

**А. Х. Хасенова<sup>1</sup>, Ш. Дауренбекова<sup>2</sup>, Т. Ш. Заитова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт микробиологии и вирусологии,  
г. Алматы, Казахстан

<sup>2</sup>Жетысуский государственный университет  
им. И. Жансугурова,  
г. Талдыкорган, Казахстан

## **ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ БИОСИНТЕЗА НОВЫХ ПРИРОДНЫХ АНТИБИОТИКОВ**

---

**Аннотация.** Подбор и оптимизация питательных сред являются важнейшими задачами при культивировании актиномицетов-продуцентов антибиотиков. В процессе поиска новых антибиотиков из почвенных образцов Иле-Балхашского региона отобрано 15 штаммов актиномицетов, показавших высокие антагонистические свойства как в отношении грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Для подбора оптимальных условий биосинтеза новых природных антибиотиков использовали 2 синтетические и 4 органические среды. Антимикробную активность культуральной жидкости и ацетоновых экстрактов из мицелия в отношении тест-микроорганизмов определяли методом диффузии в агар и методом двукратных серийных разведений на питательном бульоне. Среда с соевой мукой А<sub>4</sub> оказалась оптимальной для биосинтеза большинства антибиотиков; органическая среда Ваксмана – для антибиотиков АК9/4, АК7/4, АК11/6. Среда Чапека оптимальна для биосинтеза антибиотиков АТв2/7 и АК11/3; синтетическая среда Красильникова – для биосинтеза антибиотиков АК7/4 и АТв2/7. Для биосинтеза антибиотика АТ3/4 подошли все использованные среды.

**Ключевые слова:** актиномицеты, антибиотики, антагонистические свойства, биосинтез



**Түйіндеме.** Актиномицеттер антибиотик өндірушілердің өсіруі негізгі проблемасы болып табылады, сондықтан қоректы ортаны іріктеу және оңтай-

ландыру ең маңызды мәселе. Жаңа антибиотиктер іздеу кезінде Іле-Балқаш аймағындағы топырақ үлгілерінен бөлініп алынған актиномицеттердин арасынан 15 штам таңдап алынды. Олар грам оң және грам теріс бактерияларға қарсы жоғары антагонистік қасиеттерін көрсетті. Жаңа табиғи антибиотиктер биосинтезі оңтайлы жағдай таңдау үшін 2 синтетикалық және 4 органикалық орта пайдаланылды. Культуралды сұйықтық және мицелийдың ацетон сығындысының тест-микроорганизмдерге қарсы белсенділігі агар блоктар әдісі мен және қоректік сорпа екі еселік жүйелі сұйылтуы арқылы зерттелінді. Соя ұны бар орта көбісі антибиотиктердың биосинтезіне ал Ваксман органикалық ортасы АК9/4, АК7/4, АК11/6 антибиотиктерге лайықты болды. Чапек қоректі орта АТв2/7 и АК11/3 антибиотиктерге, ал Красильниковтың синтетикалық ортасы АК7/4 и АТв2/7 антибиотиктерге оңтайлы болды. АТ3/4 антибиотикке зерттелген орталардың бәрі лайық болды.

**Түйінді сөздер:** актиномицеттер, антибиотиктер, антагонистік қасиеттері, биосинтезі.



**Abstract.** The selection and optimization of nutrient mediums is one of the major problems in the cultivation of actinomycetes-producers of antibiotics. In the process of searching for new antibiotics from soil samples of the Ile-Balkhash region, it was selected 15 strains of actinomycetes showing high antagonistic properties regarding gram-positive and gram-negative bacteria. It was used 2 synthetic and 4 organic mediums for the selection of the optimal conditions of biosynthesis of new natural antibiotics. The antimicrobial activity of culture liquid and the acetone extract from mycelium, regarding the test microorganisms was determined by the agar diffusion method and a two-fold serial dilutions on the nutrient broth. A medium with soy flour ( $A_4$ ) was optimal for the majority of the biosynthesis of antibiotics; organic medium of Waxman for antibiotics АК9/4 АК7/4, АК11/6. Medium of Чапек is optimal for the biosynthesis of antibiotics АТв2/iАК11/4 and АТв2/7. All the used mediums were suited for biosynthesis of the antibiotic АТ3/4.

**Key words:** actinomycetes, antibiotics, antagonistic properties, mediums, biosynthesis.

**Введение.** В настоящее время в медицине все актуальнее становится проблема антибиотикорезистентности возбудителей [1, 2]. Наиболее оптимальным решением этой проблемы является изыскание новых биологически активных веществ среди вторичных метаболитов микробного происхождения. Способность

актиномицетов продуцировать вторичные метаболиты с различными полезными свойствами широко используется в фармакологической промышленности [3, 4]. Большая часть используемых в медицине антибиотиков выделена из культур актиномицетов. Литературные данные о получении из культур актиномицетов новых антибиотических веществ свидетельствуют о том, что их способность к биосинтезу антибиотиков далеко не исчерпана [5-7].

На проявление антибиотических свойств актиномицетов большое влияние оказывают условия культивирования и прежде всего состав питательных сред.

Среды с кукурузным, дрожжевым и мясным экстрактами, соевой мукой и пептоном, в состав которых входят сульфат аммония, карбонат кальция, фосфаты, глюкоза, сахароза, лактоза и другие углеводы, успешно применяются в промышленности и обеспечивают хорошее развитие микроорганизмов с высоким выходом антибиотиков. Многие организмы способны развиваться на относительно простых по составу синтетических средах, обеспечивающих нормальный рост микроорганизма и достаточный уровень биосинтеза антибиотика [8-9].

**Цель данного исследования** – изучение условий биосинтеза новых природных антибиотиков на синтетических и органических питательных средах и подбор оптимальной среды для получения высокоактивных антибиотиков.

**Материалы и методы.** Для подбора оптимальных условий биосинтеза новых природных антибиотиков использовали 2 синтетические и 4 органические среды.

Синтетические среды, г/л:

1 – синтетическая среда Красильникова: глюкоза – 20,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5;  $K_2HPO_4$  – 1,0; NaCl – 0,5;  $KNO_3$  – 1,0;  $CaCO_3$  – 3,0; pH 7,0;

2 – синтетическая среда Ваксмана: глицерин – 30,0;  $K_2HPO_4$  – 1,0;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5; KCl – 0,5;  $FeSO_4 \times 7H_2O$  – 0,01;  $NaNO_3$  – 2,0; pH 7,2-7,4.

Органические среды, г/л:

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

2 – 1 % кукурузная среда: кукурузный экстракт – 10,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 3,5; NaCl – 5,0;  $\text{CaCO}_3$  – 5,0; pH 7,4-7,6.

3 – среда А<sub>4</sub>: соевая мука – 10,0; глюкоза – 10,0; NaCl – 5,0;  $\text{CaCO}_3$  – 1,0; pH 7,2-7,4.

4 – среда Чапека с дрожжевым экстрактом и сахарозой: дрожжевой экстракт – 4,0; сахароза – 15,0;  $\text{NaNO}_3$  – 2,0;  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  – 0,01;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 0,5; пептон – 10,0;  $\text{CaCO}_3$  – 2,0; pH 7,3.

Для накопления антибиотика культуры актиномицетов выращивали на ротационных качалках со скоростью вращения 220 об./мин., в колбах Эрленмейера вместимостью 750 мл в объеме среды 100 мл, при температуре 28 °С в течение 96 ч. Для определения антибиотической активности стерильно отбирали 5 мл культуральной жидкости. Мицелий отделяли центрифугированием при 3000 об./мин. в течение 20 мин., взвешивали и экстрагировали антибиотик ацетоном в соотношении 1:3. Антимикробную активность культуральной жидкости и ацетоновых экстрактов в отношении тест-микроорганизмов – *S. aureus* ИМВ 3316 и *E. coli*. определяли стандартными методами: диффузии в агар и двукратных серийных разведений на питательном бульоне [10].

**Результаты и их обсуждение.** В процессе скрининга штаммов актиномицетов из почвенных образцов Иле-Балхашского региона было выделено в чистую культуру 80 штаммов актиномицетов. Для дальнейшего изучения отобраны следующие штаммы актиномицетов К7/4, Б6/2, К9/4, Тв2/2, К11/6, К9/5, КЗР5, Т6/1, БЗР1, К7/1, К11-3, Тв2/7, Тв7-4, Т6/11, Т3/4, показавшие высокие антагонистические свойства в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий.

В условиях глубокой ферментации продуцента антибиотик может накапливаться как в культуральной жидкости, так и в мицелии, поэтому изучали антибактериальную активность культуральной жидкости и экстрактов из биомассы в отношении тест-микроорганизмов – *S. aureus* ИМВ 3316 и *E. coli*. Полученные данные по биосинтезу природных антибиотиков в культуральной жидкости на разных средах приведены в таблице.

**Антибактериальная активность культуральной жидкости  
и экстрактов из биомассы в отношении тест- микроорганизмов  
– *S. aureus* ИМВ 3316 и *E.coli***

Номер антиби- отика	Среда для фермен- тации антибио- тиков	Диаметр зоны подавления роста, мм				Антибактериальная активность, ед.разведе- ния/мл			
		<i>S. aureus</i> 3316		<i>E.coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>E.coli</i>	
		культу- раль- ная жид- кость	био- масса	культу- раль- ная жид- кость	био- масса	культу- раль- ная жид- кость	био- мас- са	культу- раль- ная жид- кость	био- мас- са
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
А К9/4	1 среда	23±0,1	0	13±0,1	0	1000	0	40	0
	2 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 среда	15±0,1	0	10	0	200	0	10	0
	4 среда	27±0,1	0	13±0,1	0	1000	0	40	0
	5 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
	6 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
А К7/4	1 среда	17±0,1	30±0,1	13±0,1	22±0,1	400	2000	40	800
	2 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 среда	0	0	0	0	25±0,1	0	1000	0
	4 среда	25±0,1	29±0,1	13±0,1	20±0,1	1000	2000	40	800
	5 среда	22±0,1	28±0,1	15±0,1	21±0,1	1000	2000	200	800
	6 среда	20±0,1	25±0,1	10±0,1	20±0,1	800	1000	10	800
АК 11/6	1 среда	39±0,1	35±0,1	15±0,1	30±0,1	8000	2000	200	1000
	2 среда	20±0,1	28±0,1	14±0,1	20±0,1	800	1200	100	1000
	3 среда	10±0,1	20±0,1	0	20±0,1	10	800	0	80
	4 среда	25±0,1	25±0,1	13±0,1	21±0,1	1000	1200	40	40
	5 среда	20±0,1	20±0,1	14±0,1	14±0,1	800	800	100	100
	6 среда	18±0,1	18±0,1	0	15±0,1	400	400	0	0
АБ 6/2	1 среда	38±0,1	30±0,1	27±0,1	22±0,1	8000	2000	1200	1000
	2 среда	14±0,1	18±0,1	10±0,1	10±0,1	200	400	10	10
	3 среда	18±0,1	18±0,1	12±0,1	12±0,1	400	400	20	20
	4 среда	12±0,1	22±0,1	13±0,1	13±0,1	20	1000	40	40
	5 среда	0	15±0,1	0	0	0	40	0	0
	6 среда	0	12±0,1	0	0	0	20	0	0
АТ6/1	1 среда	12±0,1	39±0,1	0	30±0,1	20	8000	0	2000
	2 среда	10±0,1	25±0,1	12±0,1	20±0,1	10	1000	100	800

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	3 среда	12±0,1	23±0,1	0	20±0,1	20	1000	0	800
	4 среда	0	25±0,1	0	21±0,1	0	1000	0	800
	5 среда	0	20±0,1	0	14±0,1	0	800	0	100
	6 среда	0	20±0,1	0	15±0,1	0	800	0	200
A Тв2/2	1 среда	37±0,1	29±0,1	23±0,1	23±0,1	4000	4000	1000	1000
	2 среда	0	22±0,1	0	0	0	0	0	0
	3 среда	15±0,1	0	10	10	200	400	10	10
	4 среда	0	18±0,1	0	0	0	0	0	0
	5 среда	15±0,1	0	10±0,1	10±0,1	200	200	10	10
	6 среда	15±0,1	0	10±0,1	10±0,1	200	200	10	10
A БЗР1	1 среда	25±0,1	30±0,1	15±0,1	15±0,1	1000	2000	200	200
	2 среда	18±0,1	22±0,1	14±0,1	14±0,1	400	1000	200	200
	3 среда	0	0	0	0	0	200	0	0
	4 среда	12±0,1	18±0,1	0	0	20	400	0	0
	5 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
	6 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
AK7/1	1 среда	22±0,1	32±0,1	13±0,1	23±0,1	1000	2000	40	1000
	2 среда	24±0,1	33±0,1	14±0,1	24±0,1	1000	2000	100	1000
	3 среда	20±0,1	29±0,1	10±0,1	20±0,1	800	2000	10	800
	4 среда	12±0,1	18±0,1	10±0,1	15±0,1	20	400	10	200
	5 среда	14±0,1	20±0,1	12±0,1	12±0,1	200	800	20	20
	6 среда	12±0,1	16±0,1	10±0,1	12±0,1	20	400	10	20
A K 11-3	1 среда	22±0,1	25±0,1	18±0,1	20±0,1	1000	1000	400	800
	2 среда	24±0,1	24±0,1	18±0,1	18±0,1	1000	1000	400	400
	3 среда	25±0,1	23±0,1	20±0,1	20±0,1	1000	1000	800	800
	4 среда	12±0,1	14±0,1	10±0,1	10±0,1	20	100	10	10
	5 среда	0	0	27±0,1	25±0,1	0	0	1200	1000
	6 среда	0	0	20±0,1	21±0,1	0	0	800	1000
A KЗР5	1 среда	26±0,1	25±0,1	20±0,1	22±0,1	1000	1000	800	1000
	2 среда	18±0,1	20±0,1	15±0,1	15±0,1	400	800	200	200
	3 среда	15±0,1	15±0,1	12±0,1	14±0,1	200	200	10	80
	4 среда	12±0,1	15±0,1	10±0,1	12±0,1	20	200	10	20
	5 среда	10±0,1	13±0,1	0	0	10	20	0	0
	6 среда	10±0,1	10±0,1	0	0	10	10	0	0
AK 9-5	1 среда	15±0,1	30±0,1	21±0,1	29±0,1	200	2000	800	1200
	2 среда	13±0,1	25±0,1	14±0,1	28±0,1	100	1000	200	2000
	3 среда	12±0,1	22±0,1	11±0,1	21±0,1	20	800	10	800
	4 среда	15±0,1	25±0,1	0	0	200	1000	0	

Окончание таблицы

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	5 среда	0	0	0	0	0	0	0	
	6 среда	0	0	0	0	0	0	0	
АТв2/7	1 среда	20±0,1	32±0,1	13±0,1	23±0,1	800	2000	40	1000
	2 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 среда	25±0,1	35±0,1	15±0,1	25±0,1	1000	4000	200	1000
	4 среда	15±0,1	28±0,1	10±0,1	21±0,1	200	2000	10	800
	5 среда	28±0,1	37±0,1	20±0,1	23±0,1	2000	4000	1000	1000
	6 среда	27±0,1	30±0,1	20±0,1	25±0,1	2000	2000	1000	1000
АТв7/4	1 среда	23±0,1	38±0,1	20±0,1	27±0,1	1000	4000	800	2000
	2 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 среда	20±0,1	35±0,1	15±0,1	25±0,1	800	4000	200	1000
	4 среда	0	0	0	0	0	0	0	0
	5 среда	14±0,1	24±0,1	10±0,1	18±0,1	200	1000	10	400
	6 среда	15±0,1	26±0,1	12±0,1	20±0,1	200	1000	20	800
АТ 6/11	1 среда	27±0,1	39±0,1	23±0,1	29±0,1	1200	8000	1000	2000
	2 среда	20±0,1	35±0,1	20±0,1	27±0,1	800	4000	800	1200
	3 среда	10±0,1	23±0,1	0	0	10	1000	0	0
	4 среда	12±0,1	27±0,1	0	0	20	2000	0	0
	5 среда	15±0,1	30±0,1	11±0,1	18±0,1	200	2000	10	400
	6 среда	13±0,1	23±0,1	0	0	20	1000	0	0
АТ 3/4	1 среда	39±0,1	0	30±0,1	0	8000	0	2000	0
	2 среда	25±0,1	0	20±0,1	0	1000	0	800	0
	3 среда	23±0,1	0	20±0,1	0	1000	0	800	0
	4 среда	25±0,1	0	21±0,1	0	1000	0	800	0
	5 среда	20±0,1	0	14±0,1	0	800	0	100	0
	6 среда	20±0,1	0	15±0,1	0	800	0	200	0

**Примечание:** 1 – среда с соевой мукой;  
 2 – с кукурузным экстрактом,  
 3 – среда Чапека,  
 4 – органическая среда Ваксмана,  
 5 – синтетическая среда Красильникова,  
 6 – синтетическая среда Ваксмана.

Установлено, что наиболее оптимальной для биосинтеза антибиотиков АБ6/2, АТв2/2, АБЗР1, АКЗР5, АК9/5, АТв7/4, АТ6/11, АТ3/4 в культуральной жидкости является среда с соевой мукой

(A<sub>4</sub>); для биосинтеза антибиотиков АК9/4, АК7/4, АК11/6 – органическая среда Ваксмана; для биосинтеза антибиотика АК11-3 – среда Чапека; для биосинтеза антибиотика АТв2/7 – синтетическая среда Красильникова; для биосинтеза антибиотика АК7/1 – среда с кукурузным экстрактом; для биосинтеза антибиотика – АТ6/1 органическая среда Ваксмана и среда с кукурузным экстрактом. Для биосинтеза антибиотиков АК11/6, АК7/1, АКЗР5, АТ6/11, АТ3/4 подходят все использованные среды.

Активность культуральной жидкости изученных штаммов актиномицетов изменялась на жидких средах в пределах от 10 до 8000 ед.разведения/мл (тест-микроорганизмы *S. aureus* 3316 и *E. coli*). Наиболее высокая активность культуральной жидкости в отношении *S. aureus* 3316 наблюдалась при ферментации антибиотиков АТ3/4, АБ6/2 (8000 ед. разведения/мл) и АТв2/2 (4000 ед. разведения/мл) на среде А4.; АТв2/7 – на синтетической среде Красильникова. В отношении *E. coli* наиболее высокую активность в культуральной жидкости проявил антибиотик АТ3/4 (2000 ед. разведения/мл) на среде А4.; на синтетической среде Красильникова высокая активность отмечена у антибиотиков АК11/3 (1200 ед. разведения/мл) и АТв2/7 (1000 ед. разведения/мл).

Для антибиотиков АК9/4 и АТ3/4 накопление активного вещества происходит только в культуральной жидкости. Антибиотики АТв2/2, АК11/6, АБ6/2, АК7/4, АК11/3, АКЗР5 накапливаются как в культуральной жидкости, так и в биомассе. Антибиотики АБЗР1, АК 9-5, АТв7/4, АТ 6/11, АТв2/7, АК7/1, АТ6/1 преимущественно накапливаются в биомассе и имеют активность от 1000 до 8000 ед. разведения/мл. Наиболее высокий уровень накопления в биомассе (8000 ед. разведения/мл экстракта, тест-микроорганизм *S. aureus* ИМВ 3316 установлен для антибиотиков: АТ6/1, АТ6/11 (соевая среда). Антибактериальная активность 4000 ед. разведения/мл экстракта в отношении тест-микроорганизма *S. aureus* 3316 отмечена у антибиотика АТв2/7 на среде Чапека и на синтетической среде Красильникова, у антибиотика АТв7/4 на среде Чапека и на соевой среде. Активность экстрак-

тов из биомассы в отношении *E. coli* была высокой (2000 ед. - разведения/мл) у антибиотиков АТ6/1, АТ6/11, АТв7/4 (соевая среда) и АК 9-5 на среде Чапека.

Таким образом, для биосинтеза 15 антибиотиков подобраны оптимальные среды, обеспечивающие их максимальное накопление. Среда с соевой мукой ( $A_4$ ) является оптимальной для биосинтеза антибиотиков: АБ6/2, АТв2/2, АКЗР5, АБЗР1, АТв7/4, АТ 6/11; органическая среда Ваксмана – для антибиотиков АК9/4, АК7/4, АК11/6. Среда Чапека оптимальна для биосинтеза антибиотиков АТв2/7 и АК11/3; синтетическая среда Красильникова – для биосинтеза антибиотиков АК7/4 и АТв2/7. Для биосинтеза антибиотика АТ3/4 подходят все среды.

### Список литературы

1 Сидоренко С.В. Перекрестная и ассоциированная антибиотикорезистентность грамотрицательных бактерий семейства Enterobacteriaceae, устойчивых к цефалоспори­нам III поколения // Антибиотики и химиотерапия. – 2008. – Т. 53, № 1-2. – С. 10-18.

2 Глумчер Ф.С., Дубров С.А., Кучин Ю.Л. Полирезистентные инфекции: актуальность, определение, механизмы, наиболее распространенные патогены, лечение, профилактика // Наука и практика. – 2014. – № 1(2). – С. 129-149.

3 Sunazuka T., Hirose T., Omura S. Efficient total synthesis of novel bioactive microbial metabolites // Acc. Chem. Res. – 2008. – Vol. 41, № 2. – P. 302-314.

4 Singh S.B., Young K. New antibiotic structures from fermentations // Expert Opin. Ther. Pat. – 2010. – Vol. 20, № 10. – P. 1359-1371.

5 Molinari G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives // Adv. Exp. Med. Biol. – 2009. – Vol. 655, № 7. – P. 13-27.

6 Möller C., Slack M. Impact of new technologies for cellular screening along the drug value chain // Drug Discov. Today. – 2010. – Vol. 1, 5, № 9-10. – P. 384-390.

7 Clardy J, Fischbach M.A, Walsh C.T. New antibiotics from bacterial natural products // Nat. Biotechnol. – 2006. – Vol. 24, № 12. – P. 1541-1550.

8 Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. Питательные среды для медицинской микробиологии. – СПб., 2002. – 80 с.

9 Меджидов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. – М.: Медицина, 2003. – 208 с.

10 Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Наука, 2004. – 528 с.

**А. Х. Хасенова**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник; e-mail: [k.anara@mail.ru](mailto:k.anara@mail.ru)

**Ш. Ж. Дауренбекова**<sup>2</sup>, кандидат биологических наук, доцент кафедры e-mail: [<shdaurenbekova@mail.ru>](mailto:shdaurenbekova@mail.ru)

**Т. Ш. Заитова**, младший научный сотрудник