диазамицин и др. К антиметаболитам нуклеозидов можно отнести формицин А, пуромицин. Антибиотики — антагонисты витаминов — ацидомицин (актитиазовая кислота), α -дегидробиотин, метилбиотин.

Ацидомицин, дегидробиотин, α -метилбиотин, α -метилдетио-биотин выступают в качестве антиметаболитов биотина. Назван-ные антибиотики, образуемые стрептомицетами, очень близки по своей структуре биотину:



Их биологическая активность (они подавляют рост ряда видов микроорганизмов) резко снижается в присутствии биотина.

К настоящему времени известно более 50 антибиотических веществ, обладающих антиметаболитными свойствами по отношению к аминокислотам, основаниям нуклеиновых кислот, витаминам.

АНТИБИОТИКИ-ИММУНОДЕПРЕССАНТЫ

К веществам, способным подавлять иммунологическую реактивность организма (стероиды, антиметаболиты), относятся и некоторые антибиотики, в том числе актиномицины С и D, оливомицин, брунеомицин, дауномицин (рубомицин), циклоспорин и др. Наиболее значимым из них является циклоспорин. Новый макролидный антибиотик К-506 также обладает иммуносупрессорным действием. По этому признаку он близок циклоспори-ну А, но в 10–100 раз активнее его.

Ценность этих соединений определяется их противоаллергическим эффектом.

Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков

При воздействии ряда антибиотиков на чувствительные к ним микроорганизмы нередко возникают формы, устойчивые к их действию. Особенно быстрая адаптация наблюдается под влиянием стрептомицина и пенициллина. Например, для повышения

устойчивости к стрептомицину у *Erwinia carotovora* в 1000 раз (с 0,25 до 250 мкг/мл) потребовалось всего 16 пассажей, а для повышения устойчивости *Xanthomonas vesicatoria* в 3125 раз необходимо 22 пассажа в средах с постепенно возрастающими концентрациями антибиотика.

В связи с широким использованием антибиотиков в различных сферах практической деятельности возникновение устойчивых форм микробов приобретает важное значение. Резистентность микроорганизмов проявляется не только к антибиотикам, но и к химически синтезированным лечебным препаратам. Так, в связи с широким и активным применением в лечебной практике фторхинолонов наблюдается появление и распространение устойчивых к ним микроорганизмов.

При этом необходимо подчеркнуть, что чем активнее применяются антибиотики в качестве химиотерапевтических веществ, тем больше возникает устойчивых к ним форм бактерий. Так, если в первый период применения пенициллина обнаружено около 8% резистентных форм *Staphylococcus aureus*, то к концу 1950 г., т.е. меньше чем через десять лет, их число возросло до 70%. Учет частоты возникновения таких форм в амбулаторном отделении одной из лондонских больниц за период 1949–1978 гг. показал ту же закономерность (Ролинсон, 1992):

Год	% резистентных штаммов
1949	6
1952	16
1955	21
1960	39
1968	50
1978	81,5

Аналогичное положение наблюдалось и с другими антибиотиками.

Когда в начале 1950 г. в Японии были введены в медицинскую практику стрептомицин, тетрациклины и хлорамфеникол, устойчивые к этим антибиотикам штаммы *Shigella* составляли 0,04%, но постепенно мультирезистентные штаммы распространились и через 20 лет их число достигло 90% (Betina, 1983).

Резистентные к антибиотикам бактерии обнаруживаются не только в клиниках при использовании этих биологически активных соединений в качестве лечебных препаратов, но и в естественных природных условиях. В некоторых регионах в грунтовых водах обнаруживается высокое содержание резистентных к антибиотикам форм кишечной палочки, хотя применение антибио-

тиков в этой местности было крайне ограниченным. Одной из возможных причин такого феномена, как отмечают С.М. Навашин и Ю.О. Сазыкин (1998), может быть «слабое селективное давление в результате какого-то, пусть небольшого, количества антибиотика в природной среде».

Глобальный характер проблема резистентности микроорганизмов к антибиотикам приобрела в конце 80-х — начале 90-х гг. XX столетия. Многие развитые страны начали разрабатывать и осуществлять на практике национальные программы по сдерживанию возникновения и распространения резистентных форм микроорганизмов.

Теоретический смысл изучения факторов приспособления микроорганизмов к антибиотикам определяется необходимостью выявления механизма этого явления, вскрытия причин адаптации микроорганизмов к новым условиям существования.

Практическое значение проблемы адаптации микробов к действию антибиотиков обусловлено тем, что появление резистентных форм *in vivo* при применении антибиотиков в лечебной практике или в борьбе с фитопатогенными организмами может привести и приводит к существенному снижению лечебных свойств антибиотиков. Поэтому применение антибиотиков в клинике и особенно выбор того или иного препарата для назначения больному должны учитывать его эффективность в отношении возбудителя заболевания и индивидуальные особенности больного. Для выяснения вопроса об эффективности препарата обычно используют диски бумаги, пропитанные антибиотиками (рис. 62). Диски накладывают на питательную агаровую пластинку, засеянную выделенным возбудителем, и после определения чувствительности орга-

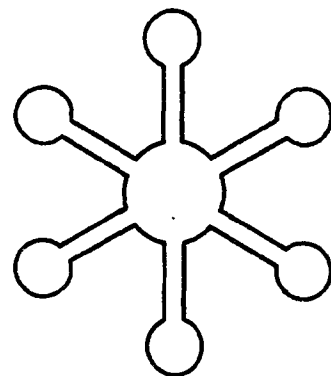


Рис. 62. Система дисков фильтровальной бумаги, пропитанных различными антибиотиками

низма к одному из антибиотиков последний следует назначать больному, разумеется, при условии, что препарат не противопоказан по каким-либо другим причинам. При использовании дисков фильтровальной бумаги для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам необходимо соблюдать стандартные условия опытов, и в первую очередь необходимый состав питательной среды и соответствующую концентрацию испытуемого антибиотика.

Возникновение форм, устойчивых к антибиотикам, делает проблему адаптации весьма важной.

Высказываются различные точки зрения на возможность появления устойчивых к антибиотикам форм микроорганизмов. По мнению некоторых авторов, одним из факторов, определяющих развитие устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, является мутационно-селекционный процесс. В основе этого механизма лежит селекция антибиотическими веществами мутантов, устойчивых к ним.

Однако вряд ли такой механизм устойчивости можно считать основным, так как возникновение спонтанных мутаций идет весьма медленно. Такие мутации возникают довольно редко, частота их составляет 10^{-4} – 10^{-10} . Так, у микобактерий частота спонтанных мутаций, связанных с устойчивостью к антибиотикам, составляет 10^{-7} – 10^{-8} . Кроме того, хромосомные мутанты обычно устойчивы к одному или нескольким препаратам, имеющим близкое химическое строение и однотипный механизм биологического действия.

Выполняя функции отбора резистентных форм микроорганизмов, возникших в результате спонтанного мутагенеза, антибиотики могут выступать в роли мутагенов, ускоряя процесс появления мутантов, устойчивых к антибиотикам. Мутагенными свойствами обладают такие антибиотики, как стрептомицин, мицерин, азасерин, митомицин С и др.

Появление форм, резистентных к антибиотикам, можно объяснить и гетерогенностью культур микроорганизмов. Одним из существенных факторов, определяющих гетерогенность микробной популяции, является диссоциация, состоящая из двух основных процессов: возникновения вариантов с высокой частотой, значительно превышающей уровень спонтанного мутационного процесса, и селекции возникающих вариантов под действием внешних условий.

В культуре микроба наряду с чувствительными клетками могут быть клетки, обладающие определенной степенью устойчивости к антибиотику. В этом случае антибиотическое вещество может выступать в роли фактора отбора устойчивых форм. Однако единой точки зрения, объясняющей механизм этого явления, нет. Одни авторы указывают, что гетерогенность микробной культуры обусловлена частым появлением устойчивых к антибиотику вариантов. Другие рассматривают явление гетерогенности в отношении некоторых производных пенициллина (метициллин, оксациллин) в качестве фенотипического фактора, определяемого условиями среды.

Наиболее вероятным генетическим механизмом возникновения резистентности бактерий к применяемым антибиотикам, отмечает С.В. Сидоренко (1998), служит селекция мутаций структурных генов мишеней, на которые действуют антибиотики, а также приобретение детерминант резистентности с подвижными генетически-

ми элементами от других видов микроорганизмов. В последнем случае, как правило, удается показать предсуществование таких детерминант на ранних стадиях эволюции микроорганизмов.

Разнообразие взглядов на феномен резистентности микроорганизмов к антибиотикам и его все возрастающее значение при практическом использовании этих биологически активных веществ требует более подробно рассмотреть все имеющиеся сведения о причинах (механизмах) устойчивости микроорганизмов к антибиотикам. Можно указать на следующие основные факторы, приводящие к устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

1. Состояние клеточной стенки, при котором антибиотик задерживается на поверхности клетки и не проникает внутрь в результате ухудшения проницаемости антибиотиков через пориновые каналы внешней мембраны или по другим причинам.

2. Способность клетки разрушать лекарственный препарат раньше, чем он сможет проявить биологическое действие, посредством конститутивных либо индуцируемых ферментов, усиленно синтезируемых клеткой в присутствии антибиотика, или модифицировать антибиотик.

3. Изменение клеточных структур (рибосом, мембран и др.) или модификация активных центров антибиотика, находящегося в клетке, под действием ряда факторов.

4. Способность бактерий снижать концентрацию антибиотика внутри клетки в результате активного выноса антибиотика.

5. Нарушение в микробной клетке мишени, ответственной за чувствительность микроорганизма к антибиотику.

6. Перенос генов антибиотикорезистентности от устойчивых штаммов микроорганизмов к чувствительным.

Теперь подробнее рассмотрим названные факторы, связанные с проявлением устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

1. Состояние клеточной стенки, при котором она препятствует проникновению антибиотика внутрь клетки. Свойство клеточной стенки задерживать проникновение антибиотических веществ внутрь клетки иллюстрируется на примере пенициллиноустойчивых стафилококков. Количество антибиотика, связанного клетками, определяется степенью чувствительности бактерий: чем чувствительнее организм, тем больше он связывает пенициллина. С другой стороны, иногда клетки чувствительных к пенициллину стафилококков становятся устойчивыми к нему, если они образуют колонии, защищенные внеклеточным покровом, который препятствует проникновению антибиотика непосредственно к клеткам.

Устойчивость *Pseudomonas aeruginosa* к β -лактамным антибиотикам, возможно, связана со скоростью проникновения этих препаратов через внешнюю мембрану.

Возникновение устойчивости названных бактерий к карбапенемам, в частности к имипенему, может быть связано с уменьшением размеров пориновых каналов, через которые «в норме» быстро проникает антибиотик.

Устойчивость бактерий к стрептомицину и другим аминогликозидам может быть обусловлена ослаблением связи антибиотика с поверхностью клетки.

2. Способность клетки разрушать антибиотик раньше, чем он сможет проявить свое биологическое действие. Образование микробной клеткой веществ, способных инактивировать антибиотики, свойственно ряду микроорганизмов. Пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, хлорамфеникол и другие антибиотики легко разрушаются ферментами, продуцируемыми многими видами бактерий. Так, различные штаммы стафилококков, бактерии рода *Bacillus* и многие виды грамотрицательных бактерий образуют ферменты β -лактамазы, амидазы, инактивирующие молекулу пенициллинов, цефалоспоринов и других β -лактамных антибиотиков. Показано, что в клетках бактерий образование β -лактамаз кодируется как хромосомными генами, так и генами плазмид.

Стрептомицин и другие аминогликозидные антибиотики также могут инактивироваться ферментами микробной клетки.

Появление устойчивости к пенициллину у разных штаммов *B. cereus* связано с количеством образованной ими пенициллиназы (β -лактамазы) (табл. 91).

Таблица 91

Отношение устойчивости к пенициллину и скорости синтеза пенициллиназы штаммами *B. cereus*
(no Pollock, 1960)

Штамм	Устойчивость к пенициллину*	Скорость образования пенициллиназы (среднее число молекул, образованных клеткой)
5 (родительский)	0,01	15
5/P (мутант)	0,30	9 500
5/B (мутант)	3,00	75 000

* Максимальная концентрация пенициллина (ед./мл), позволяющая образовывать колонии в питательном агаре по крайней мере от 50% выживших спор.

Повышение устойчивости к бензилпенициллину и ампициллину (полусинтетическому пенициллину) наблюдается у штаммов *E. coli*, способных образовывать β -лактамазу. Существует корреляция между количеством β -лактамазы, вырабатываемой штаммами *E. coli*, и степенью их устойчивости к пенициллинам.

Бета-лактамазы, вырабатываемые грамотрицательными бактериями, можно разделить на две группы: ферменты, кодируемые плазмидными генами, и ферменты, кодируемые хромосомными генами. Первая группа энзимов характеризуется широким спек-

ром действия, они способны гидролизовать как пенициллины, так и цефалоспорины. Вырабатываются в высоких концентрациях. Ферменты второй группы образуются бактериями в незначительном количестве, гидролизуют или пенициллины, или цефалоспорины. Некоторые β -лактамы антибиотики могут индуцировать образование этих β -лактамаз.

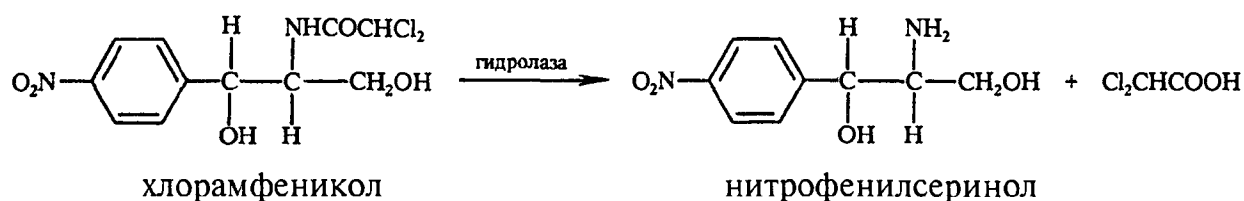
Таким образом, устойчивость многих видов бактерий к пенициллину связана с образованием ими ферментов, разрушающих молекулу антибиотика (β -лактамазы, или пенициллинамидазы, или того и другого вместе).

Образование бактериями β -лактамаз — один из существенных факторов возникновения резистентности микроорганизмов к пенициллинам и другим β -лактамным антибиотикам.

Этот фактор резистентности, по данным Д. Вильямса (1997), определяет около 80% случаев устойчивости бактерий.

В целях предотвращения возникновения резистентных форм бактерий к β -лактамным антибиотикам в результате инактивации препарата β -лактамазами совместно с антибиотиками применяют ингибиторы β -лактамаз (клавулановую кислоту, сульбактамы, тазобактам) или получают липосомные формы этих антибиотиков. В последнем случае защита антибиотиков от β -лактамаз происходит в результате включения β -лактама в положительно заряженные липосомы.

Резистентность микроорганизмов к хлорамфениколу может возникнуть в результате образования другого типа фермента (хлорамфениколгидролазы), разрушающего молекулу этого антибиотика. Хлорамфениколгидролаза выделяется из мицелия стрептомицета, синтезирующего хлорамфеникол, а также вырабатывается рядом видов бактерий. Гидролиз антибиотика под действием хлорамфениколгидролазы идет с образованием биологически неактивного нитрофенилсеринола по следующей схеме:



Основным механизмом внехромосомной устойчивости бактерий к аминогликозидам служит образование ими защитных ферментов (фосфотрансфераз, аденилилтрансфераз, ацетилтрансфераз), инактивирующих аминогликозидные антибиотики.

Резистентность бактерий к эритромицину и его полусинтетическим аналогам (азитромицину, кларитромицину, рокситромицину) связана не только с уменьшением сродства антибиотиков с 50 S субъединицей хромосомы, но и с образованием ферментов типа фосфотрансфераз.

3. Изменение клеточных структур (рибосом, мембран и др.) или модификация активных центров антибиотика, находящегося в клетке, под действием ряда факторов. Резистентность бактерий к β -лактамным антибиотикам обусловлена степенью диффузии препарата через внешнюю мембрану и сродством антибиотика к пенициллинсвязывающим белкам (РВР-ферментам, принимающим участие в построении клеточной стенки и являющимся основной мишенью действия β -лактамных антибиотиков).

Отмеченный механизм устойчивости к β -лактамным антибиотикам у различных групп микроорганизмов встречается примерно в 12% случаев. Резистентность микроорганизмов к названным антибиотикам может быть связана с наличием в периплазматическом пространстве бета-лактамаз, инактивирующих эти антибиотики.

Устойчивость микроорганизмов к стрептомицину связана с тем, что под действием этого антибиотика изменяются рибосомальные белки. Указанный процесс кодируется хромосомными генами.

Аминогликозиды и хлорамфеникол повреждают рибосомный аппарат, а полипептидные антибиотики вызывают дезорганизацию функционирования мембран.

Под действием ряда факторов в клетках бактерий может происходить модификация структуры активных центров антибиотика. Например, в активном центре ванкомицина, находящегося в клетках бактерий, обнаружена замена валина на молочную кислоту, что приводит к невозможности контакта антибиотика с мишенью клетки. В результате возникает резистентность бактерий к ванкомицину.

Появление резистентности *Streptococcus pneumoniae* к эритромицину и другим макролидам, которая широко распространена в настоящее время, обусловлено метилированием участка связывания макролида с рибосомой стрептококка под действием фермента метилазы.

4. Способность бактерий снижать концентрацию антибиотика внутри клетки. Бактериальные клетки, чувствительные к антибиотикам, способны аккумулировать эти соединения внутри клеток. Резистентные же микроорганизмы благодаря системе энергозависимого выброса снижают концентрацию антибиотика внутри клетки и таким образом защищают себя от антибиотического действия этих соединений.

При широком использовании в медицинской практике карбапенемов возникновение резистентных форм *Pseudomonas aeruginosa* может быть связано с отбором мутаций, повышающих энергозависимый выброс антибиотика из клеток. Один из механизмов устойчивости стрептомицетов, вырабатывающих актиномицины,

к действию собственных антибиотиков связан также с выносом синтезированного актиномицина из клеток мицелия в окружающую среду.

Выброс антибиотика из клетки осуществляется системой «насос–помпа», действующей при участии АТФ и под контролем соответствующих генов. «Насос» втягивает в себя антибиотик, который затем «перекачивает» в «помпу». Из «помпы» антибиотик выбрасывается из клетки.

Способностью удаления антибиотиков из клетки (эффлюкс) обладают многие виды бактерий, однако активность этого процесса различна у разных видов. Она зависит также и от строения молекулы антибиотика.

Такой механизм устойчивости бактерий имеет место в отношении антибиотиков тетрациклиновой группы, макролидов, карбапенемов и др. и занимает заметное место в повышении резистентности микроорганизмов. Гены, кодирующие транспортные системы активного выноса из клеток антибиотиков, обычно локализованы на плазидах, что способствует их быстрому распространению.

5. Нарушение мишени в микробной клетке, ответственной за чувствительность микроорганизма к антибиотику. Изменение ответственного за чувствительность микробной клетки к антибиотику звена (мишени) — один из существенных факторов, определяющих появление резистентных форм. Известно, что в большинстве случаев в качестве мишени в микробной клетке для действия антибиотиков служат ферменты или белки с неясно выраженной энзиматической активностью.

Устойчивость грамположительных бактерий (стафилококков, энтерококков) к β -лактамам иногда связана с тем, что у этих бактерий происходит изменение конформации мишеней. Например, проявление резистентности у *Staphylococcus aureus* связано с возникновением нового пенициллинсвязывающего белка (РВР) в мембране, обозначаемого РВР 2¹ или РВР 2а. Такая устойчивость получила наименование метициллин-резистентности.

Устойчивые к метициллину штаммы золотистого стафилококка и *Enterococcus faecalis* оказываются резистентными к цефалоспорином широкого спектра действия (III и IV поколений, стабильным к большинству β -лактамаз). Цефалоспорины, аналогично метициллину, не связываются с РВР 2а.

В результате различных мутагенных воздействий на чувствительную к тому или иному антибиотику микробную клетку можно получить мутант с измененной ферментной системой, являющейся мишенью для антибиотика. Такой мутант может оказаться резистентным к антибиотику. Аналогичным путем были получе-

ны резистентные мутанты *E. coli* к таким антибиотикам, как новобиоцин, рифамицин и некоторые другие.

6. Перенос генов антибиотикорезистентности от устойчивых штаммов микроорганизмов к чувствительным. Такой перенос генов может происходить в результате конъюгации, трансдукции или посредством транслоцирующихся элементов, а также за счет мутаций в хромосомных и плазмидных генах.

Факторы устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, связанные с переносом генов резистентности, впервые были обнаружены на примере *Shigella* в 1957 г. японскими исследователями. Позднее было установлено, что устойчивость штаммов бактерий к лекарственным препаратам определяется наличием плазмид, передаваемых при конъюгации.

Фактор устойчивости (R-фактор*) — это комплекс генов; часть из них ответственна за устойчивость к одному антибиотику, например гентамицину, другие определяют устойчивость к другому антибиотику (стрептомицину), третьи облегчают «заражение» фактором устойчивости одной микробной клетки от другой.

В первые годы применения антибиотиков «инфекционная» устойчивость к ним встречалась редко. Но уже к 1965 г. до 60–70% всех широко распространенных бактерий кишечной группы были носителями R-факторов и проявляли устойчивость к трем или большему числу антибиотиков. Более того, R-факторам свойственно сообщать бактериям устойчивость одновременно к нескольким химически различающимся препаратам, например к сульфаниламиду, пенициллину и стрептомицину.

Плазмиды, несущие гены устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, обнаруживаются практически у всех групп патогенных бактерий. Поэтому частота резистентности к антибиотикам обусловлена, в первую очередь, распространением генов, детерминирующих устойчивость. Перенос генов устойчивости может происходить не только внутри клеток одного вида, но и у различных видов и родов микроорганизмов.

В результате широкого применения химиотерапевтических средств повсеместно распространяются R-факторы, так как они обладают мощными селекционными преимуществами, связанными со способностью придавать бактериям устойчивость одновременно ко многим (до восьми) лекарственным препаратам. Поэтому с прекращением использования на практике того или иного лекарственного препарата снижается и возможность появления устойчивых к нему форм бактерий.

Устойчивость бактерий к антибиотикам, обусловленная R-факторами, обнаруживается у микроорганизмов, не только выделен-

* От англ. «resistance» — *устойчивость*.

ных из животных, от больных людей, принимавших антибиотики, но и полученных из природных мест обитания (загрязненных рек, озер). Отмечается, однако, что природные штаммы бактерий передают свои плазмиды с очень низкой частотой.

Наряду с плазмидами, ответственными за устойчивость бактерий к антибиотикам, в бактериальных клетках имеются так называемые мигрирующие элементы, одни из которых — т р а н с - п о з о н ы — сложные структуры, иногда содержащие дополнительные гены, связанные с резистентностью к антибиотикам. Но и сами продуценты многих антибиотиков способны служить источниками генов резистентности, передавая их с помощью различных механизмов другим микроорганизмам, в том числе и патогенным.

Это подтверждается результатами исследований последнего времени, в которых показано, что гены, участвующие в биосинтезе ряда антибиотиков (аминогликозидов, эритромицина, актиномицинов и некоторых других), физически подобны генам, которые кодируют устойчивость к этим антибиотикам. Иными словами, продуценты антибиотиков имеют гены резистентности к собственным антибиотикам, одновременно проявляя устойчивость к другим антибиотикам. У многих видов стрептомицетов клонированы гены резистентности, основная часть детерминантов которых расположена на хромосоме.

Некоторые гены, регулирующие резистентность, начинают функционировать только в присутствии соответствующих антибиотиков. Так, например, продуцент хлортетрациклина *S. aureofaciens* чувствителен к очень низким концентрациям тиострептона и макролидных антибиотиков. Присутствие в среде названных антибиотиков индуцирует резистентность к ним *S. aureofaciens*.

Распространению устойчивых форм микроорганизмов способствуют лечебные медицинские учреждения, промышленные предприятия по производству антибиотиков и другие места, связанные с массовыми контактами людей и животных с антибиотическими препаратами. Здесь антибиотики создают благоприятный фон для селекции и сохранения резистентных форм микроорганизмов. Массовая и активная миграция населения также способствует распространению названных форм микроорганизмов.

Приведенные данные подтверждают, что явление устойчивости бактерий к антибиотикам — сложный и многофункциональный механизм.

Большой фактический материал свидетельствует о том, что организмы, приобретшие устойчивость к одному из антибиотиков, могут оставаться чувствительными к действию других препаратов. Такое явление наблюдается в отношении антибиотиков, обладающих различным механизмом действия: пеницилли-

ноустойчивые бактерии оказываются чувствительными к действию стрептомицина; стрептомициноустойчивые формы подавляются неомицином, хлортетрациклином и полимиксином; формы, резистентные к пенициллину и стрептомицину, восприимчивы к действию новобиоцина и т.д. Следовательно, антибиотики, различающиеся химическим составом и образуемые разными видами микробов, обладают неодинаковым механизмом биологического действия. Отличие в биохимической активности антибиотических веществ широко используется в химиотерапии: для предупреждения возникновения устойчивых форм применяют одновременно два или более антибиотика.

Однако бывают случаи, когда микробы, приобретшие устойчивость к одному из антибиотиков, становятся резистентными к действию других препаратов. Это перекрестная устойчивость, отмеченная для хлорамфеникола и тетрациклинов, для всех пенициллинов, полученных биосинтетическим путем, и некоторых других биологически активных веществ.

Перекрестная устойчивость отдельных видов микроорганизмов в отношении разных антибиотиков указывает на то, что механизм биологического действия этих веществ идентичен. Как правило, явление перекрестной устойчивости микробов обнаруживается у антибиотиков, близких по химическому составу, хотя есть и исключения, например хлорамфеникол и тетрациклины.

Нередко при концентрациях некоторых антибиотиков, значительно превышающих минимальные бактериостатические, рост всех клеток чувствительного к антибиотику микроорганизма не останавливается. При этом часть клеток способна расти и размножаться, наблюдается увеличение числа клеток и биомассы. В этом случае говорят о явлении «остаточного роста».

«Остаточный рост» не обусловлен возникновением устойчивых мутантов или популяционными сдвигами в сторону менее чувствительных клеток, а связан с медленным размножением части популяции. В этих условиях продолжают идти процессы, непосредственно антибиотиками не затрагиваемые (синтез полисахаридов, липидов). Известно, что антибиотики, способные подавлять белковый синтез (хлортетрациклин, хлорамфеникол, эритромицин и др.), ингибируют этот процесс в клетках на уровне рибосом. Однако при относительно высоких концентрациях этих антибиотиков полного подавления синтеза белка не происходит; «остаточный синтез» белка составляет от 2 до 10%.

Синтез некоторых белков, в частности цитохромов *a* и *b*, по-видимому, локализованных в цитоплазматической мембране, устойчив к действию хлортетрациклина, хлорамфеникола и других антибиотиков, подавляющих синтез белка.

По всей вероятности, одной из причин «остаточного роста» чувствительных микроорганизмов в присутствии высоких концентраций антибиотиков, способных подавлять белковый синтез, может быть «остаточный синтез» белка в клетках.

Итак, под действием антибиотиков в микробной клетке происходит ингибирование вполне определенных звеньев (мишеней) метаболизма чувствительных к ним организмов. Блокирование той или иной мишени зависит как от химической структуры молекулы антибиотика, так и от особенностей строения клетки микроорганизма и происходящих в ней метаболических процессов, контролируемых соответствующими генами.

Обобщенная схема направления «главного удара» различных антибиотиков и некоторых других антибактериальных веществ на конкретные мишени, ответственные за жизненно важные функции обмена веществ в клетке микроорганизма, представлена на рис. 63.

Пути применения антибиотиков, сдерживающие возникновение устойчивых к ним форм микроорганизмов

При разработке научно обоснованной стратегии и тактики применения антибиотиков в медицине и ветеринарии необходимо учитывать экологические условия, и в первую очередь наличие в окружающей среде ксенобиотиков, резистентных к антибиотикам форм микроорганизмов и других факторов, резко меняющих воздействие того или иного антибиотика на макроорганизм.

В медицинской практике в целях сдерживания процесса возникновения форм микроорганизмов, устойчивых к используемым антибиотикам, наметились следующие основные пути.

1. Резкое сокращение использования антибиотиков в качестве профилактических средств и запрещение свободной (без рецепта врача) продажи антибиотических препаратов.

2. Исключение из практики применения в течение многих лет одних и тех же антибиотиков и периодическая замена антибиотиков с возвратом к старым препаратам через 10–15 лет, а также применение антибиотиков при лечении больного не более пяти суток.

3. Повышение лечебных доз антибиотика. Однако это необходимо делать очень осторожно. Для создания в очаге поражения высоких концентраций антибиотиков их вводят непосредственно в эти очаги (внутриплеврально, внутрисуставно, внутрочерепно, внутрисосудисто и т.п.).

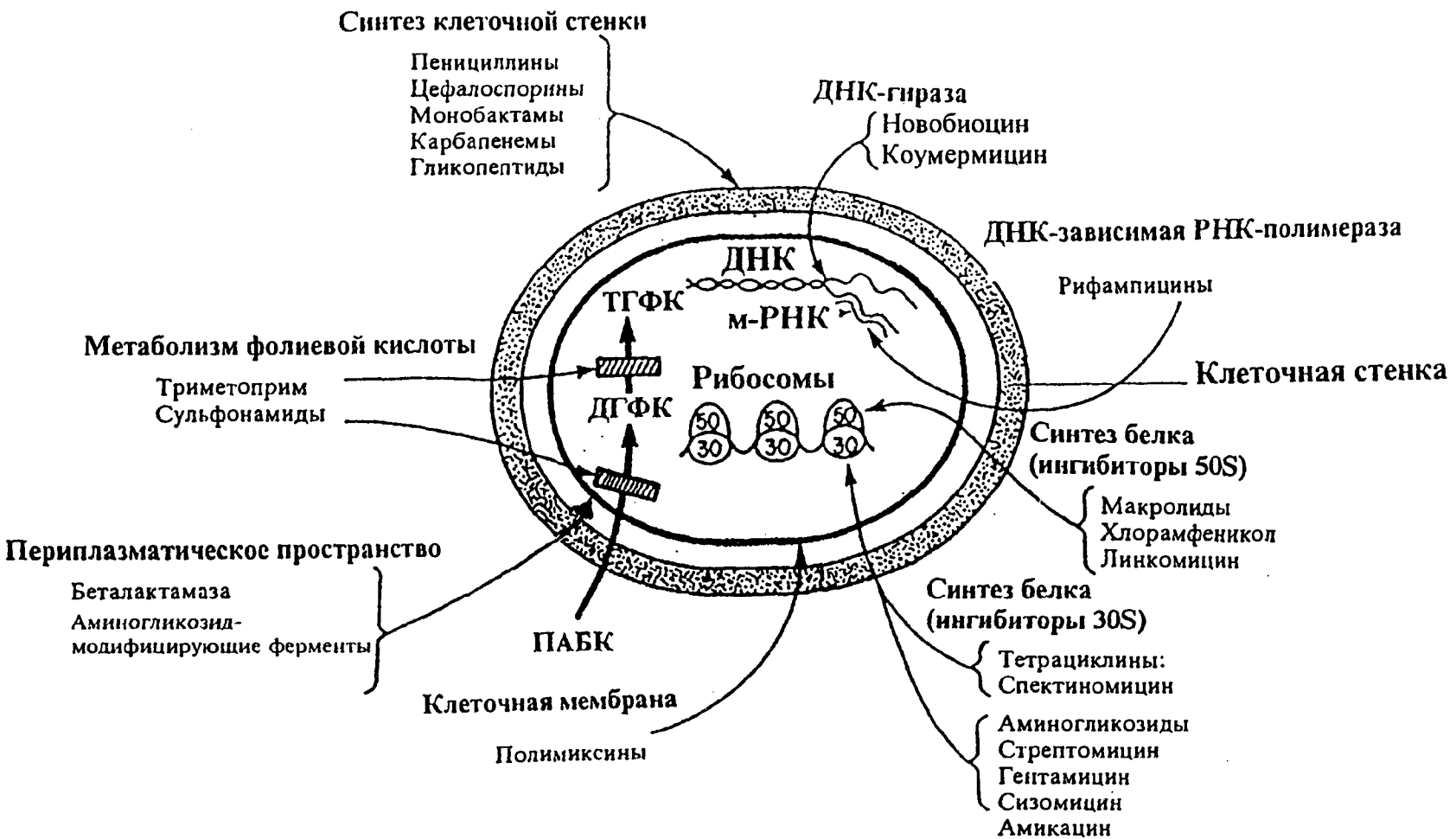


Рис. 63. Схема мишеней действия антибиотиков и некоторых других антибактериальных веществ (по Навашину, 1996)

4. Применение антибиотиков в сочетании с другими препаратами.

5. Применение иммобилизованных на определенных носителях или инкапсулированных в липосомы антибиотиков.

6. Применение ингибиторов ферментов, инактивирующих используемые антибиотики.

На тенденциях, изложенных в пп. 4–6, необходимо остановиться подробнее. Применение антибиотиков в сочетании с дру-

гими соединениями повышает эффективность лечебного действия этих препаратов, а также препятствует быстрому возникновению и распространению резистентных форм микроорганизмов.

Использование антибиотиков в сочетании с сульфаниламидами, нитрофуранами, гормонами, а также с некоторыми другими биологически активными веществами (продигиозаном, лизоцимом, γ -глобулином и др.) способствует повышению их физиологического действия.

Эффективность антибиотиков в терапии повышается также при совместном применении их с ферментами, в частности с протеиназами. Так, химотрипсин резко усиливает антимикробное действие мономицина в отношении патогенных штаммов стафилококка и кишечной палочки. Предварительное внутримышечное введение животным (крысам) трипсина и химотрипсина в дозе 10 мг/кг вызывает увеличение концентрации пенициллинов (бензилпенициллина, ампициллина и оксациллина) в организме животных.

При лечении сифилиса используют пенициллин в сочетании с препаратами висмута, кобальта, а также с методами неспецифической терапии (пирогенные препараты, оксигенотерапия). Хорошие результаты дает применение пенициллина с висмутом в сочетании с иммуностимулирующими веществами (продигиозаном, коамидом). Все это заметно повышает результативность пенициллинотерапии.

Основные белки, протамины, гистоны и некоторые другие биологически активные соединения (этилендиаминтетраацетат, лизоцим) при совместном применении с антибиотиками (стрептомицином, хлорамфениколом, тетрациклином, эритромицином) способны повышать чувствительность штаммов *E. coli*, *S. aureus* к антибиотическим веществам и ингибировать передачу лекарственной устойчивости при конъюгации.

Активно изучаются сочетания β -лактамов, аминогликозидов и других антибиотиков с некоторыми фторхинолонами (ципрофлоксацином, пефлоксацином и др.), проявляющие синергидное действие.

Используется метод применения антибиотиков в сочетании с различными иммуномодуляторами (полисахариды микробного происхождения, гликолипиды, синтетические аналоги пептидогликанов и др.). При таком сочетании может наблюдаться как усиление, так и подавление иммунных реакций. Это зависит от природы иммуномодулятора, его дозы и времени введения.

При лечении стафилококковых заболеваний нередко антибиотики применяют совместно с соответствующим бактериофагом.

Значительное повышение эффективности антибиотикотерапии наблюдается при использовании комбинаций нескольких (чаще двух) антибиотиков, обладающих различными механизмами биологического действия. В медицинской практике широко применяются сочетания пенициллина со стрептомицином (стрептомициллин), олеандомицина с тетрациклином (олететрин, сигмамицин), эритромицина с окситетрациклином (эрициклин), ампициллина с канамицином или гентамицином, гентамицина с левомецетином, тетрациклина с нистатином или леворином и др.

Так, эффективно используется в медицинской практике препарат **аугментин**, состоящий из ампициллина и клавулановой кислоты. Он применяется с 1987 г. во многих странах мира и по антибактериальной активности превосходит многие антибиотики широкого спектра действия. Другим примером комбинированного препарата является **уназин**, в состав которого входят две части ампициллина и одна часть сульбактама. Этот препарат так же, как и аугментин, широко применяется в клинике. Сульбактам, входящий в уназин, имеет β -лактамную структуру, но практически не обладает антибактериальной активностью. Однако он является ингибитором β -лактамаз.

Антибактериальная активность уназина отмечена в отношении устойчивых к ампициллину микроорганизмов, в том числе *Klebsiella*, ряда видов *Pseudomonas*, беспоровых грамотрицательных анаэробов.

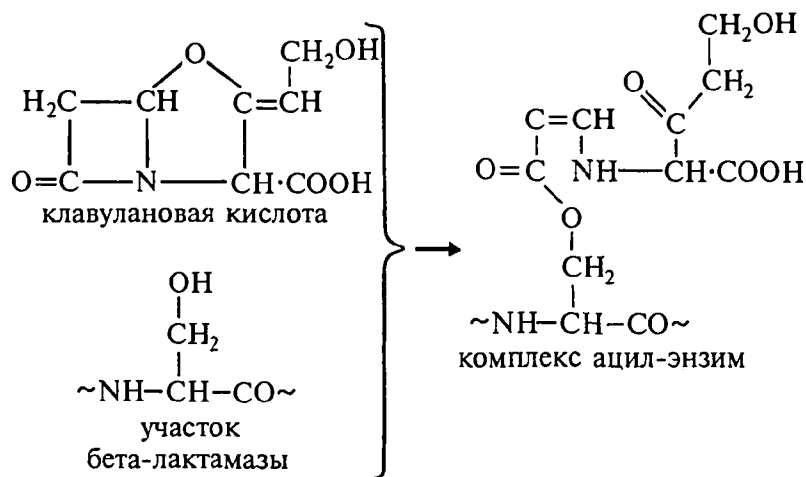
Применение ингибиторов ферментов, инактивирующих антибиотики, — один из методов борьбы с устойчивыми к антибиотикам формами микроорганизмов.

Культура *Streptomyces fulvoviridis* образует вещество, обладающее свойством ингибировать β -лактамазу. При добавлении к пенициллину ликвидируется возможность чувствительного микроорганизма, способного образовывать этот фермент, разрушать антибиотик.

На практике широко применяются ингибиторы β -лактамаз (клавулановая кислота, сульбактам) совместно с антибиотиками, относящимися к группе β -лактамов. Например, совместное применение β -лактамных антибиотиков (пенициллинов, цефалоспоринов) с ингибиторами β -лактамаз приводит к значительному снижению появления резистентных к названным антибиотикам форм бактерий.

Амоксилав — препарат, состоящий из амоксициллина и клавулановой кислоты. Используется для лечения заболевания, возбудителем которого являются полимикробные, в том числе смешанные аэробные и анаэробные инфекции. Препарат препятствует возникновению резистентных форм.

Механизм ингибирования β -лактамазы клавулановой кислотой связан со способностью последней проникать в активный центр фермента. При этом происходит реакция ацилирования молекулы лактамазы по следующей схеме (Ролинсон, 1992):



Ацил-энзимный комплекс гидролизуется медленно, и, следовательно, фермент в течение длительного времени оказывается ингибированным.

В целях повышения эффективности антибиотикотерапии разрабатывается синтез так называемых бис-антибиотиков, т.е. препаратов, получаемых на основе двух антибиотиков, связанных между собой в ковалентный комплекс с образованием единой молекулы с двумя центрами активности. В качестве примеров бис-антибиотиков можно назвать бис-граммицидин А. Этот препарат способен создавать в мембране ионные каналы спиральной структуры, среднее время функционирования которых в 30–60 раз превышает аналогичное время жизни монограммицидиновых каналов. Бис-рубомидины проявляют более высокую противоопухолевую активность. Бис-антибиотик, полученный на основе полимиксина В и грамицидина А, биологически активен в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Синтезирован бис-полимиксин В, обладающий биологической активностью в отношении только грамотрицательных бактерий.

Комбинированные антибиотики применяют и в том случае, если препарат имеет высокую биологическую активность, но вызывает нежелательные побочные реакции. При одновременном применении нескольких антибиотиков наблюдаются четыре формы действия используемых комбинаций в отношении микроорганизмов: индифферентная, аддитивная, синергидная и антагонистическая.

Индифферентность. При совместном биологическом действии антибиотиков биохимический эффект каждого из них может проявляться независимо друг от друга.

Аддитивное действие (от лат. «addito» — *прибавление*). При комбинированном применении антибиотиков наблюдается суммарный эффект каждого из используемых препаратов (арифметическое сложение действия препаратов). При аддитивном характере действия антибиотики блокируют (нарушают) в цепи метаболизма чувствительного организма одни и те же реакции.

Синергидное действие (от греч. «synergeia» — *содружество*). При совместном применении ряда антибиотиков происходит усиление антимикробного эффекта по сравнению с суммой биологических действий отдельно взятых препаратов. Синергидное действие антибиотиков проявляется в том случае, если препараты способны одновременно нарушать разные реакции метаболизма клетки (разные мишени) или если один из антибиотиков своим действием способствует проникновению в клетку другого антибиотика. Синергизм антибиотиков может проявляться и в том случае, если заболевание вызвано двумя различными возбудителями, а каждый из применяемых антибиотиков подавляет развитие лишь одного определенного возбудителя.

Синергидное действие проявляется при сочетании разных антибиотиков. Так, совместное применение пенициллина и стрептомицина повышает скорость гибели ряда микроорганизмов, в том числе и энтерококков. Синергидное действие этих антибиотиков связано с тем, что, с одной стороны, в результате действия пенициллина повреждается клеточная стенка микроорганизмов, что, в свою очередь, облегчает проникновение стрептомицина в клетки; с другой стороны, стрептомицин и другие аминогликозиды, нарушая молекулярную организацию мембран, повышают доступность для пенициллина пенициллинсвязывающих белков, локализованных в цитоплазматической мембране.

Для борьбы с широким распространением в клиниках множественноустойчивых штаммов микроорганизмов используют комбинацию имипенема и циластатина, проявляющих синергидное действие, которая известна под названием *тиенам*, а также смесь клиндамицина и нетилмицина.

Эффективной оказалась комбинация тетрациклинов и стрептомицина при лечении острого и хронического бруцеллеза. Высокий эффект обнаруживается при совместном применении олеандомицина и окситетрациклина. Синергидным действием обладают многие другие сочетания антибиотиков.

Антагонизм антибиотиков. Антибиотический эффект комбинаций препаратов может уменьшаться по сравнению с действием любого отдельно взятого антибиотика. Это может произойти в том случае, если один из компонентов раньше, чем другой, блокирует или подавляет одну из менее важных реакций общей цепи

обмена веществ организма. Антагонизм хлортетрациклина, окситетрациклина и хлорамфеникола к пенициллину *in vitro* и *in vivo* проявляется в отношении стрептококка группы А и палочки Фридлендера (*Klebsiella pneumoniae*).

По-видимому, это связано с тем, что в присутствии, например, тетрациклиновых антибиотиков бактерии перестают размножаться (эти вещества подавляют главным образом белковый синтез), в результате чего приостанавливается действие пенициллина, который специфически подавляет синтез клеточной стенки. Однако синтез компонентов клеточной стенки происходит лишь в растущей культуре.

Вместе с тем, как отмечает М. Нейман (1985), хлорамфеникол в сочетании с пенициллином может проявлять синергидное действие в отношении стафилококков, образующих β -лактамазы. Такое действие связано с тем, что хлорамфеникол способен подавлять секрецию лактамаз клетками стафилококков.

Антагонизм действия смеси антибиотиков может быть обусловлен также тем, что один из антибиотиков комбинации способен индуцировать ферменты, участвующие в инактивации другого антибиотика. Известны случаи, когда некоторые цефалоспорины способны индуцировать синтез хромосомных β -лактамаз.

Неумелое использование антибиотиков в медицинской практике или самолечение ими может привести к нежелательным последствиям. На нижеприведенной схеме взаимодействия некоторых наиболее широко применяемых антибиотиков (рис. 64) видно, что в одних случаях при совместном их применении возможно усиление токсичности, в других — явная токсичность.

Заведомо токсичными, по данным А.В. Смольяникова и П.Ф. Калитеевского (1989), являются следующие комбинации антибиотиков: стрептомицин–гентамицин, стрептомицин–мономицин, стрептомицин–неомицин, цефалоспорин–хлорамфеникол, неомицин–гентамицин, мономицин–гентамицин, канамицин–неомицин.

Возможные результаты совместного применения, например, двух антибиотиков (А и Б) можно выразить обобщенно.

Индифферентное действие: А и Б равняется биологической активности А и Б.

Аддитивный эффект: А и Б равно сумме биологических активностей используемых антибиотиков (А + Б).

Синергидное действие: А и Б больше суммы биологических активностей (А + Б)

Антагонистический эффект: А и Б меньше биологического действия А или Б.

Для снижения побочного действия антибиотиков значительное внимание уделяется методу направления (транспорта) в очаг

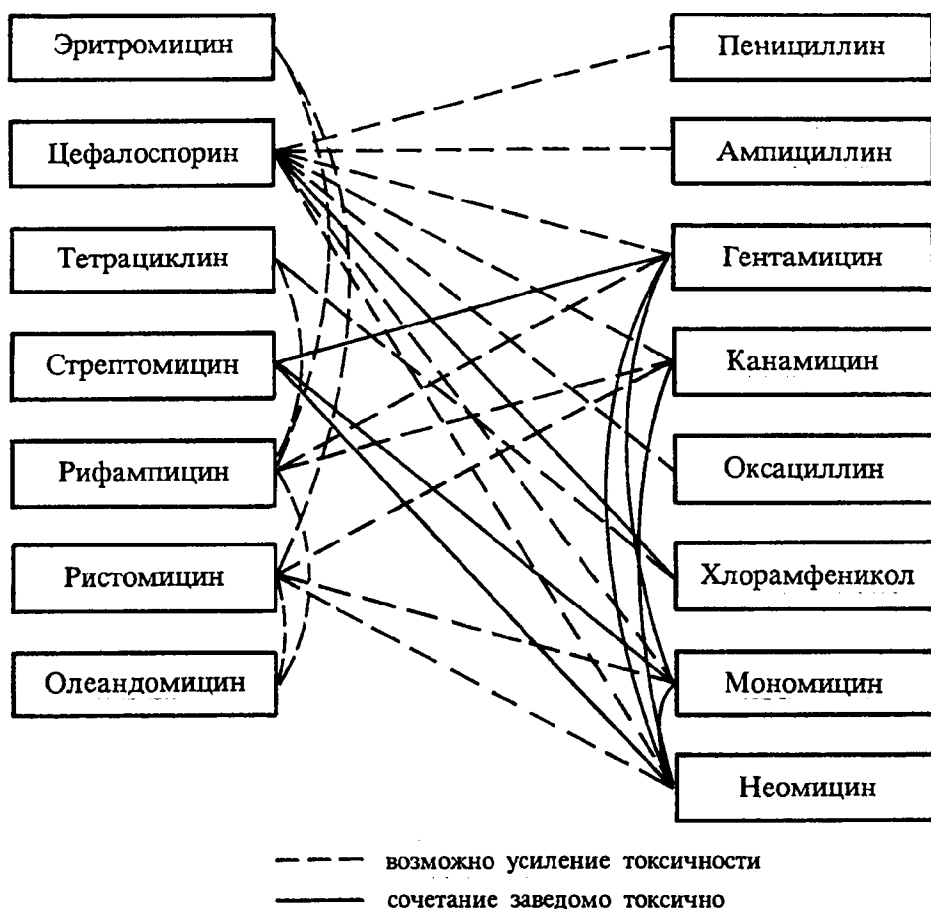


Рис. 64. Взаимодействие некоторых антибиотиков
(по Смольяникову, Калитеевскому, 1989)

поражения антибиотического вещества. С этой целью применяют инкапсулированные в липосомах или иммобилизованные на альбумине человека и других носителях антибиотики. В качестве транспортных средств используют также собственные клетки человека: эритроциты, тромбоциты и лейкоциты, которые, по мнению ряда авторов, наиболее выгодны с точки зрения биологической совместимости.

Липосомальные формы антибиотиков. Соответствующим методом получают липосомы*, в которые инкапсулируют те или иные антибиотики. Высокая степень инкапсулирования характерна для таких антибиотиков, как β -лактамы, аминогликозиды, антрациклины, фузидин и др.

Полученный комплекс липосома — антибиотик обладает рядом положительных свойств: снижается токсичность препарата, он способен к направленному транспорту, при этом усиливает-

* Липосомы — это замкнутые би- или многослойные липидные везикулы (размером от 25–40 до 100 нм и более), близкие по некоторым характеристикам к природным биологическим мембранам. Они не токсичны и не дают побочных реакций. Для образования липосом обычно используют лецитин (фосфатидилхолин) и холестерин в соотношении 1 : 1. Липосомы могут формироваться и из других липидных и дополнительных компонентов.

ся проникновение антибиотиков через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий, обеспечивается пролонгированное действие антибиотика, уменьшается возможность возникновения резистентных форм микроорганизмов в результате защиты антибиотика, включенного в липосомы, от действия ферментов, в частности от β -лактамаз, повышается стабильность антибиотиков.

Применение антибиотиков в смеси с полимерами или получение модификаций антибиотических веществ в результате химического присоединения их к полимерным материалам (это, по существу, использование иммобилизованных антибиотиков) также способствует пролонгации биологического действия антибиотиков в организме человека, уменьшению их токсичности, улучшению растворимости, повышению устойчивости к действию ферментов. Эффект пролонгирующего действия полимера на антибиотик зависит как от молекулярной массы полимера, так и от химической природы антибиотического вещества.

Как отмечает А.И. Винников (1989), подбор компонентов для комплексного применения антибиотиков, являющихся важнейшим фактором в борьбе с возникновением резистентности микроорганизмов к этим биологически активным соединениям, должен обеспечить следующие процессы в клетке бактерий: а) увеличить проницаемость мембран; б) подавить процесс инактивации антибиотика; в) увеличить сродство антибиотика к основной мишени; г) препятствовать появлению обходных метаболических путей.

Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков

Антибиотики широко применяются в медицинской практике в качестве химиотерапевтических веществ. Незаменимы они при лечении почти всех инфекционных и многих других, часто тяжелых заболеваний.

Наряду с применением природных антибиотиков все большее значение приобретают полусинтетические препараты, полученные в результате химической модификации природных структур. Среди них ценными оказались полусинтетические пенициллины (оксациллин, диклоксациллин, карбенициллин и др.), полусинтетические производные цефалоспорины четырех поколений, эритромицина и других антибиотиков. Успешно применяются в медицинской практике смеси антибиотиков, различные препараты пролонгированного действия и т.д.

В настоящее время наиболее активно используется около 100 антибиотиков, а вместе с их производными (полусинтетические, комбинированные препараты) — более 200.

При назначении того или иного препарата следует добиваться максимального терапевтического эффекта при минимальном риске побочного действия. В этих целях учитываются индивидуальные режимы применения антибиотического вещества, в том числе доза препарата, кратность и пути введения антибиотика. Большое значение при этом имеет непрерывный контроль за концентрацией антибиотика в жидкостях и тканях больного. Для этого чаще стали применять высокоспецифичный, чувствительный и относительно простой иммуноферментный метод определения низких концентраций антибиотиков.

Широкое и активное применение антибиотиков в качестве химиотерапевтических веществ на протяжении более 50 лет способствовало накоплению экспериментального материала о побочных реакциях, вызываемых ими. В ходе рассмотрения отдельных антибиотиков мы кратко останавливались на тех побочных реакциях, которые могут появиться при их применении в медицинской практике. Здесь рассмотрим обобщенные данные по некоторым негативным реакциям, которые наблюдаются при антибиотикотерапии.

И.А. Кассирский и Ю.И. Милевская еще в 1966 г. указали на три основные группы побочных реакций при применении антибиотиков: аллергические, токсические и обусловленные специфическим действием антибиотических веществ (табл. 92).

Аллергические реакции — наиболее частое проявление побочного действия антибиотиков. Эти реакции наблюдаются при применении практически всех антибиотиков. Однако чаще всего они возникают при применении антибиотиков пенициллиновой группы, так как в медицинской практике они самые распространенные. «Реакция на пенициллин, — отмечают А.В. Смольяников и П.Ф. Калитеевский (1989), — может появиться даже у тех, кто заведомо не принимал ранее пенициллина, скажем у грудного ребенка, получающего молоко матери, леченной пенициллином, или после употребления обычного коровьего молока, стабилизированного этим препаратом... Известны случаи, когда женщины реагировали на сперму мужчин, получавших лечение пенициллином».

Дж. Касик и Дж. Томпсон (1970) приводят данные, показывающие, что аллергические реакции к пенициллину проявляются у 14 из 10 000 больных. Что касается смертельных случаев при анафилактических реакциях как наиболее серьезных форм немед-

Побочные реакции при терапии антибиотиками
(из Навашина и др., 1977, по Кассирскому, Милевской, 1966)

Реакции и механизм их возникновения	Реакции	
	опасные для жизни	не опасные для жизни
<p>Аллергические реакции Развиваются как осложнение на аллерген (антибиотик); возникновение не зависит от дозы введенного антибиотика; могут последовать за первым введением антибиотика, сенсибилизация нарастает при повторных курсах лечения</p>	Анафилактический шок, ангионевротический отек гортани	Кожный зуд, крапивница, сыпь, астматические приступы, ринит, конъюнктивит, эозинофилия
<p>Токсические реакции Возникновение связано с органотропным фармакодинамическим действием антибиотиков Степень выраженности зависит от продолжительности лечения и дозы препарата.</p>	Токсическое действие на кровь. Агранулоцитоз, апластическая анемия	Поражение VIII пары черепно-мозговых нервов, периферических нервов. Нефротоксическое действие: тошнота, рвота, понос
<p>Дисбактериозы и другие явления Связанные с химиотерапевтическим действием антибиотиков</p>	Генерализованный кандидосепсис. Стафилококковые энтероколиты, вторичные пневмонии, вызываемые грамотрицательными микроорганизмами	Местные кандидозы — молочница и др.

ленной реакции организма на вводимый в виде инъекции пенициллин, то эти авторы определяют их довольно приблизительно: одна смерть на 10 000 больных, применявших пенициллин (данные из Vetina, 1983).

Токсические реакции характерны для многих групп антибиотиков. Аминогликозиды (стрептомицин, неомицин, мономицин) обладают относительно высокой токсичностью. Такие антибиотики, как хлорамфеникол, группа ванкомицина — ристомидина и некоторые другие, проявляют токсическое действие, связанное с кроветворением. Тетрациклиновые антибиотики, макролиды отличаются гепатотоксическим действием.

Осложнения, связанные со **специфическим антимикробным действием антибиотиков**, происходят в результате нарушения равновесных экосистем организма человека. От этого зависят возникновение дисбактериозов и нарушение витаминного баланса организма, вторичные инфекции, вызываемые резистентными к

антибиотикам формами возбудителей. Такие осложнения могут проявляться как у взрослых людей, так и у детей. О некоторых осложнениях упоминалось при рассмотрении отдельных антибиотиков. Здесь же будут названы те негативные реакции, о которых не было сказано ранее.

Так, тетрациклиновые антибиотики могут накапливаться в костях и нарушать их рост. Это особенно заметно проявляется у детей, длительное время принимавших указанные антибиотики. Хлорамфеникол и стрептомицин могут вызывать поражение костного мозга и нарушать процесс кроветворения (гипопластическая анемия). Противоопухолевые антибиотики из группы антрациклинов, в том числе адриамицин (доксирубицин), вызывают нарушение генетического аппарата не пораженных опухолью клеток организма.

Антибиотики, подавляющие синтез нуклеиновых кислот или нарушающие энергетический метаболизм, обладают, как правило, широким набором побочных реакций.

Обобщая данные о токсичности используемых в медицинской практике антибиотиков, можно указать на следующие реакции: ототоксичность, нервно-мышечная блокада, неврологическая токсичность, нарушение функций крови, печени, желудочно-кишечного тракта и др. Антибиотики, вызывающие перечисленные токсические реакции, приведены ниже (по Vetina, 1983):

Токсическая реакция	Антибиотики
Ототоксичность	Аминогликозиды: неомицин, стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, канамицин, амикацин; полимиксин В, хлорамфеникол, эритромицин, тетрациклины
Нервно-мышечная блокада	Аминогликозиды: стрептомицин, дигидрострептомицин, неомицин, канамицин, гентамицин, тобрамицин; полимиксины: колистин, полимиксин В, колестиметат; тетрациклины: ролитетрациклин, окситетрациклин; линкомицин, клиндамицин
Неврологическая токсичность	Циклосерин, хлорамфеникол, пенициллины
Нефротоксичность	Пенициллины, цефалоспорины (более часто цефалоридин); аминогликозиды: стрептомицин, канамицин, неомицин, гентамицин, тобрамицин, амикацин; полимиксины В и Е, тетрациклины
Токсичность для крови	Хлорамфеникол, пенициллины, цефалоспорины, аминогликозиды, тетрациклины, рифамицины
Токсичность для печени	Эритромицин, рифампин
Желудочно-кишечная токсичность	Неомицин, клиндамицин, линкомицин, ампициллин, тетрациклины, хлорамфеникол
Токсичность для кожи	Тетрациклины (особенно деметилтетрациклин и доксициклин), полимиксины, ампициллин

Для уменьшения числа серьезных побочных реакций, вызываемых антибиотическими веществами, необходимо строго соблюдать оправдавшие себя основные принципы рационального применения антибиотиков, заменять препараты, обладающие токсичным действием, менее токсичными. Рациональная и безопасная антибиотикотерапия предусматривает всесторонний учет свойств антибиотических веществ, применяемых на практике, особенностей микроорганизма, вызывающего заболевание, и организма больного.

Основной путь предупреждения побочного действия антибиотиков связан с применением рациональной антибиотикотерапии, которая, по мнению Э.А. Бабаяна (1977), определяется тремя основными факторами: 1) выбором препарата с учетом его фармакологических свойств и спектра действия; 2) выделением, идентификацией и определением чувствительности бактериальной флоры к антибиотику; 3) выявлением или предупреждением повышенной чувствительности больных к выбранному антибиотику.

При применении антибиотиков необходимо учитывать индивидуальные особенности больного. Игнорирование этого важнейшего правила в отдельных случаях приводит к нежелательным последствиям, связанным с тяжелыми побочными явлениями.

Подробное изучение всех характеристик антибиотических веществ, применяемых на практике, выяснение путей возникновения возможных побочных реакций позволит с большим успехом использовать эти биологически активные вещества в медицинской практике.

Вопросы для самоконтроля

1. Дайте оценку общих принципов действия антибиотиков на клетку микро- и макроорганизмов.
2. Каковы пути проникновения антибиотиков через внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий?
3. Перечислите основные механизмы биологического действия антибиотиков и дайте их краткую характеристику.
4. Как происходит ингибирование синтеза клеточной стенки бактерий и грибов?
5. Каким образом нарушаются функции мембран? Расскажите об антибиотиках-ионофорах.
6. Как подавляется синтез белка и нуклеиновых кислот?
7. Охарактеризуйте основные причины возникновения устойчивости микроорганизмов к действию антибиотиков.
8. Укажите основные пути применения антибиотиков, которые сдерживают возникновение резистентных форм микроорганизмов.
9. Каковы побочные реакции, появляющиеся при применении в медицине антибиотиков?

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ ПРОМЫШЛЕННОГО ПОЛУЧЕНИЯ АНТИБИОТИКОВ

Общие сведения о производстве антибиотиков

После установления высоких лечебных свойств первого антибиотика — пенициллина — сразу же возникла задача организации его производства в больших количествах. На первом этапе промышленное получение этого препарата носило примитивный, экономически нерентабельный характер. Выращивание продуцента антибиотика осуществлялось на средах, находящихся в небольших сосудах (матрацы, молочные бутылки, колбы и др.), при поверхностном культивировании гриба. Процесс развития гриба продолжался 8–10 сут. Такой способ культивирования гриба при большой затрате труда давал весьма низкий выход антибиотика, и себестоимость препарата была соответственно очень высокой. Безусловно, такое получение антибиотика не могло удовлетворить возрастающие запросы медицины. В результате поисков путей наиболее рационального способа производства антибиотика был предложен метод глубинного выращивания гриба в специальных емкостях — ферментерах — при продувании воздуха и перемешивании культуральной жидкости.

Производство антибиотиков — хорошо развитая отрасль. В настоящее время она занимает одно из ведущих мест в производстве лекарственных препаратов. В ряде стран (США, Япония, Англия, Франция и др.) производство антибиотических веществ — одна из прибыльных отраслей химико-фармацевтической промышленности. Так, в США ежегодно выпускается антибиотиков и их производных на сумму более 400 млн долларов.

Огромный спрос на антибиотические препараты со стороны медицины, сельского хозяйства, пищевой промышленности способствовал усиленному поиску новых антибиотиков и получению их в промышленных масштабах. Если в начале 40-х гг. XX в. мировая промышленность выпускала всего лишь 2–3 антибиотика, то теперь это число превышает 200.

Одновременно с ростом числа новых антибиотиков быстро росло промышленное производство ценных препаратов (табл. 93) и снижалась их стоимость.

При массовом промышленном выпуске пенициллина стоимость его в 1960 г. снизилась в США до 0,02 доллара за 1 млн ед. против 18 долларов в 1943 г., т.е. за 17 лет — в 900 раз. Аналогичные данные

имеются и в отношении других антибиотиков. Так, 1 г основания стрептомицина в 1944 г. в США стоил 15, а уже в 1959 г. — 0,03 доллара.

Количество выпускаемого пенициллина с 13 кг в 1943 г. возросло в 1979 г. до 14 800 т (Lowe, Elander, 1983). В 1957 г. было выпущено более 400 т антибиотиков широкого спектра (в основном тетрациклинов), в 1974 г. производство антибиотиков составило около 4000 т, а в 1977 г. — 5000 т.

Как отмечает Спалла (1978), более 90 фирм мира производят антибиотики. В последнее время ежегодно выпускается 25 тыс. т антибиотиков, в том числе: 17 тыс. т пенициллинов на общую сумму 350 млн, 5 тыс. т тетрациклинов на 135 млн, 1,2 т цефалоспоринов на 100 млн долларов, 800 т эритромицинов и 1000 т других антибиотиков (K. Kieslich, 1984).

В 1960 г. более 30% всех антибиотиков, выпускаемых в США, использовалось в ветеринарии и сельском хозяйстве в качестве добавок к корму животным.

Производство антибиотиков в США в 1943—1961 гг.
(по Goldberg, 1959; Збигневу, 1963)

Антибиотики	Производство, т												
	1943	1950	1951	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	1960	1961
Пенициллин	0,013	195	284	304	342	286	206	285	346	315	257	299	390
Стрептомицин	1,7*	21	18	23	57	64	70	59	90	78	127	274	286
Дегидрострептомицин	—	72	1143	153	138	202	167	223	264	54	213	178	—
Неомицин	—	—	—	—	—	7	7	8	11	—	—	—	—
Тетрациклин	—	—	—	—	—	—	—	100	184	—	139	130	—
Антибиотики широкого спектра действия	—	100	139	193	200	271	283	216	211	—	300	356	—
Антибиотики, применяемые в животноводстве	—	—	107	117	197	217	236	253	394	—	635	544	—
Антибиотики, применяемые в медицине	—	388	584	673	737	830	733	891	1076	1250	1035	1260	—

Наша страна по производству антибиотиков до 1991 г. занимала одно из ведущих мест в мире.

Выпуск пенициллина в Советском Союзе был начат в 1944 г. на предприятиях химико-фармацевтической промышленности методом поверхностного культивирования гриба. Создание специализированных предприятий по промышленному производству пенициллина методом глубинного выращивания продуцента началось в стране в 1946–1948 гг. К 1957 г. у нас уже функционировали несколько крупных специализированных предприятий, которые производили пенициллин, стрептомицин, тетрациклин, хлортетрациклин.

Несмотря на огромные послевоенные экономические трудности, руководство нашей страны организовало ряд специализированных научных учреждений, в том числе Всесоюзный научно-исследовательский институт антибиотиков, Институт по изысканию новых антибиотиков АМН СССР (Москва), Всесоюзный научно-исследовательский и технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения (Ленинград), Институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов и др. Высшие учебные заведения начиная с 1947 г. (МГУ) организовали подготовку соответствующих кадров.

Антибиотическая промышленность Советского Союза превращалась в современную, технически высокооснащенную отрасль. Создавались новые предприятия. За период с 1958 по 1961 г. в число действующих заводов вошли 5 крупных предприятий по производству антибиотиков: Курганский (1958), Красноярский, Пензенский, Саратовский (1959), Новосибирский (1961).

Описанию процессов, связанных с промышленным получением антибиотиков, различных аппаратов и приборов, рассмотрению отдельных этапов технологии производства антибиотических веществ посвящен ряд книг, в том числе «Производство антибиотиков» коллектива авторов под редакцией Навашина и др. (1970). Поэтому здесь рассмотрим лишь наиболее принципиальные и общие вопросы, связанные с производством антибиотиков.

Успехи антибиотической отрасли промышленности и качество выпускаемой продукции определяются уровнем основных стадий технологического процесса. Современное промышленное получение антибиотиков — это сложная многоступенчатая биотехнологическая система, состоящая из ряда последовательных стадий.

1. Стадия биосинтеза (образования) антибиотика. Это основная биологическая стадия сложного процесса получения антибиотического вещества. Главная задача на этой стадии — создание оптимальных условий для развития продуцента и максимально возможного биосинтеза антибиотика.

Высокая результативность стадии зависит от уровня биосинтетической активности продуцента антибиотика, времени его максимального накопления, стоимости сред для культивирования организма, в том числе стоимости применяемых предшественников, а также общих энергетических затрат на процессы, связанные с развитием продуцента антибиотического вещества.

Для максимального выхода антибиотика при культивировании продуцента используют комплекс мер, включающий подбор наиболее благоприятных для этих целей питательных сред и режимов культивирования организма. Весь этот комплекс мер включается в понятие **управляемый биосинтез**.

В промышленных условиях управляемый биосинтез требует строгого соблюдения технологического процесса как на этапе подготовки инокулята, так и на стадии биосинтеза. При подготовке инокулята особое внимание обращают на состав среды, на которой выращивается организм, на возраст клеток или мицелия. На стадии биосинтеза кроме состава среды большую роль играют скорость потребления тех или иных ее компонентов, предшественники, регуляция процесса аэрации культуры, поддержание соответствующих температуры и рН среды и другие показатели режима культивирования.

2. Стадия предварительной обработки культуральной жидкости, клеток (мицелия) микроорганизма и фильтрации (отделения культуральной жидкости от биомассы продуцента). Эффективность стадии во многом определяется составом среды для выращивания продуцента антибиотика, характером его роста, местом основного накопления биологически активного вещества (в культуральной жидкости или внутриклеточно).

3. Стадия выделения и очистки антибиотика. На этой стадии в зависимости от свойств антибиотика, его химического строения и основного места накопления антибиотического вещества применяются различные методы выделения и очистки. В качестве основных методов используются экстракция, осаждение, сорбция на ионообменных материалах, упаривание, сушка.

Особенность этой технологической стадии определяется тем, что на первом этапе работы приходится иметь дело с небольшой концентрацией (не более 1%) антибиотика в обрабатываемом растворе, тогда как на последующих этапах его концентрация увеличивается до 20–30%. Все это требует применения различных емкостей и объемов используемых реагентов.

4. Стадия получения готовой продукции, изготовление лекарственных форм, расфасовка. Особенность стадии определяется очень высокими требованиями к качеству конечного продукта. При химической очистке антибиотических веществ необходимо соблюдать безукоризненную чистоту помещений, оборудования,

проводить их систематическую дезинфекцию. В случае выпуска антибиотиков, предназначенных для инъекций, препараты должны быть стерильными; получение таких антибиотических препаратов, приготовление различных лекарственных форм, дозировку (расфасовку) и упаковку следует проводить в асептических условиях. Расфасовка должна соответствовать запросам медицинских работников, связанным с удобством применения антибиотиков на практике.

В условиях промышленного производства антибиотиков принимают меры к максимальному снижению себестоимости препаратов путем интенсификации всех стадий технологического процесса, и прежде всего повышения эффективности первой стадии — биосинтеза антибиотического вещества. Для этого необходимо:

а) внедрение в производство наиболее высокопродуктивных штаммов микроорганизмов — продуцентов антибиотиков;

б) создание и обеспечение самых благоприятных условий развития продуцента антибиотика на относительно дешевых средах;

в) широкое использование математических методов планирования процесса развития организма и электронно-вычислительной техники в целях оптимизации и моделирования условий его культивирования, обеспечивающих максимальный выход антибиотика;

г) применение современного оборудования на всех стадиях технологического процесса с автоматизированными контролирующими устройствами основных параметров развития организма и стадий биосинтеза антибиотика.

Вместе с этим необходимы повышение качества выпускаемых антибиотиков, их стандартизация.

Методы культивирования продуцентов антибиотиков

В современных условиях наиболее перспективным методом выращивания микроорганизмов — продуцентов антибиотиков или других биологически активных соединений признан метод глубинного культивирования. Метод состоит в том, что микроорганизм развивается в толще жидкой питательной среды, через которую непрерывно пропускается стерильный воздух и среда перемешивается.

Существует четыре основные модификации глубинного способа выращивания микроорганизмов.

1. Периодическое культивирование. При этом способе весь процесс развития микроорганизмов полностью завершается в одном ферментере, после чего ферментер освобождается от культуральной жидкости, тщательно промывается, стерилизуется и

вновь заполняется свежей питательной средой. Среда засеивается изучаемым микроорганизмом, и процесс возобновляется.

2. **Отъемный метод.** Культивирование микроорганизмов осуществляется в ферментерах с периодическим отбором части объема культуральной жидкости (от 30 до 60% общего объема). При этом объем культуральной жидкости в ферментере доводится свежей питательной средой до исходного уровня.

3. **Батарейный способ.** Микроорганизмы развиваются в ряду последовательно соединенных ферментеров. Культуральная жидкость на определенной стадии развития микроорганизма перекачивается из первого ферментера во второй, затем из второго — в третий и т.д. Освобожденный ферментер немедленно заполняется свежей питательной средой, засеянной микроорганизмом. При этом способе выращивания микроорганизмов емкости используются более рационально.

4. **Непрерывное культивирование.** Метод принципиально отличается от указанных модификаций глубинного культивирования продуцентов антибиотиков. В основе метода лежит принцип непрерывного потока питательной среды, что позволяет поддерживать развитие микроорганизма на определенной стадии его роста. Стадия развития микроорганизма определяется тем, что в этот период происходит максимальный биосинтез антибиотика или другого биологически активного соединения.

При обычном процессе непрерывного культивирования продуцентов антибиотиков интенсивность биосинтеза антибиотического вещества, как правило, снижается по сравнению с периодическим культивированием. Несмотря на это, исследования по применению непрерывного культивирования для производства антибиотиков продолжаются.

В условиях непрерывного процесса биосинтеза некоторых антибиотиков можно получить хорошие результаты, если процесс вести в две стадии: в первом аппарате батареи поддерживают высокую скорость потока, обеспечивающую большую скорость роста продуцента антибиотика, с тем чтобы получить молодую высокоактивную биомассу, а во втором аппарате обеспечивают низкую скорость потока и соответственно небольшую скорость роста.

Процесс непрерывного культивирования — перспективное направление современной биотехнологии.

ФЕРМЕНТЕРЫ

Для изучения условий образования антибиотиков и их производства в промышленных масштабах применяют ферментеры — специальные герметически закрытые емкости, в которых создаются

хорошие условия для глубинного развития продуцента и биосинтеза им антибиотика. Ферментер снабжен приспособлениями для достаточной аэрации и перемешивания культуры, поддержания

необходимой температуры, а также контрольно-измерительными приборами (рис. 65).

Аэрирование культуры происходит в результате подачи стерильного, подогретого до необходимой температуры воздуха через специальные приспособления — барботеры — и перемешивания культуральной жидкости различного типа мешалками (пропеллерными, турбинными и др.), а также использования отбойников.

Аэрация культуры повышается при использовании мешалок новых конструкций. Такие мешалки во время работы засасывают воздух, который затем струями выталкива-

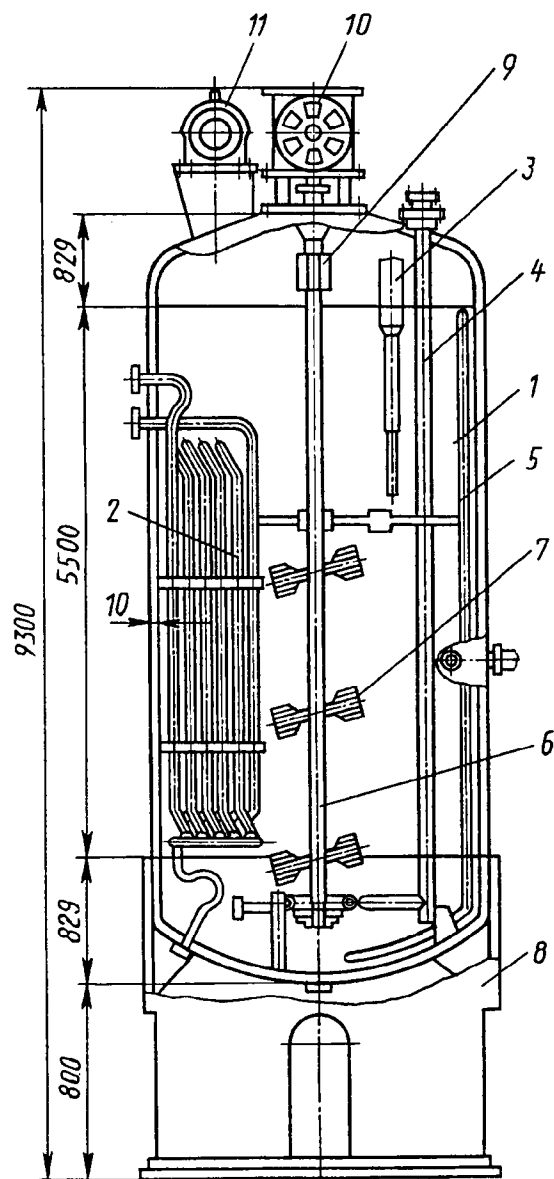


Рис. 65. Ферментер емкостью 50 м³ (по Былинкиной, 1970):

- 1 — корпус аппарата, 2 — теплообменник,
- 3 — гильза для термометра, 4 — барботер,
- 5 — растяжки для центровки вала, 6 — вал мешалки, 7 — лопасть мешалки, 8 — стойка ферментера, 9 — соединительная муфта вала,
- 10 — привод мешалки, 11 — мотор

ется вместе с культуральной жидкостью на поверхность среды. При этом происходит большее растворение кислорода благодаря его лучшему диспергированию в среде.

Поддержание температуры, оптимальной для хорошего роста продуцента антибиотика и проявления им повышенной физиолого-биохимической активности, обеспечивается рубашкой ферментера или системой змеевиков. Змеевики используются также для подачи пара в процессе стерилизации или воды для охлаждения.

Наблюдение за основными процессами жизнедеятельности организма осуществляется контрольно-измерительной аппаратурой, позволяющей поддерживать на заданном уровне температуру внутри ферментера, рН среды, количество пропускаемого воздуха, давление внутри ферментера и другие параметры. Применяются установки, позволяющие автоматически определять

содержание азота в среде в ходе развития организма. Ферментеры снабжены приспособлениями для переноса инокулята, внесения дополнительных питательных веществ, необходимых для лучшего развития продуцента, пеногасителем и устройством для взятия проб. В современных ферментерах контрольно-измерительная аппаратура соединена с компьютером, что позволяет автоматически контролировать весь биосинтетический процесс по заданной программе.

В зависимости от характера работ используют разные типы ферментеров: лабораторные, полупроизводственные, производственные.

Лабораторные ферментеры изготавливаются из стекла или нержавеющей стали и имеют, как правило, емкость не более 30 л. Стерилизуют такие ферментеры обычно в автоклавах. Питательную среду, как правило, стерилизуют отдельно, а затем переносят в стерильный ферментер.

Полупроизводственные ферментеры имеют емкость 100 л, выполнены из нержавеющей стали.

Промышленные ферментеры. В промышленных условиях получения антибиотиков применяют ферментеры различной емкости — от 0,5 до 100 м³.

Стерилизация полупроизводственных и производственных ферментеров, а также всех обслуживающих их коммуникаций осуществляется перегретым паром. Воздух, необходимый для аэрации, стерилизуют путем фильтрации через специальные фильтры, заполненные стеклянной ватой или активированным древесным углем. Использование волокнистых фильтров (типа стеклянной ваты) — широко распространенный и экономически наиболее выгодный механический способ стерилизации воздуха, причем чем меньший диаметр имеют волокна материала, тем лучше их фильтрующая способность.

Интересно, что проникновение в фильтр бактериальных клеток или спор, перемещающихся с воздушным потоком, зависит от скорости движения воздуха. Проникновение усиливается с повышением скорости воздуха и достигает максимума в границах 10–25 см/с (в зависимости от плотности упаковки фильтра); при дальнейшем увеличении скорости движения воздуха проникновение частиц уменьшается.

СТЕРИЛИЗАЦИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Для каждого продуцента антибиотика разрабатывается оптимальная питательная среда. Среда должна соответствовать определенным требованиям: а) обеспечивать максимальный выход

антибиотика, б) состоять из относительно дешевых компонентов, в) иметь хорошую фильтрующую способность и г) обеспечивать применение наиболее экономичных приемов выделения и очистки антибиотиков.

Стерилизация питательных сред в промышленных условиях осуществляется двумя основными методами: периодическим и непрерывным.

Периодический метод стерилизации применяется при использовании небольших объемов среды и состоит в том, что среда нагревается до температуры 120–130 °С непосредственно в ферментерах или в специальных котлах-стерилизаторах, выдерживается при этой температуре в течение 30–60 мин (в зависимости от объема среды и ее состава), после чего охлаждается до 27–30 °С.

За время, затрачиваемое на нагрев среды до температуры, необходимой для стерилизации, и ее охлаждение, в ней уничтожаются микроорганизмы. Известно, что для нагревания до температуры стерилизации больших объемов среды и затем ее охлаждения требуется больше времени, чем для маленьких объемов, поэтому время, затрачиваемое на поддержание наиболее высокой стерилизующей температуры в больших объемах, может быть меньшим, чем для небольших объемов с тем же эффектом стерилизации (табл. 94).

Таблица 94

Длительность экспозиции при наивысшей температуре стерилизации различных объемов среды
(по Deindoerfer, 1957)

Емкость ферментера, л	Длительность экспозиции, мин		Емкость ферментера, л	Длительность экспозиции, мин	
	при температуре 105 °С	при температуре 121 °С		при температуре 105 °С	при температуре 121 °С
230	28,0	17,5	9800	41,3	11,3
980	33,7	12,5	98 000	51,5	8,8

Эффект стерилизации и сохранение термолабильных веществ среды достигаются в том случае, если стерилизацию проводят при более высокой температуре и за более короткое время.

Непрерывный метод стерилизации целесообразно применять при использовании больших объемов среды. Приготовленная среда из специального сосуда с помощью насоса направляется в стерилизационную колонку, через которую пропускают острый пар (давление пара около 50⁵ Па). Пар подают сверху по внутренней трубе, имеющей щелевидные прорезы, благодаря чему он поступает в среду, быстро ее нагревая. Среда в колонку поступает снизу и движется по спирали вокруг внутренней трубы.

Среда, нагретая в колонке до необходимой для стерилизации температуры (около 130 °С), поступает в специальный аппарат, где она выдерживается определенное время при температуре 125–130 °С. Время выдержки зависит от состава среды и длится 5–10 мин. Отсюда стерильная среда подается в змеевиковый холодильник, охлаждается до 30–35 °С (на выходе) и поступает в ферментер.

Непрерывный метод стерилизации имеет ряд преимуществ: возможность автоматического регулирования процесса, быстрый и равномерный нагрев среды, обеспечение более полной стерильности среды и др.

При применении в качестве отдельных компонентов субстрата термолабильных веществ их, как правило, следует стерилизовать отдельно в условиях более мягкого режима.

ПОДГОТОВКА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Подготовка посевного материала — одна из ответственных операций в биотехнологическом цикле получения антибиотиков. От количества и качества посевного материала зависит как развитие микроорганизма в ферментере, так и биосинтез антибиотика. Продуцент антибиотика обычно выращивают на богатых по составу натуральных средах, способных обеспечить наивысшую физиологическую активность микроорганизмов. Подготовка посевного материала — процесс многоступенчатый (рис. 66).

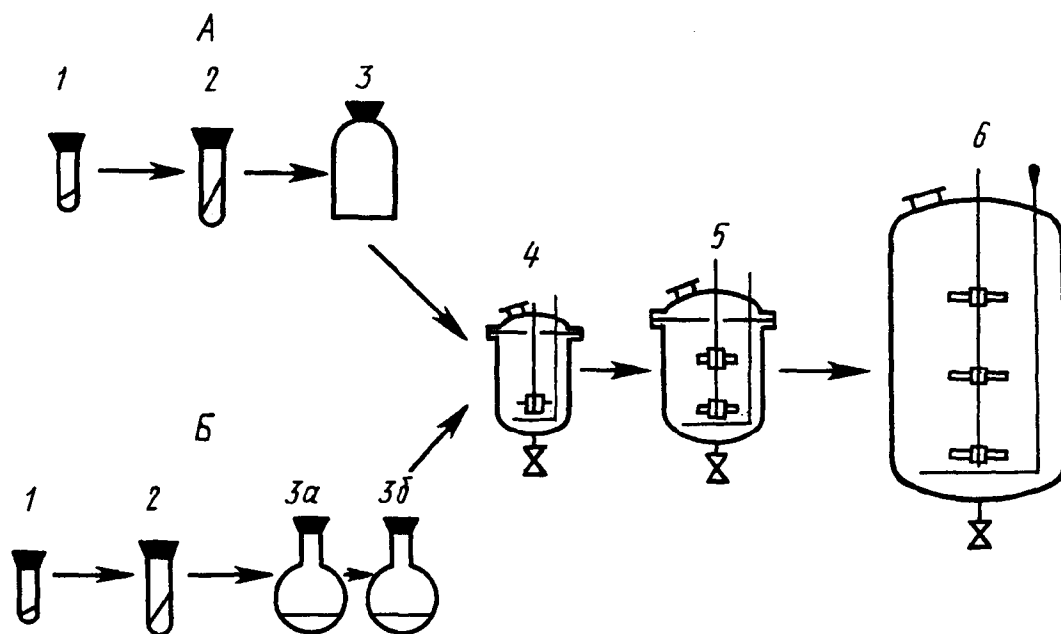


Рис. 66. Схема многоступенчатого приготовления посевного материала. А — выращивание во флаконах, Б — в колбах на качалках (по Herold, 1957):

1 — законсервированный исходный материал, 2 — споровая генерация на косом агаре в пробирке, 3 — II споровая генерация на твердой среде в сосуде Ру, 3а, 3б — I и III генерации на жидкой среде в колбе, 4 — ферментер предварительного инокулирования, 5 — ферментер инокулирования, 6 — основной ферментер

Микроорганизм предварительно выращивают на агаризованной среде в пробирке (рис. 66, 2), затем из пробирки делают высев в колбы с жидкой питательной средой и проводят две генерации при глубинном выращивании на качалках в течение 2–3 сут для каждой генерации (3а, 3б). Из второй генерации культуры в колбе делают посев в небольшой (10 л) инокулятор, после чего хорошо развившуюся культуру переносят в более крупный инокулятор 5 (100–500 л), откуда и делают посев в основной ферментер 6. Для посева в основной ферментер используют от 5 до 10 об. % посевного материала (инокулята). Однако при получении пенициллина споровый материал гриба, приготовленный на отрубях, рисовых зернах или пшене, засевают в инокулятор сразу.

РАЗВИТИЕ ПРОДУЦЕНТА АНТИБИОТИКА В ФЕРМЕНТЕРАХ

Развитие микроорганизма в ферментерах проходит при строгом контроле всех его стадий и очень точном выполнении условий развития. Большое внимание уделяют поддержанию заданной температуры культивирования, активной кислотности среды (рН), степени аэрации и скорости работы мешалки. В процессе развития организма осуществляют биологический контроль, учитывают потребление организмом основных питательных компонентов субстрата (источника углерода, азота, фосфора), внимательно следят за образованием антибиотика. В последнее время все чаще биологический контроль проводят с помощью ЭВМ.

Большое внимание при развитии продуцента в ферментерах обращают на процесс пеногашения. При продувании воздуха через культуру микроорганизма образуется обильная пена, которая существенно нарушает процесс развития продуцента антибиотика в ферментере. Появление большого количества пены обусловлено белковыми веществами, находящимися в среде, и ее высокой вязкостью, что связано с обильным накоплением биомассы.

Для борьбы с пеной в ферментерах используют поверхностно-активные вещества: растительные масла (соевое, подсолнечное), животный жир (лярд, кашалотовый жир), а иногда минеральные масла (вазелиновое, парафиновое), спирты и высшие жирные кислоты. Нередко в качестве пеногасителей используют специально синтезированные вещества (силиконы, diazobutanкарбамил и другие соединения).

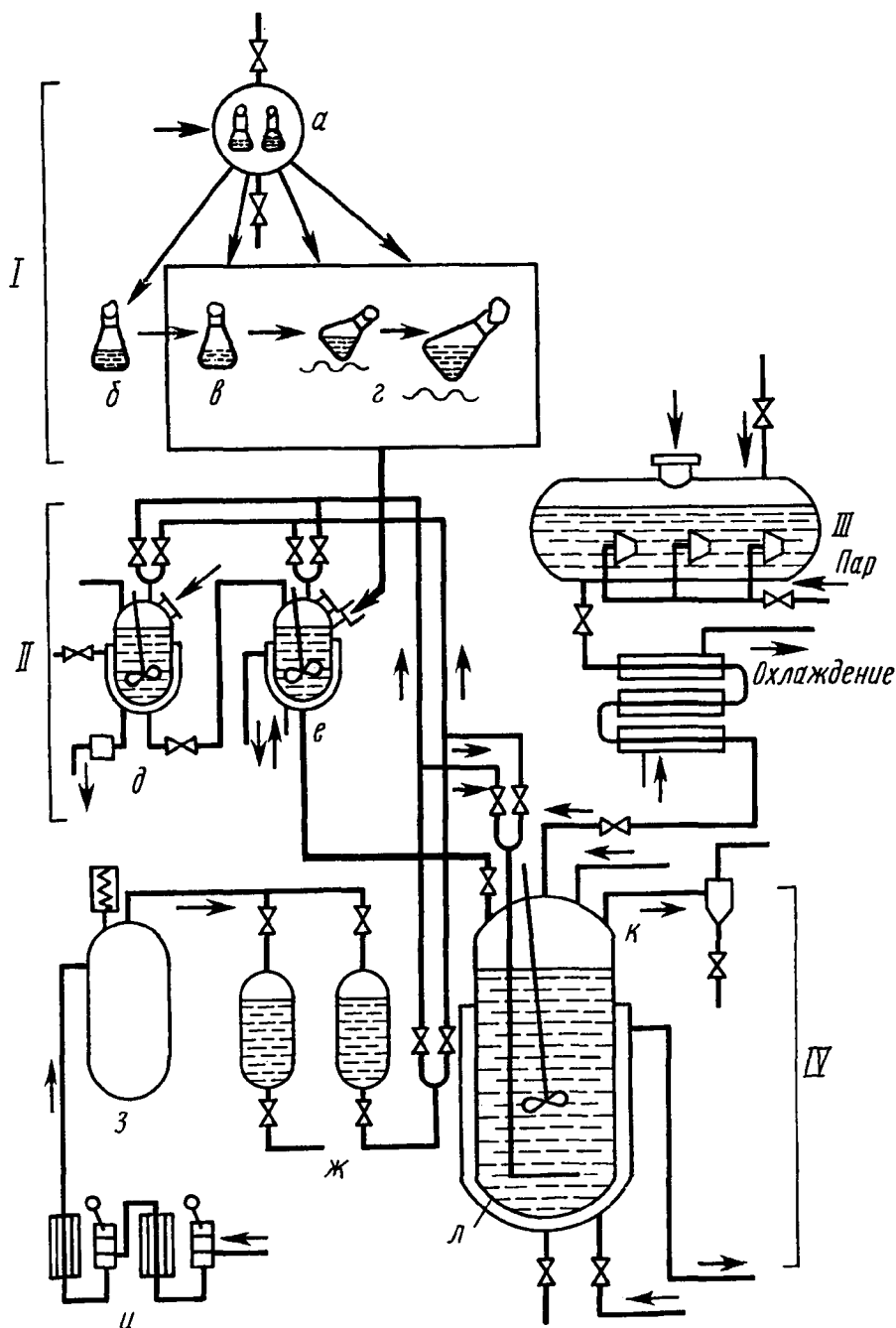
Многие вещества (масла, жиры, спирты и др.), используемые в качестве пеногасителей, потребляются продуцентами антибиотиков как дополнительные источники углеродного питания. При этом часто наблюдается повышение выхода антибиотика. Однако внесение пеногасителя может снижать скорость растворения кислорода, что, в свою очередь, отрицательно сказывается на развитии микроорганизма и его биосинтетической активности.

Иногда используются механические способы пеногашения (отсасывание пены через специальные трубы, разрушение пузырьков пены сильными струями жидкости, пара или газа).

Общая схема производства антибиотиков до стадии выделения и химической очистки представлена на рис. 67.

Рис. 67. Схема производства антибиотиков: I — приготовление посевного материала; II — инокуляторы для наращивания посевного материала; III — стерилизатор среды для большого ферментера, IV — установка для биосинтеза антибиотика (по Kohler, 1956):

a — стерилизация среды в колбах, *б* — охлаждение и посев культуры продуцента в колбу, *в* — рост культуры в покое, *г* — рост культуры в качалке, *д* — инокулятор со стерильной средой, *е* — инокулятор со средой, засеянной культурой продуцента, *ж* — фильтры и компрессор, *з* — резервуар со сжатым воздухом, *и* — нагрев воздуха, *к* — ферментер, *л* — рубашка для охлаждения ферментера



Предварительная обработка культуральной жидкости, выделение и химическая очистка антибиотиков

В процессе развития микроорганизмов образуемые ими антибиотики в большинстве случаев почти полностью выделяются из клеток в окружающую среду. Однако в ряде случаев в культуральную жидкость попадает лишь часть антибиотика, а другая часть сохраняется внутри клеток.

У ряда продуцентов антибиотик почти полностью содержится в клетках организма.

В зависимости от того, где антибиотическое вещество сосредоточено, применяют соответствующие методы его извлечения. Так, если антибиотик находится в культуральной жидкости, его выделяют методами экстракции, используя для этого растворители, не смешивающиеся с жидкой фазой, осаждают в виде нерастворимого соединения или сорбируют ионообменными смолами. Из клеток микроорганизмов антибиотик выделяют с помощью экстракции органическими растворителями. Если антибиотик содержится и в культуральной жидкости, и в клетках продуцента, то сначала антибиотик переводят в фазу, из которой наиболее целесообразно его изолировать. Например, антибиотик, содержащийся в культуральной жидкости, и клетки с антибиотическим веществом переводят в осадок, из которого антибиотик экстрагируют.

Отделение нативного раствора от биомассы и взвешенных частиц проводят методами фильтрации или центрифугирования. Для фильтрации применяют фильтр-пресс, нутч-фильтр, друк-фильтр, центрифуги, сепараторы. Фильтр-прессы употребляют для обработки больших объемов культуральной жидкости. Аппараты состоят из ряда чередующихся плит и рам и фильтрующих перегородок между ними. Процесс фильтрации осуществляется под давлением.

Для фильтрации небольших объемов культуральной жидкости обычно используют нутч-фильтры или друк-фильтры. Первый аппарат работает под вакуумом, а во втором процесс фильтрации осуществляется благодаря поддержанию давления над фильтрующей жидкостью.

Широко распространен и способ центрифугирования. Хорошие результаты получают в том случае, если при правильном выборе скорости подачи жидкости скорость вращения центрифуги достигает 15 000 об/мин. Отделять мицелий или другие взвешенные частицы можно также в сепараторах. При скорости вращения барабана сепаратора 7000–7500 об/мин благодаря центробежной силе твердые частицы устремляются к стенкам барабана

и осаждаются там, а отсепарированная жидкость стремится к центру барабана и поднимается вверх в специальную камеру.

Цель химической очистки — извлечение антибиотика из нативной жидкости или из клеток продуцента, его концентрация и освобождение (собственно очистка) от сопутствующих примесей и в конечном счете получение высокоочищенного препарата, пригодного для соответствующего применения.

В ряде случаев антибиотические вещества под влиянием жестких внешних факторов (повышенная температура, высокая кислотность или щелочность и др.) теряют свои свойства, инактивируются. Поэтому при их выделении и очистке необходимо соблюдать максимум осторожности. Например, полиеновые макролидные антибиотики содержат ряд чувствительных к внешним воздействиям группировок: сопряженные двойные связи, аминосакхара, макролактонное кольцо. Все это делает их нестабильными при выделении и очистке.

Нестабильность названных групп антибиотиков обусловлена, как правило, их термоокислительной инактивацией. Причем начальная стадия инактивации связана с образованием свободных радикалов, пероксидов и некоторых других соединений на стадии выделения и очистки.

Применение антиоксидантов способствует стабилизации полиенов при экстракции их из мицелия.

Основные методы очистки антибиотиков следующие.

Метод экстракции. Нередко для очистки антибиотика от различных примесей его многократно переводят из одного растворителя в другой с предварительным осаждением (кристаллизацией). Такой прием носит название перекристаллизации.

Ионообменная сорбция. Водные растворы антибиотиков, являющихся по химической природе кислотами, основаниями или амфотерными соединениями, пропускают через колонки с соответствующими ионообменными смолами, на которых антибиотики сорбируются, а раствор с частью примесей, имеющих противоположный антибиотику заряд, проходит через колонку. Смолы в зависимости от положительного или отрицательного заряда их ионов называют катионитами или анионитами. Антибиотик (как отрицательно заряженный ион) будет сорбироваться на катионитной смоле, и наоборот. Адсорбированный на смоле антибиотик элюируют (десорбируют), в результате чего получают значительно очищенный и концентрированный препарат. Затем раствор этого препарата можно вновь пропустить через ионообменную смолу, но имеющую противоположный заряд. При этом на смоле осядут примеси, а раствор более очищенного антибиотика пройдет через колонку.

Метод осаждения. Антибиотик связывают с органическими или неорганическими веществами для получения соединения, выпадающего в осадок, последний с помощью фильтров или центрифугирования отделяют от нативного раствора, промывают и в ряде случаев высушивают. Образовавшееся соединение растворяют и антибиотик экстрагируют или вновь осаждают (кристаллизуют).

Одна из стадий химической очистки антибиотиков — концентрирование полученных растворов; достигается это отгонкой большей части растворителя, как правило, в высоком вакууме.

Применяемые методы выделения и химической очистки, а также качество оборудования и используемых реактивов имеют большое значение прежде всего для улучшения качества получаемого антибиотика и увеличения выхода препарата.

Сушка, контроль и расфасовка препарата

После выделения и химической очистки антибиотика его необходимо высушить, т.е. удалить из препарата свободную и связанную воду. Поскольку большинство антибиотиков в той или иной степени термолабильны, для их высушивания применяют методы, не приводящие к потере биологической активности, не изменяющие цвета препарата. На этапе промышленного получения антибиотиков используют следующие методы обезвоживания.

Лиофильная сушка антибиотиков — широко распространенный прием; проводится при сравнительно низких температурах (от -8 до -12 °C).

Высушивание с применением распылительной сушилки — прогрессивный метод при работе с большими количествами антибиотика; раствор антибиотика пневматически распыляется до мельчайших капель в камере с потоком нагретого воздуха. Процесс высушивания антибиотиков занимает несколько секунд. При этом даже термолабильные препараты не меняют свойств.

Метод взвешенного слоя или сушка в вакуум-сушильных шкафах применяется для высушивания зернистых и пастообразных антибиотических препаратов.

Контроль препарата. Готовый антибиотик подвергается тщательному контролю: биологическому и фармакологическому.

При **биологическом контроле** ставится задача выяснения стерильности готового препарата. Для этого обычно используют два метода.

Первый связан с инактивацией антибиотика и высевом его в соответствующую питательную среду. Например, биологический контроль бензилпенициллина и полусинтетических препаратов,

полученных на его основе, проводится следующим образом. В пробирки, содержащие тиогликолевую среду, вносят фермент β -лактамазу в количестве, способном полностью инактивировать пенициллин. Пробирки с ферментом выдерживают 2–3 сут при температуре 37°C для контроля его стерильности, затем в них вносят раствор пенициллина. Пробирки разделяют на две группы: одну выдерживают при 37°C , а другую — при 24°C в течение 5 сут. Ведут ежедневное наблюдение за возможным развитием микроорганизмов.

Второй метод выяснения стерильности антибиотиков определяется тем, что для большинства этих соединений не имеется инактиваторов их биологической активности. Поэтому выявляют устойчивые к изучаемым препаратам формы микроорганизмов и определяют возможное присутствие в таких препаратах чувствительной к ним микрофлоры, для чего раствор антибиотиков пропускают через мембранные фильтры с диаметром пор не более $0,75\ \mu\text{м}$.

Необходимо подчеркнуть, что стерильность готового антибиотика обеспечивается соблюдением стерильных условий работы на всех стадиях процесса развития продуцента, выделения и очистки препарата.

Фармакологический контроль. К антибиотическим веществам, используемым в медицинской практике, в соответствии с Государственной фармакопеей СССР предъявляются очень строгие требования. Каждый новый лекарственный препарат, прежде чем он будет разрешен к практическому применению, должен пройти всесторонние испытания на токсичность, пирогенность и другие свойства, жизненно важные для организма. Препарат изучают на разных видах животных в отношении его острой и хронической токсичности (влияние на кровь, центральную нервную систему, дыхание и т.д.). Показатели острой токсичности — один из критериев качества антибиотического вещества. Устанавливают максимально переносимую дозу (МПД) антибиотика, дозу, вызывающую гибель 50% подопытных животных (LD_{50}), и смертельную дозу (LD_{100}). Только после всестороннего и тщательного изучения препарата он может быть рекомендован к практическому применению.

Расфасовка и упаковка антибиотика — завершающий этап работы. Расфасованный и упакованный антибиотик с указанием показателя биологической активности, даты выпуска и срока годности поступает в продажу.

Обобщая весь многостадийный и многоступенчатый процесс получения антибиотика, можно отметить, что он включает четыре основные стадии.

I стадия — получение соответствующего штамма — продуцента антибиотика, пригодного для промышленного производства.

II стадия непосредственно связана с процессом биосинтеза антибиотика.

III стадия — это процессы выделения и очистки образовавшегося в ходе биосинтеза антибиотика.

IV стадия включает операции, связанные с концентрацией антибиотика, его стабилизацией и получением готового продукта.

Важно подчеркнуть, что на всех стадиях получения антибиотика должна строго соблюдаться технологическая дисциплина, все процессы должны осуществляться только в стерильных условиях.

Строгое соблюдение технологического процесса на II стадии обеспечивает возможность максимального биосинтеза антибиотика и наибольший выход конечного продукта. Особое внимание должно быть обращено на III стадию, связанную с выделением и очисткой антибиотика. При нарушении технологической дисциплины и использовании не соответствующего тем или иным операциям оборудования или его неисправности происходят большие потери антибиотика, которые могут нанести предприятию существенный экономический урон.

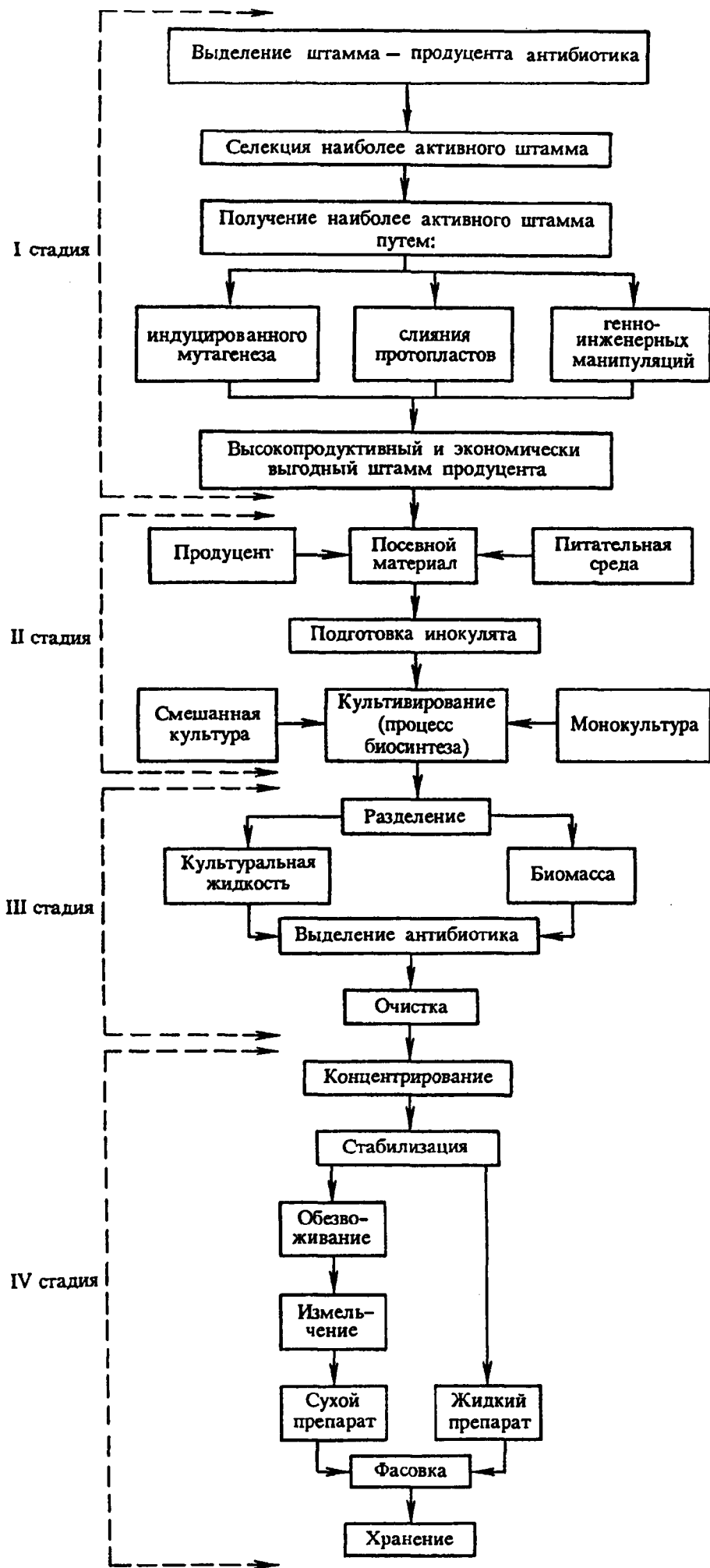
Биотехнологический процесс получения антибиотиков можно представить в виде обобщенной схемы (рис. 68).

Анализируя схему биотехнологического процесса получения антибиотиков, можно заметить, что все четыре основные стадии сохранились с конца 40-х гг. XX в., когда было начато промышленное производство этих биологически активных веществ, до настоящего времени.

Безусловно, на всех этапах производства антибиотиков введены операции и процессы, соответствующие современным достижениям научно-технического прогресса. Так, существенно дополнена I стадия, связанная с получением высокопродуктивных штаммов-продуцентов. Хотя метод индуцированного мутагенеза со ступенчатым отбором начиная с 50-х гг. и до настоящего времени остается основным методом повышения антибиотической активности промышленных штаммов микроорганизмов, но в современных условиях благодаря успехам молекулярной биологии для этих целей стали шире использоваться другие методы, в том числе метод слияния протопластов и метод конструирования микроорганизмов с помощью генно-инженерных манипуляций.

Многие параметры процесса культивирования продуцентов антибиотиков в ферментерах больших объемов контролируются автоматически с выводом показателей на компьютеры.

Совершенствуются методы выделения и очистки антибиотиков.



8. Схема производства антибиотиков в процессе микробного биос

Бактериофагия и ее значение в производстве антибиотиков

В природе широко распространены фаги, вызывающие лизис бактерий, или бактериофаги. Они довольно легко обнаруживаются в разных типах почв. Наибольшее количество их выделяется из черноземной, перегнойной и подзолистой почв.

Впервые явление лизиса стрептомицетов под действием фагов было обнаружено С.Ф. Дмитриевым в 1934 г.; исследователь наблюдал лизис мицелия *Streptomyces bovis* при выращивании его в жидких средах.

Интенсивное изучение бактериофагии началось в связи с промышленным получением антибиотиков, образуемых стрептомицетами. В 1947 г. Ц.З. Рогинская и В.И. Любимов сообщили об обнаружении фага, лизирующего культуру продуцента стрептомицина. Было показано, что фаг, выделенный из *S. griseus*, обладает высокой специфичностью и поражает только продуцент стрептомицина, не лизируя другие штаммы этого вида.

Фаг, вызывающий лизис продуцента стрептомицина, не инактивируется при содержании его в течение часа при температуре 75 °С, но полностью теряет активность в течение 10 мин при нагревании до 100 °С.

Бактериофаги способны лизировать только молодую, активно развивающуюся культуру микроорганизма. Технологический процесс получения антибиотиков весьма благоприятен для развития фагов в случае попадания их в ферментеры. При заражении культуры фагом происходит почти полный лизис мицелия стрептомицета и резкое снижение биосинтеза антибиотика. Лизис стрептомицетов под действием фагов в заводских условиях причиняет значительный материальный ущерб. Фаголизис стрептомицетов — продуцентов антибиотиков наблюдается при промышленном получении стрептомицина, тетрациклинов, эритромицина, новобиоцина. Он может иметь место и при производстве других антибиотических веществ.

Активность фага зависит от особенностей микроорганизма, состава среды культивирования продуцента и стадии процесса развития организма.

Среди разнообразных видов стрептомицетов, выделенных из почв, встречаются культуры, содержащие в себе фаг, т.е. лизогенные. Один из возможных путей попадания фага при производстве антибиотика — занос его самим продуцентом. Лизогенная культура устойчива к носимому ею фагу, поэтому освобождаемый культурой фаг обычно не находит условий для массового размножения. Однако в отдельных случаях из лизогенных куль-

тур стрептомицетов выделяются актинофаги, способные лизировать культуру хозяина. По-видимому, это следствие того, что некоторые симбиотические фаги сравнительно легко изменяют свои литические свойства и становятся вирулентными по отношению к культуре хозяина. Следовательно, создаются условия для массового размножения видоизмененного фага, а это, в свою очередь, способствует накоплению фага в воздухе и на предметах оборудования производственных помещений, что может приводить к заражению фагом ферментеров.

Таким образом, инфицирование фагом может происходить путем внесения фага как одновременно с микроорганизмом (при наличии лизогенных форм), так и на определенных этапах производственного процесса получения антибиотика.

Исходя из изложенного для борьбы с фаговой инфекцией должны применяться следующие меры.

1. Выведение высокоактивных фагоустойчивых штаммов — продуцентов антибиотиков.

2. Борьба с распространением фага в производственных цехах и лабораториях.

3. Защита производственной культуры от фаговой инфекции.

Селекция фагоустойчивых штаммов бактерий основана на том, что под влиянием фагов у микроорганизма может возникнуть множество вариантов с различными свойствами, в том числе и варианты, обладающие фагоустойчивостью.

Метод получения фагоустойчивых штаммов состоит в следующем. На поверхность агаровой пластинки, содержащей фаг, высевают стрептомицет. В этих условиях вырастут лишь отдельные фагоустойчивые колонии. При отборе фагоустойчивых вариантов необходимо иметь в виду, что отдельные формы могут быть лизогенными, т.е. содержать фаг. Такие варианты при всех остальных положительных оценках не могут быть рекомендованы для производственных целей.

Стрептомицеты, устойчивые к одному фагу, часто приобретают устойчивость и к другим фагам. Вместе с тем фаги, лизирующие *S. griseus*, обладают литической активностью и в отношении других видов стрептомицетов.

Большинство фагов, выделенных из почвы, — полифаги, т.е. способны лизировать от 45 до 90% культур стрептомицетов разных видов.

Для борьбы с распространением фага в производственных помещениях рекомендуется систематическая обработка стен, оборудования и пола заводских помещений дезинфицирующими средствами, убивающими фаг (гипохлориды, соли хлорноватистой кислоты и др.). Лизис культуры под действием фага при выращивании стрептомицета в ферментерах можно предотвратить

добавлением к среде цитратов, оксалатов. Защита производственной культуры от фаговой инфекции осуществляется путем тщательной стерилизации сред, аппаратуры, оборудования и коммуникаций, строгого соблюдения стерильности на всех производственных этапах.

Вопросы для самоконтроля

1. Охарактеризуйте основные стадии промышленного получения антибиотиков.
2. Обсудите значение бактериофагии при промышленном производстве антибиотиков.

Глава 14

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ, ПИЩЕВОЙ И КОНСЕРВНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Антибиотики нашли применение не только в медицинской практике, о чем говорилось при рассмотрении отдельных антибиотиков. В настоящей главе будет кратко рассмотрен вопрос о применении этих физиологически активных веществ в растениеводстве, животноводстве, в пищевой и консервной промышленности.

Антибиотики в растениеводстве

Проведено много исследований, посвященных использованию антибиотиков в борьбе с фитопатогенными организмами, наносящими ущерб сельскому хозяйству.

Известно, что заболевания растений вызываются разными группами фитопатогенных организмов: вирусами, бактериями, грибами, простейшими и др. Поражение растений происходит как при развитии в полевых условиях, в садах, так и в теплицах и оранжереях.

Источниками заражения растений фитопатогенными организмами могут быть семена (с наружной и внутренней инфекцией), растительные остатки, посадочный материал (черенки, саженцы, клубни, корнеплоды) и сама почва.

Биологические средства защиты растений по сравнению с химически синтезированными препаратами (пестицидами) экологически более чистые и безвредные. Поэтому им в последнее время отдается предпочтение.

При выборе антибиотика для борьбы с возбудителем заболевания и очагом его распространения, а также способа применения препарата основное внимание обращают не только на биологический эффект, но и на экономическую сторону, и на экологические аспекты. Назначение препарата и метод его применения должны быть экономически выгодны и экологически безвредны.

Основные требования, предъявляемые к антибиотикам, используемым в борьбе с фитопатогенными организмами, сводятся к следующему: 1) антибиотик должен быть активным в отношении возбудителя заболевания, т.е. обладать специфичностью биологического действия; 2) легко проникать в ткани растений; 3) лечебные дозы должны быть безвредными для растения; 4) антибиотик на поверхности и внутри растения должен медленно инактивироваться, но, попадая в почву, легко разлагаться там; 5) обладать биологическим действием внутри тканей растения; 6) не наносить ущерба окружающей среде.

Одно из существенных требований к антибиотикам, применяемым в сельском хозяйстве, то, что они не должны использоваться в медицинской практике во избежание возникновения и распространения резистентных к ним форм микроорганизмов.

Методы использования антибиотиков выбирают в зависимости от вида заболевания (сосудистый вилт, поражение листьев и др.), стадии развития растения, размеров растения, места произрастания и способа посадки. Наиболее широкое применение имеют непосредственная обработка почвы, обрызгивание или опыление антибиотиком наземных частей растений, смачивание семян, корней или других органов растворами антибиотиков и др.

Все приемы использования антибиотиков основаны на том, что препарат, нанесенный на поверхность листьев, ствола (стебля), семян или же внесенный в почву, задерживает рост фитопатогенных организмов, находящихся как на поверхности, так и внутри органов и тканей растения, или убивает эти микроорганизмы.

Антибиотики, нанесенные на наземные части растений или внесенные в почву, проникают в растение через корневую систему, стебель или листья и довольно быстро расходятся по растению. Однако такие антибиотики, как гризеофульвин, распространяются по тканям и органам растения очень медленно.

Попав в растение, антибиотики сохраняются в его тканях сравнительно долго — от 5 до 20 сут.

Внесение антибиотиков в почву. Растворы антибиотиков, внесенные в почву, поглощаются корневой системой растений и через некоторое время в зависимости от вида растения и свойств антибиотика обнаруживаются как в тканях корней, так и в наземных частях.

Данные табл. 95 свидетельствуют о том, что ткани растений могут содержать значительные концентрации антибиотика, поступившего через корневую систему. Такого количества вполне достаточно для задержки роста или подавления развития патогенных форм микробов.

Таблица 95

Поступление из почвы в растения антибиотиков, внесенных извне
(ед. на 1 г ткани)

(по Красильникову, 1961)

Антибиотик	Фасоль		Пшеница		Горох	
	корни	листья	корни	листья	корни	листья
Гризин	20	10	30	10	30	20
Стрептомицин	30	10	20	6	40	20
Хлортетрациклин	—	—	20	4	20	6
Окситетрациклин	—	—	30	10	20	6
Контрольные растения	0	0	0	0	0	0

При погружении корневых систем в растворы антибиотиков уже через 10–20 мин препараты обнаруживаются в различных органах растений. Установлено, что пенициллин накапливается в листьях избирательно. При обработке семян антибиотиками последние быстро проникают в оболочку и зародыш и сохраняются там продолжительное время.

При внесении антибиотиков в почву в целях борьбы с фитопатогенными организмами встречается ряд серьезных препятствий. Прежде всего, в почве эти соединения быстро разрушаются под влиянием продуктов жизнедеятельности почвенных микробов и по другим причинам, а также потребляются почвенными организмами в качестве питательных веществ. Многие антибиотики основной природы необратимо адсорбируются коллоидами почвы, поэтому внесение их непосредственно в почву в ряде случаев может оказаться нерентабельным.

Опрыскивание пораженных растений растворами антибиотиков. Метод может быть использован на протяжении всего периода вегетации таких растений, как фруктовые деревья, овощи и другие сельскохозяйственные культуры. Опрыскивание растений антибиотиками оказывает защитное действие против мучнистой росы огурцов, также его применяют в борьбе с *Xanthomonas juglandis*, вызывающим заболевание грецкого ореха, и с *X. vesicatoria*, поражающим томаты и перец.

Метод опрыскивания — один из наиболее эффективных в борьбе с болезнями растений, возбудители которых развиваются как на поверхности наземных органов, так и в тканях растений.

Опыление пораженных растений антибиотиками. Этот метод также широко применяется в растениеводстве, однако он менее эффективен по сравнению с методами опрыскивания.

Погружение зараженных органов растений в раствор антибиотика. Метод широко распространен, например, в борьбе с поражениями семян, фруктов, клубне- и корнеплодов. Интересные результаты применения этого метода получены при обработке семян хлопчатника для защиты растений от гоммоза, вызываемого *X. malvacearum*.

Метод инъекций, или метод штамбов, используется иногда при лечении отдельных древесных пород. В стволе дерева просверливают отверстие и в него вставляют конец фитиля, а другой конец помещают в раствор антибиотика. По фитилю антибиотик поступает в ткань дерева и распространяется по всему растению. Впервые метод штамбов был предложен И. Шевыревым в 1903 г.

Антибиотики, попадая в ткань растений, действуют не только как бактерициды. Они могут также изменить метаболизм и иммунобиологические свойства растений.

Из большого числа антибиотиков, испытанных в целях применения их для борьбы с различными заболеваниями растений, вызываемыми бактериями и грибами, наибольший эффект наблюдался при использовании гризеофульвина, циклогексамида (актидиона) и некоторых других.

В растениеводстве антибиотики используются в качестве гербицидов, инсектицидов, стимуляторов роста растений. Преимущество антибиотиков как продуктов жизнедеятельности организмов по сравнению с биологически активными препаратами, полученными в результате химического синтеза, состоит в том, что они не загрязняют окружающую среду. В природе антибиотики быстро разлагаются. Вместе с тем возникновение и распространение форм микроорганизмов, резистентных к антибиотическим веществам, требует поиска и подбора для растениеводства таких антибиотиков, которые не применяются в медицинской практике.

В настоящее время для борьбы с фитопатогенными организмами в разных странах применяют разные антибиотические вещества или их сочетания.

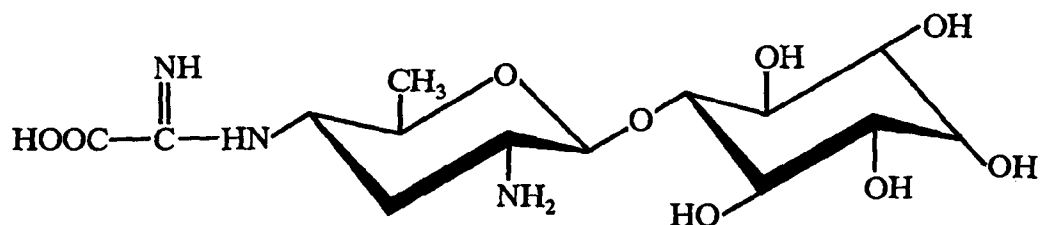
Г р и з е о ф у л ь в и н используется в борьбе против заболеваний растений, вызываемых грибами, и прежде всего *Botrytis*. Антибиотик активен в отношении возбудителей ржавчины, мучнистой росы.

Т р и х о т е ц и н способен подавлять развитие ряда фитопатогенных организмов, в том числе *Botrytis cinerea*, *Helminthosporium*.

Однако в ряде случаев трихотецин не дает положительного эффекта. Так, он не проявляет заметного защитного действия при вертициллезном вилте хлопчатника. Это связано с тем, что фитопатогенные грибы, устойчивые к действию трихотецина, во многих случаях образуют эндогенный фермент трихотециназу, инактивирующий антибиотик. Наиболее сильно свойством инактивировать трихотецин обладают грибы родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*.

Б л а с т и ц и д и н S — антибиотик, образуемый *Streptomyces griseochromogenes*, подавляет рост многих микроорганизмов в концентрации 50–100 мкг/мл. Он оказался эффективным в борьбе с пирикулярриозом — распространенной в Японии опасной грибной болезнью риса, вызываемой *Piricularia oryzae*. Однако этот антибиотик в определенной степени токсичен для человека.

В настоящее время бластицидин в борьбе с пирикулярриозом заменен более эффективным и безвредным для человека к а с у г а м и ц и н о м, продуцируемым *Streptomyces kasugaensis*:



Минимальная концентрация касугамицина, необходимая для подавления гриба *P. oryzae* при рН окружающей среды ниже 6,0, составляет менее 1 мкг/мл, т.е. по сравнению с бластицидином S она ниже в 50–100 раз.

П о л и о к с и н ы — группа, включающая девять антибиотиков. Эти антибиотики имеют своеобразное химическое строение и относятся к пептидилпиримидиннуклеозидным соединениям (см. с. 424). Они обладают противогрибной активностью. Антибиотики подавляют рост фитопатогенных грибов, относящихся к *Alternaria*, *Cochliobolus*, *Piricularia*. Механизм действия полиоксидинов основан на подавлении синтеза хитина клеточной стенки чувствительных грибов.

В а л и д а м и ц и н А образуется *S. hygrosopicus* subsp. *limoneus*. Антибиотик применяется в Японии для борьбы с заболеваниями риса, вызываемыми грибом *Rizoctonia solani*. Валидамицин легко разлагается почвенными микроорганизмами. Время его полураспада в почве — менее 4 ч.

Известна суммарная формула валидамицина: C₂₀H₃₅NO₁₃ · H₂O.

Т е т р а н а к т и н А — антибиотик, образуемый *S. aureus* и накапливающийся в мицелии продуцента. Это антибиотическое вещество принадлежит к классу макротетралидных антибиоти-

ков (см. формулу на с. 282). Тетранактин А обладает специфической активностью в отношении паразитарных паучков и клещей плодовых деревьев. Вместе с тем он очень слабо токсичен для теплокровных животных.

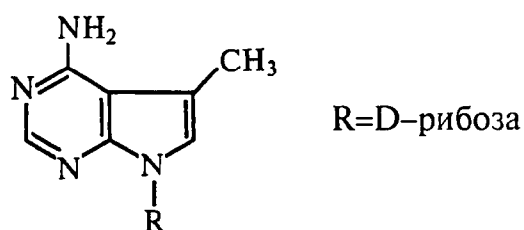
Препарат полунактин, состоящий из смеси макротетралидных антибиотиков, используется в качестве средства для борьбы с клещами.

Турингин — антибиотическое вещество, образуемое *Bacillus thuringiensis*. Это экзотоксин нуклеозидного строения. Он обладает инсектицидной активностью. *B. thuringiensis* вырабатывает также β -экзотоксин, являющийся структурным аналогом АТФ, который может выступать в качестве конкурента АТФ в реакциях за связь с определенным участком на некоторых ферментах. β -Экзотоксин используется в качестве инсектицидного вещества в ряде бактериальных препаратов, например в битоксибациллине.

К антибиотикам, обладающим гербицидной активностью, относятся гербицидины А и В, образуемые *S. saganoensis*. Эти антибиотики подавляют развитие возбудителя болезни риса *X. oryzae*. Гербицидин А инактивирует прорастание семян риса и китайской капусты, обладает избирательной гербицидной активностью в отношении двудольных растений.

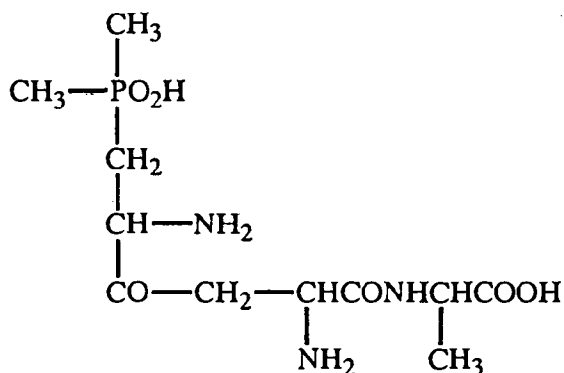
По химическому строению гербицидины А и В относятся к нуклеозидам, а по гербицидной активности близки к тойокаминцину (пирамицин, наритерацин), образуемому культурами *S. toycaensis*, *S. chrestomyceticus*.

Тойокаминцин имеет следующую структуру:



Механизм биологического действия гербицидинов и тойокамина связан с тем, что они, являясь аналогами аденозина, внедряются в полинуклеотиды и образуют физиологически неактивные нуклеиновые кислоты.

В последние годы проявляется значительный интерес к гербициду биалафосу, полученному в начале 80-х гг. японскими исследователями из культуры *Streptomyces hygroscopicus*. По своей структуре этот антибиотик представляет трипептид, состоящий из двух остатков L-аланина и L-глутаминовой кислоты — аналога фосфинотрицина. Ниже приведена структурная формула биалафоса:



Биалафосу посвящено большое число исследований, связанных с изучением путей биосинтеза его молекулы.

Среди антибиотиков, выпускаемых отечественной промышленностью и используемых для борьбы с фитопатогенными микроорганизмами, можно назвать следующие препараты.

Фитобактериомицин, образуемый культурой *S. lavendulae*, штамм 696, относится к группе стрептотрицинов. Подавляет развитие грамположительных и грамотрицательных бактерий и ряда фитопатогенных микроскопических грибов.

Полимицин — антибиотик, принадлежащий к той же группе стрептотрицинов. Впервые выделен Н.К. Соловьевой с сотрудниками в 1960 г. из культуры *S. polymymini*.

Оба антибиотика применяются при обработке семян перед посевом. Семена замачивают в водном растворе, содержащем 0,005–0,01% препарата. Этим же раствором можно опрыскивать растения.

Антибиотики в животноводстве

Антибиотики начали применять в животноводстве вскоре после их открытия. Прежде всего они нашли широкое применение в ветеринарии как лечебные средства против многих заболеваний сельскохозяйственных животных (копытная болезнь оленей, мыт лошадей, рожа поросят, мастит крупного рогатого скота, сибирская язва, пневмония и многие другие).

Антибиотики используют при лечении заболеваний птиц и пчел. Так, для лечения индеек, больных синуситами, применяют стрептомицин, хлорамфеникол, хлортетрациклин, при ларинготрахеите цыплят — карбомицин. Для лечения пчелиных семей, пораженных американским или европейским гнильцом, применяют окситетрациклин, а при ноземе (понос) пчел — фумагиллин.

Среди антибиотиков, используемых в ветеринарии, очень эффективным препаратом оказался **гризеоиридин**, применяемый при лечении маститов у рогатого скота и бронхитов у

цыплят. Метимицин подавляет развитие возбудителя бруцеллеза, но полностью не излечивает его.

Авермектины — новая группа антибиотиков, образуемая стрептомицетом *S. avermitilis*, по строению относится к макроциклическим лактонам. Авермектины обладают способностью подавлять развитие паразитов животных, в том числе нематод.

Моненсин — антибиотическое вещество, образуемое *S. cinnamomensis*, — обладает широким спектром антипротозойной активности. Этот антибиотик наряду с салиномицином, образуемым культурой определенного штамма *S. albus*, применяется при лечении кокцидоза домашней птицы. Его употребляют также в качестве добавок к кормам рогатого скота. Он способствует ускорению роста животных и улучшению использования кормов. Салиномицин обладает также антибиотической активностью в отношении грамположительных бактерий, микобактерий и грибов.

Моненсин и салиномицин относятся к полиэфирным антибиотикам с ионофорными свойствами.

Линкомицин показал хорошие результаты при лечении дизентерии у свиней, а комбинация этого антибиотика со спектиномицином (относится к аминогликозидным антибиотикам) дает положительный эффект при бактериальных инфекциях у собак.

Новобиоцин оказался эффективным средством при лечении птичей холеры индеек.

Намечается применение цефоксазола (полусинтетический цефалоспорин) совместно с бензилпенициллином для лечения мастита у дойных коров.

Антибиотики используются в животноводстве как стимуляторы роста ряда сельскохозяйственных животных и птиц.

Небольшие концентрации антибиотиков, применяемые в качестве добавок к корму животным, не оказывают отрицательного влияния на организм и качество продукции.

Использование антибиотиков в кормлении животных дает положительный эффект в птицеводстве, свиноводстве, при выращивании телят и других сельскохозяйственных животных. Добавление этих веществ к рациону птиц способствует ускорению их роста, снижению отхода молодняка; антибиотики стимулируют яйценоскость и повышают оплодотворяемость птиц. Введение небольшого количества антибиотиков в корм способствует повышению массы тела за период выращивания на 200–250 г на каждого цыпленка и до 350 г на каждого утенка. При использовании антибиотиков в птицеводстве можно заметно увеличить яйценоскость и от 1000 кур получить в год дополнительно 15 тыс. яиц.

Аналогичные результаты отмечаются при использовании антибиотиков в кормлении свиней, телят и других животных. Так, поросята, получавшие с кормом антибиотики, в двухмесячном возрасте весят на 1,5–1,7 кг больше, чем контрольные.

Антибиотик н о р с е о т р и ц и н выделен из культуры *S. noursei* и относится к группе стрептотрицинов. Он используется в качестве кормовой добавки при выращивании свиней и обеспечивает прирост живой массы поросят в пределах 5–15% при снижении затрат корма на 3–5% (Кемнициус и др., 1989).

Применение антибиотиков при откорме свиней способствует получению дополнительно 100–120 ц свинины от каждой тысячи животных.

В качестве стимулятора роста сельскохозяйственных животных используется моненсин. Он понижает образование метана метаногенными бактериями, размножающимися в рубце жвачных животных, в результате чего увеличивается количество летучих кислот, особенно пропионовой, легко и быстро усваиваемых животными.

По данным Е. Липинской (1981), в качестве стимулятора роста молодняка сельскохозяйственных животных можно использовать полипептидный антибиотик н и з и н, образуемый *L. lactis*.

Для сельскохозяйственных нужд организовано производство кормовых антибиотиков на базе отходов (барда) спиртовых заводов с добавкой развара пшеничной муки. Получаемые препараты называются БКВ (биомицин* кормовой витаминизированный).

Вопросам влияния низких концентраций антибиотиков на рост животных посвящено большое число исследований. Однако механизм стимулирующего действия этих веществ до конца не выяснен. По-видимому, стимулирующий эффект низких концентраций антибиотиков на организм животного связан в основном с двумя факторами: 1) с действием на микрофлору кишечника и 2) с непосредственным влиянием на организм животного.

Стимулирующее действие суббактериостатических доз антибиотиков на организм животных, и особенно молодняка, связано со многими факторами. Специфической же особенностью этих физиологически активных веществ следует считать их действие на микробный метаболизм пищевого тракта животных. Но эффективность антибиотиков и других микробных продуктов метаболизма обусловлена особыми веществами роста, или стимуляторами.

Применение антибиотиков в животноводстве неуклонно расширяется. Однако такая тенденция способствует увеличению числа микроорганизмов, несущих множественную антибиотико-

* Биомицин — хлортетрациклин, выпускаемый в СНГ.

резистентность, что, в свою очередь, создает условия для передачи устойчивости микроорганизмов от животных к человеку. Поэтому к проблеме использования антибиотиков в животноводстве следует подходить очень осторожно, учитывая возможные отрицательные последствия.

Антибиотики в пищевой и консервной промышленности

Сохранение скоропортящихся продуктов питания — одна из важнейших проблем пищевой и консервной промышленности. Различные методы сохранения продуктов (консервирование, сквашивание, кипячение, замораживание и охлаждение) применялись человеком издавна. Эти методы широко используются и теперь.

Однако известно, что при кипячении, консервировании, сквашивании и в меньшей мере при охлаждении и замораживании продуктов питания изменяются их полезные свойства, особенно аромат, структура, питательная ценность и др. Порча пищевых продуктов при хранении может вызываться развитием микроорганизмов (мицелиальных грибов, дрожжей, бактерий), действием ферментов и влиянием окислительных процессов, стимулируемых кислородом воздуха.

Наибольшую роль в порче продуктов играют микроорганизмы, выделяющие разнообразные продукты обмена, из которых многие или нарушают качество продуктов, или делают их совершенно непригодными для употребления в результате образования сильных ядов (ботулин и др.). Таким образом, борьба с микроорганизмами, участвующими в порче продуктов питания, — одна из основных задач создания рациональных методов сохранения этих продуктов без изменения их качества и свойств.

Для борьбы с вредной микрофлорой используются разнообразные физические и химические методы. К числу физических методов уничтожения микроорганизмов относятся: термическая обработка (автоклавирование, пастеризация и др.), замораживание, действие ультрафиолетовых и рентгеновских излучений и др. При химических методах борьбы с микробами, вызывающими порчу продуктов, применяются различные бактериостатические или бактерицидные вещества (сернистый ангидрид, бензойная кислота, сорбиновая кислота и др.).

В этом отношении идеальным можно считать соединение, которое в очень низких концентрациях обладало бы мощным биологическим действием, не проявляя токсичности в отношении человека и животных и не вызывая порчи продуктов. Такие свойства присущи некоторым антибиотикам.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ ПРИ КОНСЕРВИРОВАНИИ

Первые сведения об использовании антибиотиков в консервной промышленности относятся к 1943 г. К таким антибиотикам относят субтилин, низин и некоторые другие. Фитонциды высших растений также нередко используются при консервировании ряда продуктов питания.

Антибиотические вещества применяют в консервной промышленности, при сохранении свежего мяса, рыбы и птицы, при хранении сыра и молочных продуктов, фруктов и овощей.

Известно, что при консервировании продуктов питания стерилизация — один из самых важных этапов технологии этого процесса. Продолжительность действия высоких температур при стерилизации зависит от вида продукта и сопутствующей микрофлоры. Под действием термической обработки погибает большинство видов микроорганизмов, но одновременно с этим происходит потеря некоторых ценных свойств продукта: разрушаются витамины, изменяются вкусовые качества и консистенция и т.п.

Применение антибиотиков при консервировании позволяет значительно снизить время термической обработки того или иного продукта. Так, для консервирования овощей предложено использовать субтилин. Применение этого антибиотика дает возможность проводить мягкую термическую обработку. Под действием субтилина гибнут клостридиальные и термофильные бактерии, устойчивые к нагреванию.

Хорошие результаты получены при использовании в консервной промышленности низина — антибиотика, образуемого молочнокислым стрептококком. Этот антибиотик в медицинской практике не употребляется. Его применяют при консервировании томатов, зеленого горошка, цветной капусты, мяса, рыбы, молока, сыров и других продуктов. Низин подавляет развитие ряда термофильных спорообразующих бактерий, не оказывая токсического действия на человека. Применение низина при консервировании позволяет уменьшить продолжительность термической обработки продуктов в 2 раза.

Этот препарат используется также при сохранении алкогольных напитков, и прежде всего пива.

Антибиотические вещества высших растений (лука, моркови, лаврового листа, кориандра, перца красного, можжевельных ягод и др.) значительно снижают количество спор микроорганизмов в консервируемой массе. Использование этих веществ при консервировании мясных и рыбных продуктов, различных овощей способствует уменьшению времени термической обработки и повышает качество продуктов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ ПРИ СОХРАНЕНИИ СВЕЖЕГО МЯСА, РЫБЫ И ПТИЦЫ, А ТАКЖЕ МОЛОКА И МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ

Быстрая порча мясных туш связана с микрофлорой, содержащейся в пищевом тракте животного и попадающей в тушу при разделке ее после убоя или в кровеносную систему и лимфатические узлы в результате использования средств убоя. Для борьбы с нежелательной микрофлорой, попадающей в тушу и вызывающей ее преждевременную порчу, применяют два основных метода: 1) антибиотик добавляют в пищу животному непосредственно перед убоем; 2) антибиотик вводят в кровеносную систему сразу же после того, как животное забито и спущена кровь. Обработка антибиотиками позволяет значительно увеличить срок сохранности свежего мяса (до 2–3 сут) и улучшить его качество.

Микроорганизмы, вызывающие порчу мяса, могут попасть на поверхность туш из воздуха. Поэтому опрыскивание разделанных и охлажденных говяжьих туш раствором антибиотика или обработка антибиотиком брюшной полости свиней также способствует удлинению сроков хранения мяса.

Иногда для упаковки скоропортящихся продуктов применяют пленки и другие материалы, содержащие антибиотики. Это также удлиняет сроки хранения таких продуктов.

Огромное значение для народного хозяйства имеет проблема удлинения сроков хранения свежей рыбы, особенно при промысле в районах, расположенных далеко от берега и баз. Широкое использование для этих целей антибиотиков осуществляется следующими способами.

1. Погружение рыбы на 1–5 мин в морскую воду, содержащую хлортетрациклин в концентрации 5–100 мг/л.

2. Погружение рыбы в охлажденную до 1–1,5 °С морскую воду с содержанием в ней всего 2 мг/л хлортетрациклина.

3. Содержание рыбы на льду, в составе которого имеется хлортетрациклин в концентрации 1–2 мг/л воды.

В производстве и хранении сыров, а также при хранении молока используется антибиотик низин, образуемый различными штаммами молочнокислых стрептококков. Низин обладает узким спектром антимикробного действия, подавляет развитие клостридиальных и других форм бактерий, участвующих в порче сыров.

При пастеризации молочных продуктов, используемых для приготовления сыров, создаются благоприятные условия для развития клостридиев, приводящих к порче сыра в результате образования газа или токсинов.

Применение низина или непосредственно культур, образующих его, предохраняет сыры от преждевременной порчи.

Несмотря на заманчивые перспективы использования антибиотиков в кормлении животных, при сохранении продуктов питания необходимо очень осторожно и внимательно относиться к их применению. Попадание даже незначительных концентраций этих биологически активных веществ с продуктами питания в организм человека может вызвать у него развитие резистентных форм микроорганизмов, что затруднит применение антибиотиков в случае заболевания; кроме того, это может быть причиной возникновения дисбактериозов и аллергических реакций.

При использовании антибиотиков в указанных целях необходимо иметь в виду, что антибиотические вещества, применяемые в медицинской практике, не могут быть включены в число добавок к кормам сельскохозяйственных животных, употребляться в пищевой и консервной промышленности. Это правило введено в нашей стране и в ряде других государств.

Применение антибиотиков в животноводстве, растениеводстве, в пищевой и консервной промышленности должно находиться под строгим и тщательным контролем соответствующих компетентных органов. Специалистам в области сельского хозяйства необходимо иметь элементарные сведения о проблемах, связанных с возникновением форм микроорганизмов, устойчивых к антибиотикам.

Вопросы для самоконтроля

1. Каковы принципы применения антибиотиков в растениеводстве?
2. Каким образом применяются антибиотики в животноводстве?
3. Какие антибиотики применяют в пищевой промышленности?

НЕКОТОРЫЕ ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ В НАУКЕ ОБ АНТИБИОТИКАХ

Экология — это наука о взаимоотношениях организмов друг с другом и со средой их обитания. Каждый организм, а точнее, каждая популяция представляет собой сложную биологическую систему, взаимодействующую с окружающей средой и образующую с ней равновесную систему. Любое вмешательство в эту систему нарушает ее равновесие и часто приводит к необратимым последствиям.

В условиях бурного развития научно-технического прогресса усиливается антропогенное воздействие на экосистемы, в результате чего нарушается природная гармония, сложившаяся тысячами лет, происходят заметные сдвиги в этой системе, создаются условия, приводящие к исчезновению целых видов животных и растений, возникают новые формы микробов, изменяются биохимические функции существующих видов, нарушаются иммунные реакции человека.

Наука об антибиотиках и ее практическое приложение внесли свой негативный вклад в экологическую стабильность. Их воздействие на окружающую среду можно проследить по крайней мере по двум направлениям: промышленное получение антибиотиков и их практическое использование.

Промышленное получение антибиотиков. Как уже отмечалось (см. гл. 13), оно включает четыре основные стадии, каждая из которых должна осуществляться с учетом факторов возможного неблагоприятного воздействия на окружающую среду, на изменение экологического фона.

На первой стадии, связанной с получением высокоактивных штаммов продуцентов антибиотических веществ, широко используются различные химические мутагены, приводящие к изменениям в ДНК микроорганизмов. Среди наиболее активных мутагенов можно назвать соединения, состоящие из бифенильного ядра, в пара-положении которого имеется нитрогруппа. К ним относятся динитрофенантренхинон, тринитрофенантренхинон, тринитробифенол-2-карбоновая кислота и ряд других. Нередко в качестве мутагенов используются этиленмин, нитрозогуанидин, этидий брома, некоторые антибиотики, взаимодействующие с ДНК (актиномицин D, митомицин, дауномицин и др.).

При неосторожной работе с такими препаратами они могут попасть в окружающую среду и вызвать неконтролируемые мута-

ции не только у микроорганизмов, но и у других видов живых существ.

Применение генно-инженерных манипуляций при конструировании различных микроорганизмов — продуцентов антибиотиков — не исключает вероятности попадания этих штаммов в природные условия и их размножения. Хотя возможности развития микробов, полученных генно-инженерным способом, в естественных условиях весьма ограничены, тем не менее при работе с ними должна быть проявлена максимальная осторожность, чтобы полностью исключить их попадание в окружающую среду.

Специалисты, работающие в этой области, несут ответственность за результаты своих экспериментов. Они должны строго соблюдать правила и условия работы и помнить о том, как легко нарушить сложившееся в природе экологическое равновесие.

На стадии биосинтеза антибиотиков возможны случаи заметного вмешательства в окружающую среду. На этом этапе нередко нарушается процесс развития продуцента антибиотика в ферментере, что связано с фаговым заражением культуры, с загрязнением посторонней микрофлорой и другими факторами, в результате чего содержимое ферментера необходимо слить в трап. Здесь недопустима халатность исполнителей указанной операции: *сливать зараженную культуру продуцента в трап можно только после ее предварительной стерилизации*. При нарушении этого основного правила может произойти резкий сдвиг в экологическом равновесии водного бассейна, куда попадет такая культура микроорганизмов в большом количестве.

Серьезные экологические проблемы возникают при промышленном производстве антибиотиков в связи с защитой водоемов от сточных вод, образующихся в большом объеме при биотехнологическом процессе. Основным способом очистки сточных вод и защиты от них естественных водоемов является строительство дорогостоящих специальных очистных сооружений, а также замкнутых систем водооборота.

В ходе биотехнологического процесса получения антибиотиков наиболее загрязненными сточными водами оказываются отработанные нативные растворы, содержащие различные высоко- и низкомолекулярные органические и синтетические неорганические вещества.

Как правило, перед спуском сточных вод в очистные сооружения отработанные нативные растворы подвергают предварительной обработке: ультрафиолетовому облучению с одновременным введением окислителя или фотохимическому окислению, либо используют иные способы, позволяющие осуществить де-

струкцию высокомолекулярных органических соединений с образованием низкомолекулярных веществ, поддающихся биологическому окислению в системе очистных сооружений.

Важную задачу защиты окружающей среды в процессе промышленного получения антибиотиков представляет резкое сокращение выбросов вредных веществ в атмосферу. Решение ее связано с глубокой очисткой дымовых газов и с исключением рассеивания в атмосфере конечного продукта. Последнее касается IV стадии, связанной с проведением операций измельчения антибиотика и его расфасовки.

Более полное и рациональное решение вышеназванных проблем, связанных с защитой окружающей среды при промышленном производстве антибиотиков, должно базироваться на современных принципах разработки биотехнологических производств, основанных на безотходной или хотя бы малоотходной технологии. Это наиболее прогрессивный путь решения экологических проблем в области антибиотикообразования.

Практическое использование антибиотиков. Широкое применение разнообразных по химической природе и спектру антимикробного действия антибиотиков в медицинской практике, сельском хозяйстве и пищевой промышленности сопровождается нарушением микробного экологического равновесия в различных природных очагах и, что особенно существенно, в организме человека. Это может сказаться на нарушении микробного равновесия в полости рта, в кишечнике, микрофлора которого играет огромную роль в обмене веществ. Такие нарушения могут быть связаны с тем, что, во-первых, антибиотические вещества подавляют развитие лишь определенных, чувствительных к ним форм микроорганизмов; во-вторых, массовое практическое использование антибиотиков стимулирует возникновение и распространение в природе атипичных штаммов известных групп микроорганизмов, в той или иной степени резистентных к этим биологически активным соединениям. Для борьбы с возникающими резистентными к антибиотикам формами микроорганизмов в практику вводят все новые антибиотические препараты, а это, в свою очередь, ведет к появлению новых устойчивых форм микроорганизмов. Возникает своеобразный «порочный круг».

Использование на практике значительного числа антибиотических веществ, широкое распространение в природе ксенобиотиков и большого числа химически синтезированных препаратов, применяемых в сельском хозяйстве, вызывает заметные изменения экологического фона, в сфере действия которого находятся уже известные антибиотики. Все это вместе взятое

приводит к изменению реакции организма на вводимый антибиотик (появление аллергических реакций, снижение действия препарата и др.). Указанные явления нельзя не учитывать в практической медицине.

В связи с вышесказанным необходимо детально изучать воздействие антибиотиков на состояние экологических систем как внутри организма человека и животных, так и в окружающей среде. Игнорировать воздействие антибиотических веществ на экологическое равновесие — значит допускать непростительную ошибку по отношению к человеку и к природе в целом.

О с н о в н а я

- Антибиотики* и их продуценты: Сб. ст. М., 1975.
- Гейл И.Ф. и др.* Молекулярные основы действия антибиотиков / Пер. с англ.; под ред. Г.Ф. Гаузе. М., 1975.
- Ланчини Д., Паренти Ф.* Антибиотики / Пер. с англ. М., 1985.
- Производство антибиотиков* / Под ред. С.М. Навашина и др. М., 1970.
- Betina V.* The chemistry and biology of antibiotics. Amsterdam; Oxford; New York, 1983.

Д о п о л н и т е л ь н а я

- Антибиотики-полипептиды* (структура, функция, биосинтез) / Под ред. Н.С. Егорова. М., 1987.
- Баранова И.П., Егоров Н.С., Стоянова Л.Г.* Низин, условия образования и получения препарата: Обзор // Антибиотики и химиотерапия. 1997. Т. 42, № 3. С. 37–46.
- Биотехнология*: Учеб. пособие для вузов: В 8 кн. / Под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. М., 1987.
- Егоров Н.С., Баранова И.П.* Бактериоцины. Образование, свойства, применение: Обзор // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44, № 1. С. 33–40.
- Миронов В.А. и др.* Биосинтез авермектинов: физиологические и технологические аспекты: Обзор // Антибиотики и химиотерапия. 1997. Т. 42, № 3. С. 31–36.
- Навашин С.М.* Отечественному пенициллину 50 лет: история и прогнозы // Антибиотики и химиотерапия. 1994. Т. 39, № 1. С. 3–10.
- Навашин С.М., Фомина И.П.* Рациональная антибиотикотерапия. М., 1982.
- Сазыкин Ю.О.* Антибиотики как биологические реагенты // Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. Т. 20. М., 1984.

- Сазыкин Ю.О., Швец А.К., Иванов В.П.* Механизмы резистентности к макролидам у их продуцентов и эубактерий: Обзор // Антибиотики и химиотерапия. 1998. Т. 43, № 6. С. 32–40.
- Сидоренко С.В.* Перспективы контроля распространения антибиотикорезистентности // Антибиотики и химиотерапия. 1998. Т. 43, № 7. С. 3–6.
- Korzybski T., Kowszyk-Gindifer Z., Kurylowicz W.* Antibiotics (Origin, nature and properties). V. 1–3. Washington, 1978.

- Авермектины 6, 264, **274–275**, 499
- Адриамицин 35, 40, 311, 470
- Азалиды 6, 210
- Азасерин 33, 171, 418, 438, 439, 446, 450
- Азитромицин 270, 453
- Азлоциллин 356
- Азомицин 43
- Азтреонам 377, 378
- Азуроцидин 396
- Актиднон (циклогексамин) 33, 44, 45, 51, 400, 418, 495
- Актиномицетин 11
- Актиномицин 25, 33, 42, 52, 140, 399, 408, 418
- Актиномицин С 34, 35, 402, 418, 439, 447
- Актиномицин D 34, 42, 418, 439, 447, 505
- Актиномицин E 402
- Актиномицины 32, 42, 47, 57, 59, 104, 113, 114, 122, 209, 211, 215, **312–322**, 352, 400, 402–404, 428, 439, 440, 454, 455, 457
- Актинотиоцин 75
- Аламетицин 429, 431, 432
- Аллицин 22, 33, 46, 47, **390–391**, 417
- Альбомицин 28, 33, 72, 78, 149, 417
- Альбоциклин 263, 264
- Амикацин 257, 261, 460, 470
- Амиловорин 211
- Аминогликозиды (аминоциклитолы) 33, 87, 102, 103, 104, 122, 129, 133, 216, 217, 218, 374, 434, 452, 453, 454, 457, 460, 466, 470
- Амоксициллин 356, 362
- Ампициллин 28, 34, 175, 356, 413, 452, 461, 462, 470
- Амфотерицин В 35, 39, 177, **278–279**, 281, 429, 432
- Ангидролиды 6, 271
- Ангидротетрациклин 408
- Анзамицин 288
- Антибиотик К-506 263, 418, 447
- Антибиотики-ионофоры 122
- Антимицин А₁, А₃ 122
- Антимицины 33, 408, 418, 442
- Антрациклины 311, 374, 466, 470
- Аскозин 33, 417
- Аскохлорин 80
- Аспергиллин 387
- Аурантин 69, 74, 114, 403, 404
- Афлатоксины 122
- Ацидомицин (актитиазовая кислота) 33, 418, 446, 447
- Ацидоцин 211
- Бактериоцины 185, 210–211**
- Бацитрацины 28, 33, 34, 42, 75, 89, 93, 95, 107, 108, 121, 122, 181, 184, 185, **195–198**, 204, 208, 212, 328, 400, 405, 412, 417, 418
- Бензилпенициллин 24, 27, 28, 34, 41, 139, 175, 402, 412, 413, 417, 422, 452, 461, 486, 499

- Берберин 22, 390, **391**
 Бета-лактамыные антибиотики
 95, 340, 451, 452, 453, 454, 455,
 461, 466
 Биалафос 497
 Бинан (усниновая кислота) 33,
 388
 Бицикломицин 181
 Бициллин 34
 Бластицидин S 34, 496
 Блеомицин 122, 215, 374, 408,
 440, 441
 Блуензомицин 408
 Боррелидин 433, 434, 446
 Бромтетрациклин 80, 181, 289,
 306, **308–309**, 407
 Брунеомицин 33–35, 418, 447
 Бутирозин 37, 217, 257

Валидомицин А 496
 Валиномицин 33, 181, 212, 418,
 429, 439, 443, 444, 454
 Ванкомицин 33, 34, 74, 122, 281,
 413, 416, 417, 469
 Варистин 46
 Вердамицин 38
 Вернамицин 408
 Вибриоцин 211
 Виомицин 33, 42, 56, 104, 418
 Виридин 181
 Вирусин 162
 Вискозин 31

 Галлидермин 205
 Галловая кислота 31, 45
 Галомицин 285
 Гелиомицин (резистомицин)
 54, 55, 162
 Гентамицины 32, 34, 38, 74, 79,
 133, 175, 177, 217, 258, 259, 261,
 408, 410, 413, 434, 456, 460, 462,
 465, 470
 Гербицидин А, В 497

 Гигромицин 36, 260
 Гликопептиды 460
 Глиотоксин 52, 53, 75, 103, 400
 Госсипол 23, 33, 390, **391**
 Грамицидины 32, 33, 42, 56, 102,
 185–188, 208, 417, 418, 429,
 444, 462
 Грамицидин С (S) 25, 34, 74, 77,
 81, 83, 84, 103, 104, 107–112,
 121, 122, 123, 154, 171, 177, 178,
 184, **188–195**, 208, 212, 213, 281,
 408, 416, 427
 Гранатицин 128
 Гризеин 59, 400
 Гризеовиридин 498
 Гризеофенон А 408
 Гризеофульвин 32, 35, 45, 46,
 181, 340, 374, **381–382**, 408,
 418, 493, 495
 Гризин 494

 Дауномицин 35, 40, 151, **311–**
312, 408, 440, 447, 505
 Дегидроабиковиромицин 408
 Дегидробиотин 446, 447
 Декоицин 33, 418
 Деметилклиндамицин 408, 409
 Деметилтетрациклин 34, 289,
309–310
 Деметилхлортетрациклин 34,
 289, **309–310**, 406
 Деметилцелестицетин 407
 Дескарбамилновобиоцин 25
 Десмикозин 276
 Дестомицины 37
 Дефензин 33, 396
 Дефензин-2 396
 Джозамицин 263
 Диазомицин 446
 Диатретин 46
 Дибекацин 257
 Дигидрострептомицин 36, 246,
 251, 408, 470, 473

- Диклоксациллин 34, 467
 Динактин 282
 Доксициклин 34, 175, 289, **310**
 Доксорубин 35, 470
И
 Изенамицины 264
 Изонобобиоцин 25, 329, 330
 Изотетрациклин 306
 Изохлортетрациклин 306
 Илеумицин 181
 Имипенем 375, 376, 452, 464
 Индолмицин 433
 Интерферон 33, 398
К
 Канамицины 32, 33, 34, 37, 38,
 56, 95, 175, 217, 408, 413, 418,
 434, 462, 465, 470
 Кандицидин 33, 102, 281, 400,
 417
 Кандицин 35, 428
 Карбапенемы 32, 340, 375, 378,
 379, 452, 454, 455, 460
 Карбенициллин 34, 175, 356,
 413, 467
 Карбомицин 28, 34, 56, 140, 262,
 264, **272–273**, 376, 399, 412, 498
 Карминомицин 32, 40, 311
 Карноцин 205
 Касугамицин 496
 Кетолиды 6, 271
 Кетомицин 446
 Клавулановая кислота 32, 87,
 340, 376, 378, 453, 462
 Клиндамицин 408, 464, 470
 Клоксациллин 34, 356
 Койевая кислота 44
 Колистиметат 470
 Колистин 34, 470
 Колиформин 32
 Колицины 32, 33, 211, 418
 Кордицепин 43
 Коумермицины 322, **336–337**,
 374, 442, 460
 Кривомицин 128
 Круцин 33, **397–398**
 Курамицин 79
 Ксилостазин 37
 Курвацин 211
Л
 Лактицин 205
 Лактоцин S 32, 205, 211
 Ланкамицин 264
 Ланкацидины 264, **276–277**
 Лантибиотики 43, 47, 185, 204
 Левомецетин (хлорамфеникол)
 175, 321, 325, 413, 462
 Леворин 35, 90, 93, 134, **280–**
281, 462
 Левористатин 281
 Лейкомицин 34, 264, 408
 Лензитин 33
 Лизоцим **394–395**, 423, 461
 Линкомицин 34, 39, 122, 175,
 374, 406, 409, 460, 470, 499
 Липоцин 211
 Лихениформины 195, 196, 405
 Луридин 162
М
 Майганзин 285
 Макролиды 103, 104, 122, 129,
 140, 262, 264, 265, 283, 352, 374,
 399, 421, 455, 457, 460, 469, 485
 Макротетралиды 262, **281–285**,
 430
 Малинголид 32, 212
 Маннозидострептомицин 36,
 78, 150, 179, 228, 229, 230, 244,
250–251, 400, 401
 Маридомицин 264, 408
 Мегаломицин 263, 264
 Мезлоциллин 356
 Меропенем 375, 376
 Мерсацидин 205
 Метациклин (рондомицин) 34,
 289, **310**
 Метилбиотин 446, 447

- Метилдетиобiotин 446, 447
Метилмицин 33, 39, 263, 264, 265, 418, 499
Метициллин 28, 175, 354, 356, 450, 455
Миамицин 181
Микогептин 39, 90, **279–280**
Микофеноловая кислота 9, 10, 408
Микроцин 205
Миноциклин 289, **310**
Митомицины 33, 35, 41, 122, **312**, 439, 440, 450, 505
Мицерин 450
Мицетин 11, 215
Моеномицин 122
Монактин 282
Моненсин 408, 429, 431, 499, 500
Монобактамы 125, 340, 377, 378, 460
Моноглициновый цефалоспори́н 371, 373
Мономицин 175, 461, 465, 469
Моноциклин 34

Нафциллин 356
Неамин (неомицин А) 408
Небрамицин 37
Неомицин 28, 33, 34, 56, 74, 79, 102, 104, 132, 153, 171, 172, 175, 203, 215, 217, 246, 256, 400, 410, 413, 418, 434, 458, 465, 469, 473
Неомицины 37, 74, **251–256**, 261, 328, 400, 408, 470
Нетилмицин 259, 261, 464
Неутрамицин 264
Нигерицин 429, 431
Низин 32, 95, 107, 112, 113, 122, 184, 408, 417, 500, 502, 503
Низины 75, **205–210**, 400
Никкомицин 181, 417, 424
Нистатин 28, 33, 35, 39, 74, 90, 91, 105, 114, 115, 119, 120, 121, 122, 132, 177, **277–278**, 281, 413, 417, 428, 429, 462
Новобиоцин 25, 28, 32, 33, 34, 46, 74, 86, 90, 95, 96, 114–117, 121, 122, 149, 175, 287, 321, 322, **327–336**, 337, 374, 402, 405, 408, 410, 418, 421, 441, 442, 456, 458, 460, 490, 499
Нокардицины 32, 377
Нонактин 281, 429
Норсеотрицин 500

Оксациллин 28, 34, 175, 354, 356, 450, 461, 467
Окситетрациклин 28, 30, 34, 56, 86, 90, 96, 102, 106, 107, 172, 178, 289, **300–305**, 308, 310, 311, 400, 435, 436, 446, 462, 464, 465, 470, 494, 498
Оксоцефемы 41, 373, 376, 378
Октапентины 200
Олеандомицин 34, 74, 140, 175, 263, 264, 265, **271–272**, 287, 413, 462, 464
Оливановая кислота 375
Оливомицин 33, 35, 418, 447
Олигомицин 33, 39, 40, 122, 418, 428, 443

Паромамин 408
Паромомицин 37, 251, 408
Патулин 33, 54, 381, 418, 443
Патулолиды 263, 264
Педерин **397**
Пенем SCH-29482 374
Пенем SCH-34343 374
Пенемы 374
Пенициллин 7, 10, 22, 24, 25, 58, 59, 141, 146, 150, 151, 160, 161, 181, 186, 263, 272, 276, 287, 300, 326, 328, **341–364**, 365, 366, 367, 368, 374, 397, 411, 415, 416, 447, 448, 450, 451, 456, 458,

- 461, 462, 464, 465, 468, 469, 472,
473, 474, 482, 487, 494
- Пенициллин N (цефалоспорин
N) 365, 366
- Пенициллины 32, 33, 34, 41, 56,
75, 76, 78, 79, 83, 86, 90, 98,
101, 103, 104, 124, 132, 178, 197,
340, 374, 378, 380, 400, 401, 417,
421, 422, 423, 452, 453, 458, 460,
470
- Пеницилловая кислота 10, 44, 54
- Пептидные антибиотики 122
- Пизатин 33
- Пикромицин 263, 264
- Пиоцианаза 10
- Пиоцианин 31, 33, 417, 418
- Пиоцины 211
- Пиперациллин 236
- Пликацетин 44
- Полиены 427, 428
- Полимиксин 34, 42, 47, 56, 103,
175, 181, 184, 411, 458
- Полимиксин В, В₁, В₂ 28, 42,
413, 463, 470
- Полимиксин М 200, 201, 213
- Полимиксины **198–204**, 208,
212, 272, 400, 408, 417, 427, 460,
470
- Полимицин 498
- Полиоксины 32, 417, 424, 496
- Полунактин 497
- Продигиозин 32
- Пропициллин 34
- Протаптины 32
- Пуромицин 33, 43, 208, 408, 418,
438, 445, 446
- Радицикол 35
- Резистомицин (гелиомицин) 54
- Реломицин 264
- Реумицин 35, 443
- Рибостамицин 36, 217, 408
- Римоцидин 102, 400, 428
- Ристомицин 32, 34, 102, 104,
114, 115, 117–120, 122, 175,
405, 413, 469
- Ристоцетин 122
- Рифабутин 287
- Рифамид 287
- Рифамицин А, В, С, D, Е, S, O
40, 178, 470
- Рифамицины 32, 40, 87, 262,
285–288, 374, 413, 421, 456
- Рифампицин 287, 288, 413, 460,
470
- Рицин 392
- Родомицины 400
- Розамицин 32, 263, 264, 413
- Ролитетрациклин 470
- Рубомицин 34, 35, 133, 418
- Саливарцин А 205
- Салиномицин 429, 431, 499
- Саннамицин А, В 461
- Саркомицин 28, 33, 44, 45, 215,
418, 438, 439
- Сарцидин 412
- Селдомицины 38, 217
- Сидеромицины 122
- Сизомицин 32, 38, 259, 260, 408,
413, 460
- Синтомицин 325
- Сиомицин 75
- Скваламин 23, 33, 47, **396**
- Сорбистины 217
- Спектиномицин 408, 460, 496
- Спергуалин 34
- Спинулозин 297
- Спирамицин 34, 153, 263, 264,
265, **273–274**, 408
- Спорарицины 217, 261
- Стрептоварицины 285
- Стрептозотоцин 35
- Стрептококцин А 31, 205
- Стрептомицин 27, 28, 32, 34, 36,
57–59, 74, 78, 79, 83, 86, 87,

- 90, 96, 97, 101, 102, 103, 105, 106, 123, 132, 133, 135, 142, 146, 148–151, 168, 169, 171, 172, 175, 179, 181, 197, 203, 215, 216, **217–250**, 251, 254–256, 259, 261, 263, 272, 282, 287, 300, 328, 400, 401, 408, 410–413, 416, 417, 434, 435, 447, 448, 450, 452, 454, 456, 458, 460, 461, 462, 464, 465, 469, 470, 473, 474, 490, 494, 498
- Стрептомицины 400
- Стрептотрицин 102, 171, 172, 215
- Субтилин 32, 75, 184, 196, 205, 408, 502
- Сульбактамы 41, 378, 453, 462
- Тазобактам 378, 453
- Тамицин 369
- Термофиллин 33
- Тетранактин 282
- Тетранактин А 500
- Тетрациклин 25, 28, 34, 72, 78, 80, 87, 90, 91, 106, 175, 178, 215, 289, 290, 304, **305–308**, 309–311, 400, 406, 407, 418, 435, 436, 461, 462, 464, 473, 474
- Тетрациклины 32, 33, 40, 74, 87, 106, 122, 132, 151, 171, 179, 181, 203, 204, 263, 272, 283, **288–311**, 328, 374, 400, 412, 413, 417, 418, 426, 434, 435, 436, 448, 455, 458, 460, 469, 470, 490
- Тиамфеникол 326
- Тиеномицин 375
- Тилозин 34, 153, 264, 265, **275–276**, 408
- Тиопептин 75
- Тиострептон 75, 457
- Тиротрицин 10, 11, 184, 185
- Тиरोцидин 33, 42, 113, 122, 186, 408, 417, 418
- Тобрамицин 34, 37, 217, 257, 258, 261, 413, 470
- Тойкамицин 408, 497
- Тринактин 282
- Триптантрин 181
- Трихомицин 33, 381, 413, 417, 428
- Трихостатин 46
- Трихотецин 28, 32, 35, 44, 54, 89, 93, 114, 122, 340, **382–384**, 495, 496
- Туберцидин 408
- Туевая кислота 44, 45
- Туникамицин 425
- Турингин 497
- Усниновая кислота (бинан) 33, 388, 418
- Фазеолин 33
- Факторы 1, 2, 3, 4 и 5 7, 38
- Фенетициллин 34
- Феноксиметилпенициллин 34, 402
- Филипин 428
- Фитоалексины 33, **392–393**
- Фитобактериомицин 498
- Фитонциды 389
- Фломоксеф 373
- Флоримицин 74
- Формицин 408, 446
- Фортимицины 32, 34, 38, 74, 217, 260, 261
- Фосфономицины 46, 47, 79
- Фрадицин 175, 253, 400
- Фузидиевая кислота 32, 45, 122, 340, **384–386**, 408
- Фузидин 34, 385, 413, 466
- Фумагиллин 28, 123, 162, 340, **380–381**, 411, 412, 498
- Фумигатин 41, 400
- Фураномицин 433, 434, 446
- Хадацидин 33, 446
- Хетомин 33
- Хинин 390, **391–392**

- Хлорамфеникол 33, 34, 45, 51, 57, 78–80, 102, 103, 106, 122, 140, 171, 172, 181, 203, 208, 210, 215, 322, **323–327**, 328, 374, 406, 408, 412, 418, 434, 436–438, 448, 452–454, 458, 460, 461, 463, 465, 469, 470, 498
- Хлорбиоцин 80
- Хлореллин 33
- Хлоркарцин 80
- Хлормикоризин 80
- Хлортетрациклин 28, 34, 58, 59, 78, 80, 86, 90, 96, 102, 104, 106, 132, 149, 172, 178, 181, 197, 215, **289–300**, 301, 303–310, 335, 400, 406, 407, 411, 435, 436, 457, 458, 463, 474, 494, 498, 500, 503
- Хлортрицин 80
- Целестицетин 407
- Церуленин 178
- Цефазолин 369, 370
- Цефаклор 369, 371
- Цефалексин 34, 369, 370, 413
- Цефалоглицин 34
- Цефалоридин 34, 368, 369, 370, 413
- Цефалотин 34, 368–370
- Цефалоспорин 25, 32, 33, 42, 56, 75, 85, 86, 93, 124, 181, 354, 374, 378, 408, 417, 418, 453, 462, 465, 467, 473
- Цефалоспорины 34, 217, 340, **364–374**, 380, 400, 421, 423, 452, 455, 460
- Цефамандол 369, 370
- Цефамицин А, В, С 152
- Цефамицины 32, 41, 340, 365, 368, 376–378
- Цефемы 340
- Цефепим 369, 370
- Цефетамет 371, 373
- Цефиксим 371, 373
- Цефоксазол 499
- Цефокситин 368–370, 377
- Цефоперазон 369
- Цефотаксим 369–371
- Цефотетан 368, 377
- Цефпиром 369
- Цефпирамид 369
- Цефтазидим 369
- Цефтерам 371, 373
- Цефтизоксим 369
- Цефтриаксон 369, 370
- Цефуроксим 369, 370
- Цефуроксима аксетил 371, 373
- Цианобактерины 212
- Цикламицин 153
- Циклогексамид (актидион) 408, 438
- Циклосерин 33, 34, 74, 180, 417, 418, 421, 422, 446, 470
- Циклоспорин А, В, С, D 263
- Циклоспорины 32, 34, 41, 43, 47, 122, **386–387**, 400, 447
- Циластатин 464
- Циркулины 200
- Цитолизин 205
- Цитолизин LL 205
- Цитринин 25, 44, 54, 387
- Шоудомицин 408**
- Эдеин 33, 418
- Эйронмицин 399
- Экмолин 23, 33, 396, **397–398**
- Эндомицин 33, 102, 417
- Эндомицин В (геликсин В) 428
- Энниатины 429–431
- Энтеромицин 399
- Эпидермин 31, 205
- Эпиланцин К-7 205
- Эритрин 23
- Эритромицин 6, 28, 32–34, 39, 56, 74, 87, 96, 106, 140, 149, 151, 175, 180, 262, 263, 264, **265–**

271, 272, 274, 276, 282, 287, 328,
412, 413, 418, 438, 453, 454, 457,
458, 461, 462, 467, 470, 473, 490
Эритромицин А, В, С 265
Эритромицины 265

Эрлихин 162

Этамицин 181, 212, 408

Эхиномицин 75, 212, 408

Яваницин 41

Предисловие (В.А. Садовничий)	3
Предисловие к шестому изданию	5
Введение	7

Часть 1

**АНТАГОНИЗМ В МИРЕ МИКРООРГАНИЗМОВ
И ОБРАЗОВАНИЕ АНТИБИОТИЧЕСКИХ
ВЕЩЕСТВ**

Глава 1. Антагонизм в мире микроорганизмов	15
Глава 2. Понятие об антибиотиках и их классификация	22
Что такое антибиотики	22
Единицы биологической активности антибиотиков	27
Антибиотическая продуктивность организмов	29
Классификация антибиотиков	30
I. Классификация антибиотиков по биологическому происхождению	31
II. Классификация антибиотиков по механизму биологического действия	33
III. Классификация антибиотиков по спектру биологического действия	34
IV. Классификация антибиотиков по их химическому строению	35
Глава 3. Образование антибиотиков в природе и их биологическая роль	48
Образование антибиотических веществ в естественных условиях развития организмов	48
Биологическая роль антибиотиков в природе	57
Глава 4. Условия культивирования микроорганизмов и их антибиотическая активность	62
Условия, необходимые для проявления микроорганизмами антибиотических свойств при лабораторном культивировании ...	63
Среды для культивирования микроорганизмов	64
Качественная характеристика компонентов среды	68
Источники азота	69
Источники углерода	70
Количественное соотношение источников углерода и азота в среде	71

Источники минерального питания и их роль в развитии микроорганизмов	72
Макроэлементы и их значение в жизнедеятельности микроорганизмов	73
Микроэлементы и их физиологическая роль	77
Роль галогенов в образовании антибиотиков	79
Влияние рН среды	80
Температура	81
Аэрация	82
Совместное культивирование микроорганизмов и его роль в биосинтезе антибиотиков	88
Образование антибиотиков иммобилизованными клетками микроорганизмов	94
Двухфазный характер развития продуцентов ряда антибиотиков	95
Глава 5. Значение антибиотиков в жизнедеятельности организмов, продуцирующих эти биологически активные вещества	100
Общие положения	100
Основные механизмы защиты микроорганизмов от собственных антибиотиков	103
Роль отдельных антибиотиков в жизнедеятельности собственных продуцентов	104
Глава 6. Выделение продуцентов антибиотических веществ и методы определения их биологического действия. Пути повышения антибиотической продуктивности	123
Выделение микроорганизмов, продуцирующих антибиотики	127
Общие положения	127
Основные методы выделения микробов — продуцентов антибиотиков	130
Методы идентификации микроорганизмов — продуцентов антибиотических веществ	134
Методы выделения и очистки антибиотиков	140
Антимикробный спектр и токсичность	141
Лечебные свойства антибиотиков	142
Лабораторный регламент	143
Пути повышения антибиотикообразующей способности микроорганизмов	145
Метод естественной изменчивости микроорганизмов	146
Индукцированный мутагенез и ступенчатый отбор	148
Применение генно-инженерных манипуляций	151
Изучение условий культивирования и сохранения выделенных штаммов продуцентов антибиотиков в активном состоянии	153
Определение антибиотической активности микроорганизмов	155
Методы определения антибиотической активности микроорганизмов, выросших на твердых средах	156

Определение антибиотической активности микроорганизмов при культивировании их в жидких питательных средах	159
Определение антивирусного действия антибиотиков	160
Определение противофаговой активности	161
Определение противоракового действия антибиотиков	162
Методы количественного определения антибиотиков	166
Биологические методы	167
Химические и физико-химические методы	178
Иммунохимические методы	180
Номенклатура антибиотиков	181

Часть II

АНТИБИОТИКИ, ОБРАЗУЕМЫЕ РАЗЛИЧНЫМИ ГРУППАМИ ОРГАНИЗМОВ, УСЛОВИЯ И ПУТИ ИХ БИОСИНТЕЗА, МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ, ПРИМЕНЕНИЕ И ПРОБЛЕМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К НИМ МИКРООРГАНИЗМОВ

Глава 7. Антибиотики, образуемые бактериями	184
Антибиотики, образуемые собственно бактериями	184
Гомопептидные соединения	185
ТИРОТРИЦИН (Tyrothricin)	185
ГРАМИЦИДИНЫ (Gramicidins)	187
Грамицидин С (S)	188
БАЦИТРАЦИНЫ (Bacitracins)	195
Гетеромерные пептиды	198
ПОЛИМИКСИНЫ (Polymyxins)	198
Высокомолекулярные пептиды	204
ЛАНТИБИОТИКИ	204
Низины (Nisins)	205
БАКТЕРИОЦИНЫ (Bacteriocins)	210
Антибиотики цианобактерий	212
Образование D-аминокислот, входящих в состав полипептидных антибиотиков	212
Глава 8. Антибиотики, образуемые актиномицетами	214
Семейство углеводовных антибиотиков	216
Аминогликозидные антибиотики, или аминоциклитолы	216
СТРЕПТОМИЦИН (Streptomycin)	217
Условия образования и биосинтеза стрептомицина	218
Физиолого-биохимические особенности развития <i>Streptomyces griseus</i>	226
Ферментативная деятельность продуцента стрептомицина	227
Изучение путей биосинтеза стрептомицина	230
Промышленное получение стрептомицина	241
Выделение стрептомицина из культуральной жидкости	242

Стабильность стрептомицина	244
Зависимость антибиотической активности стрептомицина от рН среды и ее состава	244
Антибиотические свойства стрептомицина	246
Токсические и лечебные свойства стрептомицина	247
МАННОЗИДОСТРЕПТОМИЦИН (Mannosidostreptomycin)	250
ДИГИДРОСТРЕПТОМИЦИН (Dihydrostreptomycin)	251
НЕОМИЦИНЫ (Neomycins)	252
КАНАМИЦИНЫ (Kanamycins)	256
ТОБРАМИЦИН (Tobramycin)	257
ГЕНТАМИЦИНЫ (Gentamycins)	258
СИЗОМИЦИН (Sisomycin)	259
ФОРТИМИЦИНЫ (Fortimycins)	260
Семейство макроциклических лактонов (лактамов)	262
Макролиды	262
МЕТИМИЦИН (Methymycin)	265
ЭРИТРОМИЦИНЫ (Erythromycins)	265
Условия биосинтеза эритромицина	266
Антимикробный спектр и механизм действия	269
Применение эритромицина	269
Химическая модификация эритромицина	270
ОЛЕАНДОМИЦИН (Oleandomycin)	271
КАРБОМИЦИН (Carbomycin)	272
СПИРАМИЦИН (Spiramycin)	273
АВЕРМЕКТИНЫ (Avermectines)	274
ТИЛОЗИН (Tylosin)	275
ЛАНКАЦИДИНЫ (Lankacidins)	276
Полиены	277
НИСТАТИН (Nystatin)	277
АМФОТЕРИЦИН В (Amphotericin B)	278
МИКОГЕПТИН (Mycogheptin)	279
ЛЕВОРИН (Levorin)	280
Макротетралиды (Macrotetralids)	281
Рифамицины (Rifamycins)	285
Семейство антибиотиков-хинонов	288
Тетрациклины	288
ХЛОРТЕТРАЦИКЛИН (Chlortetracyclin)	289
Условия образования хлортетрациклина	290
Химическое строение хлортетрациклина	293
Биосинтез антибиотика	293
Антибиотические свойства хлортетрациклина	299
Применение хлортетрациклина	300
ОКСИТЕТРАЦИКЛИН (Oxytetracyclin)	300
ТЕТРАЦИКЛИН (Tetracyclin)	305
БРОМТЕТРАЦИКЛИН (Bromtetracyclin)	308
ДЕМЕТИЛХЛОРТЕТРАЦИКЛИН И ДЕМЕТИЛТЕТРАЦИКЛИН (Demethylchlortetracyclin, Demethyltetracyclin)	309
Химическая модификация тетрациклинов	310

Антрациклины	
ДАУНОМИЦИН (Daunomycin)	
МИТОМИЦИНЫ (Mitomycins)	
Семейство аминокислот, пептидов и пептолипидов	
Актиномицины (Actinomycins)	
Образование актиномицинов	
Химическая модификация актиномицинов	
Механизм действия актиномицинов и их практическое использование	
Семейство ароматических антибиотиков	
ХЛОРАМФЕНИКОЛ (Chloramphenicol)	
Химическая природа хлорамфеникола и его синтез	
Пути биосинтеза молекулы хлорамфеникола	
Химическая модификация хлорамфеникола	
Антибиотические свойства хлорамфеникола	
Применение хлорамфеникола	
НОВОБИОЦИН (Novobiocin)	
Антимикробный спектр	
Химическое строение новобиоцина	
Условия образования новобиоцина	
Специфические стимуляторы биосинтеза новобиоцина	
Биохимические изменения в мицелии стрептомицета и в среде в процессе образования новобиоцина	
КОУМЕРМИЦИНЫ (Coumermycins)	

Глава 9. Антибиотики, образуемые грибами и лишайниками

Бета-лактамы антибиотиков	
ПЕНИЦИЛЛИН (Penicillin)	
Условия образования пенициллина	
Химическое строение пенициллина	
Предшественники биосинтеза пенициллина	
Полусинтетический способ получения пенициллинов	
Фазы процесса развития гриба и биосинтеза пенициллина	
Пути биосинтеза молекулы пенициллина	
Выделение пенициллина	
Действие пенициллина на бактерии	
Применение в медицине	
ЦЕФАЛОСПОРИНЫ (Cephalosporins)	
Механизм биосинтеза цефалоспорины	
Полусинтетические аналоги цефалоспорины	
Другие β -лактамы антибиотиков	
Другие грибные не β -лактамы антибиотиков	
ФУМАГИЛЛИН (Fumagillin)	
ГРИЗЕОФУЛЬВИН (Griseofulvin)	
ТРИХОТЕЦИН (Trichothecin)	
ФУЗИДИЕВАЯ КИСЛОТА (Фузидин) (Fusidic acid)	
ЦИКЛОСПОРИНЫ (Cyclosporins)	
Антибиотики, образуемые лишайниками	

Глава 10. Антибиотики, образуемые высшими растениями и животными	389
Антибиотические вещества высших растений	389
АЛЛИЦИН (Allicin)	390
БЕРБЕРИН (Berberin)	391
ГОССИПОЛ (Gossypol)	391
ХИНИН (Chinin)	391
РИЦИН (Ricin)	392
ФИТОАЛЕКСИНЫ	392
Антибиотики животного происхождения	394
ЛИЗОЦИМ (Lysozyme)	394
ДЕФЕНЗИН (Defenzyn) и АЗУРОЦИДИН (Azurocidin)	396
СКВАЛАМИН (Squalamin)	396
ЭКМОЛИН (Ecmolin)	396
ПЕДЕРИН (Pederin)	397
КРУЦИН (Cruzin)	397
ИНТЕРФЕРОН (Interferon)	398
Глава 11. Направленный биосинтез антибиотиков	399
Изменение состава питательной среды	401
Введение специфического ингибитора	406
Использование мутанта исходного штамма	407
Воздействие микроорганизма или его фермента	407
Мутасинтез	409
Глава 12. Характер и механизм биологического действия антибиотиков	412
Общие сведения о действии антибиотиков	412
Поглощение антибиотиков клетками микробов	415
Инактивация сульфгидрильных групп ферментов	417
Основные механизмы биологического действия антибиотиков	417
Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки бактерий	418
Антибиотики, подавляющие синтез клеточной стенки грибов	424
Антибиотики, нарушающие функции мембран	425
Антибиотические вещества, подавляющие синтез белка	432
Антибиотики — ингибиторы синтеза пуринов и пиримидинов	438
Антибиотики, ингибирующие синтез нуклеиновых кислот	439
Антибиотики — ингибиторы энергетического метаболизма	442
Антибиотики — ингибиторы окислительного фосфорилирования	443
Антибиотики-антиметаболиты	444
Антибиотики-иммунодепрессанты	447
Устойчивость микроорганизмов к действию антибиотиков	447
Пути применения антибиотиков, сдерживающих возникновение устойчивых к ним форм микроорганизмов	459
Побочные реакции, возникающие при применении антибиотиков	467

Глава 13. Основные этапы промышленного получения

антибиотиков	472
Общие сведения о производстве антибиотиков	472
Методы культивирования продуцентов антибиотиков	476
Ферментеры	477
Стерилизация питательных сред	479
Подготовка посевного материала	481
Развитие продуцента антибиотика в ферментерах	482
Предварительная обработка культуральной жидкости, выделение и химическая очистка антибиотиков	484
Сушка, контроль и расфасовка препарата	486
Бактериофагия и ее значение в производстве антибиотиков	490

Глава 14. Применение антибиотиков в сельском хозяйстве, пищевой и консервной промышленности.....

Антибиотики в растениеводстве	492
Антибиотики в животноводстве	498
Антибиотики в пищевой и консервной промышленности	501
Использование антибиотиков при консервировании	502
Использование антибиотиков при сохранении свежего мяса, рыбы и птицы, а также молока и молочных продуктов	503

Некоторые экологические проблемы в науке

об антибиотиках	504
Рекомендуемая литература	508
Указатель антибиотиков	511

Учебное издание

ЕГОРОВ НИКОЛАЙ СЕРГЕЕВИЧ
ОСНОВЫ УЧЕНИЯ ОБ АНТИБИОТИКАХ

6-е издание, переработанное и дополненное

Зав. редакцией *Г. С. Савельева*

Редактор *Т. В. Властовская*

Художественный редактор *Ю. М. Добрянская*

Художники *В.А. Чернецов, Н.С. Шувалова*

Технический редактор *З.С. Кондрашова*

Корректор *А. В. Яковлев*

Художественное оформление выполнено
Издательством Московского университета
и издательством “Проспект” по заказу
Московского университета

Подписано в печать 05.08.2004. Формат 60 × 90^{1/16}
Бумага офс. Гарнитура Таймс. Офсетная печать
Усл. печ. л. 33. Уч.-изд. л. 31,98. Тираж 1000 экз.
Заказ № 10592. Изд. № 7063

Ордена “Знак Почета” Издательство Московского
университета

125009, Москва, ул. Б. Никитская, 5/7

Тел.: 229-50-91; факс: 203-66-71

939-33-23 (отдел реализации)

E-mail: kd_mgu@rambler.ru

В Издательстве МГУ работает

служба “КНИГА–ПОЧТОЙ”

Тел.: 229-75-41

Издательство “Наука”

117997, Москва, Профсоюзная ул., 90

E-mail: secret@naukaran.ru

Internet: www.naukaran.ru

ППП “Типография “Наука”

121099, Москва, Шубинский пер., 6