

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ

Завідувач випускової кафедри

_____ Барановський М.М.

« ____ » _____ 20 ____ р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТРА ЗА
СПЕЦІАЛІЗАЦІЄЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

**Тема: «Удосконалення технології отримання лікарського засобу
Лінкоміцин»**

Виконавець: студент, група ФБ-201Мз Цибуля Сергій Станіславович

(студент, група, прізвище, ім'я, по батькові)

Керівник: к.т.н., доцент Решетняк Людмила Расулівна

(науковий ступінь, вчене звання, прізвище, ім'я, по батькові)

Консультант з розділу «Охорона праці»: _____ Павлиш В. Д.

(підпис) (П.І.Б.)

Консультант з розділу

«Охорона навколишнього середовища»: _____ Фролов В.Ф.

(підпис) (П.І.Б.)

Нормоконтролер: _____ Дразнікова А.В.

(підпис) (П.І.Б.)

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Напрямок (спеціальність) 162, біотехнології та біоінженерія

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач випускової кафедри

_____ Барановський М.М.

« ____ » _____ 20__ р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Цибулі Сергія Станіславовича

1. Тема дипломної роботи: «Удосконалення технології отримання лікарського засобу Лінкоміцин»

2. Термін виконання роботи: з 5 жовтня по 31 грудня

3. Вихідні дані до роботи: літературні джерела,

4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРНИХ ДЖЕРЕЛ; РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ; РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЯ ВИРОБНИЦТВА ЛІНКОМІЦИНУ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

5. Перелік обов'язкового ілюстративного матеріалу: 5 таблиці, 8 рисунків

6. Календарний план-графік

№ з/п	Завдання	Термін виконання	Підпис керівника
1	Узгодження змісту дипломної роботи з керівником	05.10. – 15.10.2020	
2	Підбір літератури та наукових матеріалів за темою дипломної роботи	15.10. – 25.10.2019	
3	Написання основної частини дипломної роботи	25.10. – 27.11.2020	
4	Оформлення дипломної роботи	27.11. – 03.12.2020	
5	Перевірка дипломної роботи керівником	03.12. – 08.12.2020	
6	Виправлення недоліків	08.12. – 10.12.2020	
7	Захист дипломної роботи	24.12.2020	

7. Консультація з окремих розділів:

Назва розділу	Консультант (посада, П.І.Б.)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Охорона праці	Павлиш В.Д.		
Охорона навколишнього середовища	Фролов В.Ф.		

Керівник дипломної роботи _____ Решетняк Л.Р.

(підпис керівника)

(П.І.Б.)

Завдання прийняв до виконання _____ Цибуля С.С.

(підпис студента)

(П.І.Б.)

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Технологія отримання лікарського засобу Лінкоміцину»: 96 с., 49 літературних джерел, 5 таблиці, 8 рисунків.

АНТИБІОТИКИ, ЛІНКОМІЦИН, ФЕРМЕНТАЦІЯ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, КУЛЬТИВУВАННЯ *STREPTOMYCES LINCOLNENSIS*,

Мета дипломної роботи – удосконалити технологію отримання ЛЗ Лінкоміцин

Об'єкт дослідження – процес виготовлення ЛЗ Лінкоміцин.

Предмет дослідження – антибіотик лінкоміцин, продуцент лінкоміцину *Streptomyces lincolnensis*

Методи дослідження – мікробіологічні, біохімічні, технолгічні, біотехнологічні, порівняльний аналіз,

ЗМІСТ

ВСТУП	7
РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД	9
1.1. Загальна характеристика антибіотиків	9
1.2. Класифікація антибіотиків	10
1.3. Характеристика лінкозамідів	12
1.3.1. Будова лінкозамідів	15
1.3.2. Властивості лінкозамідів	16
1.4. Властивості лікарського засобу лінкоміцину	17
1.5. Висновки до розділу	26
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	27
2.1. Матеріали для дослідження	27
2.1.1. Склад середовища	27
2.1.2. Характеристика середовища для культивування	28
2.1.3. Ферментер для культивування лінкоміцину	31
2.1.4. Характеристика продуцента лінкоміцину	34
2.2. Методи отримання ліноміцину	40
2.2.1. Технологія промислового виробництва лінкоміцину	40
2.2.2. Засів середовища.	45
2.2.3. Обробка і фільтрація культуральної рідини	51
2.3. Визначення антимікробної активності лінкоміцину	53
2.4. Визначення лінкоміцину в організмі людини	59
2.5. Визначення лінкоміцину в повітрі робочої зони	60
2.6. Висновки до розділу	62
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	63
3.1. Результати дослідження середовищ культивування	63
3.2. Удосконалена технологічна схема виробництва антибіотику лінкоміцину	67
3.3. Показники АФІ Лінкоміцин по фармацев статті	69
3.4. Висновки до розділу	70

РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ	71
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при отриманні антибіотику лінкоміцину	71
4.2. Технічні та організаційні заходи, що зменшують рівень впливу на працівника небезпечних та шкідливих виробничих факторів на виробництві антибіотику лінкоміцину	74
4.2.1. Розрахунок вентиляції виробничого приміщення в цеху по виробництву антибіотику лінкоміцину	76
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки на виробництві антибіотику лінкоміцину	78
4.4. Висновки до розділу	80
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА	82
5.1. Вплив виробництва антибіотиків на навколишнє середовище	82
5.2. Вплив антибіотиків на живі організми	84
5.3. Рекомендації щодо зниження негативного впливу виробництва антибіотиків на живі організми та навколишнє середовище	86
5.3.1. Зниження негативного впливу антибіотиків на живі організми	86
5.3.2. Зниження негативного впливу виробництва антибіотиків на навколишнє середовище	88
5.4. Висновки до розділу	90
ВИСНОВКИ	91
СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	92

ВСТУП

Актуальність. Не зважаючи на теперішній розвиток медицини, потреба в антибактеріальних препаратах зростає з кожним роком. Одним із вже традиційних антибіотиків є лінкоміцин.

Лінкоміцин – природний антибіотик з групи лінкозамідів, що у терапевтичних дозах діє бактеріостатично, при більш високих дозах має бактерицидну дію. Чутливими до дії лінкоміцину є грампозитивні мікроорганізми: аеробні – стафілококи, стрептококи, в тому числі пневмококи, а також анаеробні неспороутворюючі мікроорганізми – клостридії, пептококи, пептострептококи, фузобактерії, пропіонобактерії.

Не дивлячись на те, що лінкоміцин застосовується для медичних цілей більше п'ятдесяти років, попит на нього залишається стабільно високим. Лінкоміцин назначають при інфекціях кісток, суглобів (остеомієліти, септичні артрити); інфекціях верхніх та нижніх дихальних шляхів; гнійних інфекції шкіри та м'яких тканин, тощо. Крім того лінкоміцин використовують як антибіотик резерву при інфекціях, що викликані мікроорганізмами, що є резистентними до пеніциліну та деяких інших антибіотиків. Враховуючи вище сказане, дослідження технології виробництва лінкоміцину є надзвичайно актуальним на сьогоднішній день.

Мета роботи: удосконалити технологію одержання антибіотика лінкоміцину.

Завдання на виконання дипломної роботи:

- Розглянути властивості антибіотика лінкоміцин.
- Підібрати активний продуцент для отримання лінкоміцину.
- Підібрати оптимальне поживне середовище для основного процесу ферментації при отриманні антибіотика лінкоміцину.

Предмет дослідження: біологічний агент, поживне середовище.

Об'єкт дослідження: технологія виробництва антибіотику лінкоміцину.

Як відомо, виробництво лікарських препаратів - особлива галузь промисловості. Вимоги до якості продукції особливо високі, тому що від цього залежить безпека і ефективність препаратів, а отже, здоров'я і безпека кожного пацієнта і суспільства в цілому. Особливо високі вимоги пред'являються до виробництва лікарських засобів для парентерального застосування, зокрема антибіотиків. Крім того, проблема раціональної і економічно виправданою антибіотикотерапії є однією з ключових в сучасній медицині [1].

В останні десятиліття у світовому фармацевтичному співтоваристві утвердилася думка (зафіксована в ряді документів Всесвітньої організації охорони здоров'я та Європейського Союзу), що дотримання вимог GMP при виробництві лікарських засобів є необхідною умовою для того, щоб вважати лікарський засіб якісним і безпечним .

Саме тому випуск сучасних антибіотиків відповідно до вимог GMP ЄС став пріоритетним і стратегічно важливим напрямком діяльності лідерів вітчизняної фармацевтичної індустрії.

Антибіотики (грец. $\alpha\upsilon\tau\iota$ –проти, грец. $\beta\iota\omicron\tau\iota\kappa\omicron\varsigma$ – життєвий), органічні речовини, що синтезуються мікроорганізмами в природі для захисту від інтервенції інших видів мікроорганізмів, та володіють здатністю пригнічувати розвиток, або вбивати ці мікроорганізми. Вони поділяють на класи згідно з хімічною структурою: пеніциліни, цефалоспорини, тетрацикліни, антрацикліни, аміноглікозиди, макролідні антибіотики тощо.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Загальна характеристика антибіотиків

Термін «антибіотик» запропонував в 1942 р. З.А. Ваксман для позначення речовини, що була утворена мікроорганізмом і має антимікробну дію. Пізніше безліч дослідників пропонували свої формулювання назви, вкладаючи у неї або занадто обмежений зміст або надмірно розширюючи це поняття.

На даний час під антибіотиками розуміють хіміотерапевтичні речовини, отримані з мікроорганізмів чи інших природних джерел, і їх напівсинтетичні аналоги і похідні, що мають здатність вибірково пригнічувати в організмі хворого збудників захворювань, або затримувати розвиток злоякісних новоутворень [2].

Розрізняють два основних типи дії антибіотиків на бактерії: бактеріостатичний і бактерицидний. Антибіотики з бактеріостатичним ефектом не дозволяють бактеріям розмножуватися. Антибіотики з бактерицидним ефектом призводять до загибелі бактерій.

Кожна група антибіотиків ефективна проти певних типів бактерій, що пов'язано з різними механізмами дії цих ліків.

Антибіотики природного походження продукуються різноманітними групами мікроорганізмів (найчастіше актиномицетами, рідше бактеріями), нижчими рослинами (дріжджами, водоростями, плісневими грибами, вищими грибами), вищими рослинами і тваринами організмами. Наприклад, представники *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Diplocococcus*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Proteus* синтезують нізин, дипломіцин, продигіозин, коліформін. Бактерії роду *Bacillus* утворюють граміцидини, субтілін, полі міксини [2].

Антибіотики, утворені мікроорганізмами, які належать до роду Actinomycetales - стрептоміцин, тетрацикліни, новобіоцин, актиноміцини та інших.

Антибіотики, утворені недосконалими грибами: пеніцилін - *Penic. Chrysogenum*; гризеофульвін - *Penic. Griseofulnum*; трихоцетин - *Tricholecium roseum*.

Антибіотики, що утворюються грибами, які належать до класів базидіоміцетів і аскоміцетів: термофіллін, лезитин, хетомін.

Лишайники, водорості і нижчі рослини здатні утворювати уснинову кислоту і хлореллін, вищі рослини – алміцин, рафанін.

Антибіотики тваринного походження: лізоцим, екмолін, круцин, інтерферон. [1, 3].

1.2. Класифікація антибіотиків

Антибіотики класифікують за різними ознаками:

За хімічним складом:

- Лактамні (група пеніциліну, цефа-лоспорину, монобактами, карбапенеми).
- Антибіотики-макроліди і азаліди (еритроміцин, олеандоміцину фосфат, спірамі-цин, рокситроміцин, азитроміцин, клари-троміцин).
- Група тетрацикліну (тетрацикліну гідрохлорид, метацикліну гідрохлорид, доксицикліну гідрохлорид).
- Група левоміцетину (левоміцетин, левоміцетину стеарат, левоміцетину сукци-нат).
- Аміноглікозиди (стрептоміцину, нео-міцину, гентаміцину сульфат, канаміцин, мономіцин, амікоцину сульфат, тобраміцин, сизоміцину сульфат).
- Поліпептиди (граміцидин С, поліміксини, бацитрацин).
- Глікопептиди (ванкоміцин, ристоміцин).
- Полієни (амфотерицин, амфоглюкамін, ністатин, леворин).

- Анзаміцини (рифампіцин, рифаміцин).
- Похідні кислоти аурелової (олівоміцин, мітоміцин).
- Препарати стероїдної структури (фузидин-натрій).
- Лінкозаміди (лінкоміцину гідрохлорид).
- Похідні антрацикліну (рубоміцину, доксорубіцину, ідарубіцину гідрохлорид).

- Антибіотики різних груп (фузафунгін) [4].

За походженням:

- Плісняві гриби (пеніциліни, цефало-рідини та ін.).
- Променисті гриби (стрептоміцин, левоміцетин, тетрациклін).
- Бактерії (граміцидин).
- Рослини (новоіманін).

За спектром протимікробної дії:

- Переважно на грампозитивні бактерії (пеніциліни, макроліди).
- Переважно на грамнегативні бактерії (поліміксини).
- Широкого спектра дії (тетрацикліни, левоміцетини; напівсинтетичні пеніциліни – ампіцилін та ін., цефалоспорини, аміноглікозиди, напівсинтетичні макроліди, азаліди – рокситроміцин, азтреонам та ін.).

За переважним механізмом дії:

- Порушують синтез оболонки мікробної клітини:
- блокують активність ферментів: транспептидази, карбоксипептидази, що призводить до припинення полімеризації пептидоглікану;

гальмують входження в мономерипептидоглікану одного із елементів (ристоміцину сульфат, ванкоміцин) [5].

Вибіркової дії:

- протимікозні (ністатин, леворин, амфотерицин,);
- протипухлинні (рубоміцину гідрохлорид, блеоміцин).

Порушують функцію клітинної оболонки (мембрани):

- взаємодіють із білково-ліпідними комплексами, викликають дезорганізацію структури (ністатин, амфотерицин);
- порушують проникність низькомолекулярних речовин (поліміксин).
- порушують синтез білка (тетрацикліни, левоміцетини).

Порушують синтез нуклеїнових кислот:

- порушують синтез РНК на рівні РНК-полімерази (рифампіцин, рифаміцин);
- порушують синтез ДНК на рівні ДНК-матриці (рубоміцину гідрохлорид, брунеоміцин).

Пригнічують тканинне дихання мікроорганізмів (кислота уснінова).

Механізм дії антибіотиків складний, вони порушують різні сторони метаболізму. Так, стрептоміцин порушує окремі фази вуглеводного обміну; левоміцетин пригнічує активність ферментів типу естераз; тетрациклін вступає у процеси комплексоутворення з йонами магнію та кальцію.

У деяких антибіотиків переважає бактерицидна дія пеніциліни, аміноглікозиди; у інших бактериостатична тетрацикліни, левоміцетин, [6].

1.3. Характеристика Лінкозамідів

Лінкозаміди - клас антибіотиків, до якого входять природний антибіотик лінкоміцин та його напівсинтетичний аналог (хлороване похідне) кліндаміцин.

За механізмом дії обидва препарати пригнічують синтез білків мікробної клітини шляхом зв'язування 50S-субодиниць рибосом, гальмування включення транспортної РНК до комплексів рибосома-іРНК. Внаслідок цього розвивається бактериостатичний ефект. При підвищенні концентрації лінкозамідів проявляють бактерицидну дію відносно стафіло-, стрептококів та анаеробів.

Лінкозаміди мають постантибіотичний ефект відносно чутливих мікроорганізмів, що, ймовірно, пов'язано з їхньою тривалою фіксацією на рибосомах мікробних клітин. Під дією цих антибіотиків полегшується фагоцитоз і внутрішньоклітинне знищення бактерій, зменшується продукція бактеріальних

ендотоксинів, чим запобігається розвиток ендотоксичного шоку. Спектр дії лінкозамідів широкий. Вони чинять дію на грампозитивні коки та палички (метицилінчутливі стафіло-, стрепто-, пневмококи, дифтерійні палички), анаероби (бактероїди, включаючи клостридії, фузобактерії). При цьому особливо активним є кліндаміцин. Препарати слабо впливають на грамнегативні коки (менінго-, гонококи), деякі штами гемофільних паличок і мікоплазми. До спектра дії кліндаміцину додатково входять токсоплазми та малярійні плазмідії, рідше - штами пневмоцист. Крім того, у кліндаміцину активність у відношенні бактероїдів у 5–8 разів вища порівняно з лінкоміцином. Вторинна резистентність мікроорганізмів до Лінкозамідів. розвивається досить повільно. Лінкозамід. вводять в/м, в/в і внутрішньо. Вони добре всмоктуються в ШКТ (біодоступність лінкоміцину становить 30–50%, кліндаміцину – близько 90%), стійкі до дії хлористоводневої кислоти шлункового соку [7].

Їжа зменшує біодоступність лінкоміцину до 5%, але не впливає на всмоктування кліндаміцину. Лінкозаміди проникають у всі рідини та тканини організму, створюють високі концентрації в осередках запалення та деструкції, не проходять крізь гематоенцефалічний бар'єр. Лінкоміцин і, особливо, кліндаміцин мають здатність активно транспортуватись у поліморфноядерні лейкоцити і макрофаги. При цьому внутрішньоклітинна концентрація кліндаміцину перевищує позаклітинну в 40 разів. Метаболізуються препарати в основному в печінці, виводяться нирками. При порушеннях функції нирок і печінки дозу препаратів слід зменшувати. Лінкозаміди – це альтернативні, частіше резервні антибіотики. Клінічне застосування Лінкозамідів, насамперед, визначається їх активністю при інфекційних процесах, викликаних змішаною аеробно-анаеробною флорою, стафілококами, в тому числі деякими метицилінорезистентними штамми, анаеробною флорою, яка продукує β -лактамази [8].

Лінкозаміди показані при процесах, спричинених анаеробними мікроорганізмами, які часто бувають збудниками госпітальних (внутрішньолікарняних) інфекцій. У цих випадках препарати застосовують у

комбінаціях з іншими антибактеріальними засобами. Вони показані при анаеробних інфекціях, викликаних пеніцилінорезистентними мікроорганізмами, ородентальному сепсисі, рецидивуючих тонзилофарингіті, середньому отиті, синуситі, при аспіраційній пневмонії та абсцесах легень, емпіємі плеври, внутрішньоабдомінальному сепсисі, септичному артриті, септичному ендокардиті, остеомієліті та інфекційних захворюваннях жіночої статеві сфери (які не передаються статевим шляхом і викликаються анаеробними мікроорганізмами, стійкими до пеніциліну), при стафілококових інфекціях кісток і суглобів, інфекціях шкіри і м'яких тканин, тяжкій формі вугрового висипу. У разі, якщо характер і локалізація інфекції свідчать про високу ймовірність грамнегативної флори (хронічний середній отит, абдомінальний сепсис, проникні поранення черевної порожнини), лінкозаміди необхідно комбінувати з азтреонамом чи аміноглікозидами. Препарат кліндаміцин застосовують також при токсоплазмозі (разом із піриметаміном), тропічній малярії, спричиненій хлорохінорезистентними штамми *P. falciparum* (разом із хініном). Лінкозаміди – малотоксичні препарати. Однак при накопиченні та неправильному застосуванні лінкозамідів (особливо кліндаміцин) можуть викликати такі ускладнення:

- гепатотоксичність (підвищення трансаміназної активності крові);
- гематотоксичність (нейтропенія, тромбоцитопенія, еозинофілія);
- псевдомембранозний коліт, що спричиняється дисбіоценозом і часто має тяжкий перебіг;
- диспепсія (нудота, блювання, діарея – частіше лінкоміцин), пов'язана з подразливою дією препаратів на слизову оболонку кишечника;
- алергічні реакції (висип, свербіж, почервоніння шкіри).

При швидкому введенні лінкоміцину, можливий нервово-м'язовий блок з ослабленням і зупинкою дихання, розлади серцево-судинної системи (падіння артеріального тиску, аритмія із зупинкою серця), тромбофлебіт. Лінкозаміди протипоказані у період вагітності, годування грудьми, при нейроінфекціях, захворюваннях ШКТ (в анамнезі), зокрема неспецифічному виразковому коліті,

хворобі Крона, ентериті, алергії на Лінкозаміди. Обережно призначають немовлятам і людям похилого віку. Комбіноване застосування лінкозамідів можливе з бензилпеніциліном, антисиньогнійними цефалоспоринами, азтреонамом, аміноглікозидами, фторхінолонами, рифампіцином, телітроміцином. Комбінування лінкозамідів з β -лактамами, рифампіцином, аміноглікозидами можна здійснювати при емпіричній терапії легеневого абсцесу, деструктивної (некротизуючої) пневмонії, інтраабдомінальних і гінекологічних інфекційних процесів. Синергізм проявляється при поєднанні лінкозамідів із цефтазидимом (відносно аеробно-анаеробної флори), примахіном (відносно *P. carinii*), піриметаміном або телітроміцином (відносно токсоплазм), хлорохіном (відносно малярійного плазмодія), кетолідами (при енцефаліті, викликаному токсоплазмою).

Не бажано поєднувати лінкозаміди з макролідами та хлорамфеніколом, оскільки вони мають подібні механізми дії. Також слід мати на увазі, що перехресна резистентність до лінкозамідів розповсюджується й на макроліди. Крім того, між ними виникає конкуренція за зв'язок з білками плазми крові, при цьому зменшується антибактеріальна дія лінкозамідів. Останні не можна призначати одночасно з препаратами, що порушують нервово-м'язову передачу (міорелаксантами, аміноглікозидами, препаратами магнію тощо), з препаратами для наркозу, наркотичними анальгетиками, антигіпертензивними препаратами (блокаторами α - та β -адренорецепторів, інгібіторами АПФ) та діуретиками, оскільки підвищується ризик пригнічення дихання та різкого зниження АТ. Протипроносні препарати, які містять каолін та аттапульгіт, можуть суттєво гальмувати всмоктування лінкозамідів у ШКТ. Тому інтервал між їх прийомом має становити не менше 4 год [9].

1.3.1. Будова Лінкозамідів

Лінкозаміди структурно відрізняються від інших груп антибіотиків. Вони є похідними 1-пропілгідренової кислоти та восьмивуглецевого аміноцукру - метилтіолінкозаміну. Два основні компоненти пов'язані амідним зв'язком. Структурні формули лінкоміцині та кліндаміцину наведені у Рис.1.1. та Рис.1.2.

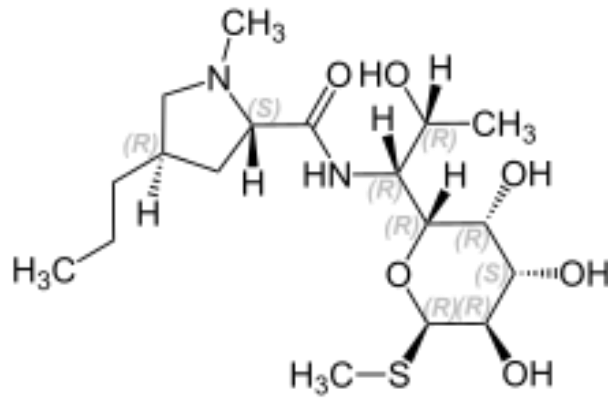


Рис.1.1. Структурна формула лінкоміцину

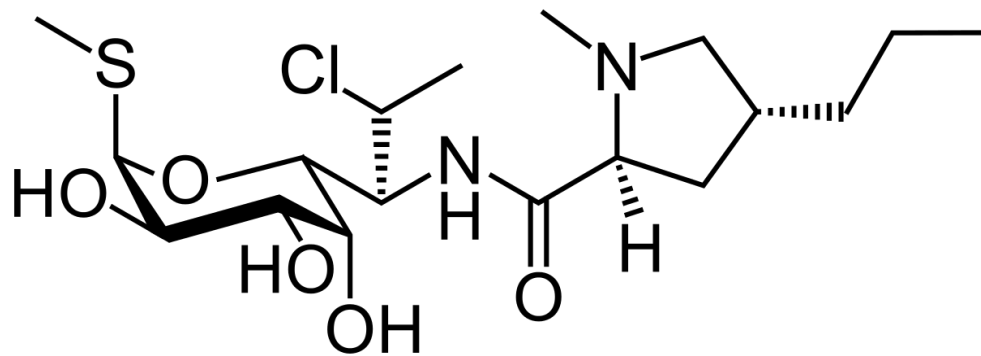


Рис.1.2. Структурна формула кліндаміцину

1.3.2. Властивості Лінкозамідів

Лінкозаміди діють бактеріостатично, порушуючи синтез білка в бактеріальних клітинах. Лінкоміцин застосовується перорально і парентерально. Препарат має обмежений спектр антибактеріальної дії. До лінкоміцину чутливими є стафілококи, стрептококи, в тому числі пневмококи, а також анаеробні мікроорганізми – клостридії, пептококи, пептострептококи, фузобактерії, пропіонобактерії, *Bacteroides*, *Actinomyces*. Хоча *in vitro* лінкоміцин малоактивний до шигел, в просвіті кишечника ефективність антибіотика значно збільшується у зв'язку з дуже високою концентрацією препарату (3000-7000 мкг/г випорожнень). До препарату нечутливі більшість грамнегативних аеробних мікроорганізмів.

1.4. Властивості ЛЗ лінкоміцину

Фармакодинаміка

Чутливість. Залежно від чутливості збудника та концентрації антибіотика лінкоміцин може зумовлювати як бактерицидну, так і бактериостатичну дію.

У таблиці 1.1. наведені значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІС), отримані з джерел літератури. Поширеність резистентності може змінюватися з часом та залежно від регіону.

Таблиця 1.1
Значення мінімальної інгібуючої концентрації (МІС)

Мікроорганізм	Значення МІС (мг/л)
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5–2
<i>Streptococcus pyogenes</i>	0,05–1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	0,1–1
(<i>Enterococcus faecalis</i> *)	2-резистентний (МІС >64 мг/л)*)
(<i>Haemophilus influenzae</i> *)	4–16*)
(<i>Neisseria spp.</i> *)	8–64*)
<i>Escherichia coli</i>	Резистентний (МІС >64 мг/л)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Резистентний (МІС >64 мг/л)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Резистентний (МІС >64 мг/л)
<i>Bacteroides fragilis</i>	2–4

*Лінкоміцин неактивний проти *H. influenzae*, ентерококів та видів роду *Neisseria*.

In vitro спостерігали феномен перехресної резистентності за дисоційованим типом між кліндаміцином та лінкоміцином, з одного боку, та антибіотиками макролідної групи (еритроміцин, кларитроміцин, азитроміцин) – з іншого. Між лінкоміцином та кліндаміцином існує абсолютна перехресна резистентність. У дослідженнях *in vitro* та *in vivo* не спостерігався швидкий розвиток резистентності. У стафілококів резистентність до лінкоміцину або кліндаміцину *in vitro* розвивається поступово. Дослідження свідчать про відсутність спільних антигенних властивостей у лінкоміцину та пеніцилінів.

Фармакокінетика:

Всмоктування. При пероральному прийомі натще всмоктується 25–30% препарату. При пероральному прийомі 500 мг лінкоміцину у сироватці крові становить приблизно 3 мкг/мл та досягається через 2–4 год після застосування. Якщо лінкоміцин приймати з їжею, цей показник знижується приблизно на 50%. Після перорального прийому терапевтична концентрація препарату у крові зберігається протягом 6–8 год для найбільш чутливих грампозитивних збудників.

Розподіл. На основі опублікованих досліджень встановлено, що зв'язування препарату з білками у плазмі крові має насичувальний характер, тобто частка зв'язаного препарату знижується зі зростанням концентрації препарату в сироватці крові.

Концентрація препарату у крові плода, перитонеальній та плевральній рідині може сягати 25–50% концентрації у крові, у грудному молоці – 50–100%, у кістковій тканині – приблизно 40%, а у м'яких тканинах – 75% від концентрації у крові.

Водночас лінкоміцин повільно проникає у спинномозковий ліквор (1–18% концентрації у крові). При менінгіті спостерігалось зростання рівня препарату приблизно до 40% порівняно з концентрацією у крові.

Виведення. Більша частина метаболізму препарату відбувається переважно у печінці. У нормі $T_{1/2}$ препарату із плазми крові становить $5,4 \pm 1$ год. При порушеннях функції печінки та нирок $T_{1/2}$ може збільшуватися, тому пацієнтам із порушеннями функції печінки та нирок слід враховувати можливість зниження частоти прийому лінкоміцину.

Після разового перорального прийому 500 мг препарату виведення мікробіологічно активної форми із сечею становить 1–31% (у середньому – 4%), а з калом – до 33%.

Враховуючи, що концентрація препарату в жовчі може у 10 разів перевищувати рівень препарату у крові, виведення з жовчю, без сумніву, є важливим шляхом екскреції препарату з організму при пероральному прийомі.

Залишки препарату виводяться у вигляді неактивних з мікробіологічної точки зору метаболітів. Процедури гемодіалізу та перитонеального діалізу не впливають на виведення лінкоміцину з крові.

Показання лінкоміцину:

Лінкоміцин (Рис 1.3) показаний для лікування у разі інфекцій, спричинених чутливими до лінкоміцину штамми грампозитивних аеробних мікроорганізмів, таких як стрептококи, пневмококи та стафілококи, або чутливими до препарату анаеробними бактеріями:

1. Інфекції верхніх дихальних шляхів: хронічний синусит, спричинений анаеробними штамми. лінкоміцин можна застосовувати для лікування окремих випадків гнійного середнього отиту або як засіб для додаткової терапії разом з антибіотиком, що ефективно діє проти аеробних грамнегативних збудників. Інфекції, спричинені *H. influenzae*, не є показанням до застосування препарату.

2. Інфекції нижніх відділів дихальних шляхів, включаючи інфекційні загострення хронічного бронхіту та інфекційну пневмонію.

3. Інфекції шкіри і м'яких тканин, спричинені чутливими мікроорганізмами, у випадках, коли призначення антибіотиків пеніцилінової групи не показане.

4. Інфекції кісток та суглобів, у тому числі остеомієліт та септичний артрит.

5. Септицемія та ендокардит. В окремих випадках септицемії та/або ендокардиту внаслідок чутливості збудників до лінкоміцину спостерігалася виражена відповідь на лікування лінкоміцином. Проте при таких інфекціях перевагу має застосування бактерицидних препаратів.

Застосування:

Дози та спосіб застосування слід визначати, виходячи зі ступеня тяжкості інфекції, стану пацієнта та чутливості бактеріального збудника. Тривалість лікування визначається індивідуально лікарем.

Препарат бажано приймати за 1–2 год до або через 1–2 год після вживання їжі. Тверді капсули необхідно запивати достатньою кількістю води.

Дорослі. По 500 мг 3–4 рази на добу.

Діти (віком від 6 років). 30–60 мг/кг/добу, розподілені на 3–4 рівні дози.

Пацієнти із порушеннями функції нирок та/або печінки. У разі необхідності застосування лінкоміцину для лікування пацієнтів із тяжкими порушеннями функції нирок та/або печінки відповідна доза становить 25–30% дози, рекомендованої пацієнтам із незміненою функцією нирок чи печінки.

Діти. Не призначають препарат у лікарській формі капсули дітям віком до 6 років.



Рис 1.3. Лікарський засіб Лінкоміцин

Побічна дія:

- З боку ШКТ: біль у животі, нудота, блювання та антибіотикоасоційована діарея, езофагіт, глосит, стоматит, анальний свербіж. Майже усі антибіотики, серед яких пеніциліни, цефалоспорини та лінкозаміди, можуть призводити до розвитку тяжкої діареї (іноді розвитку діареї передують прихований період), коліту, в тому числі псевдомембранозного коліту, спричинених дією токсинів *Clostridium difficile* (*C. difficile*). У разі розвитку діареї під час лікування препарат слід відмінити поступово. Коліт може також розвинути через 2–3 тиж після завершення лікування. Слід уникати застосування ліків, що пригнічують перистальтику кишечника.

- З боку системи кровотворення: зареєстровані випадки нейтропенії, лейкопенії, агранулоцитозу та тромбоцитопенічної пурпури. Описані також

рідкісні випадки апластичної анемії та панцитопенії, в яких неможливо виключити роль лінкоміцину як причинного фактора.

- З боку імунної системи: реакції підвищеної чутливості, включаючи ангіоневротичний набряк, сироваткову хворобу, анафілаксію; деякі з названих реакцій спостерігали у пацієнтів із підвищеною чутливістю до пеніциліну. Із застосуванням лінкоміцину пов'язували рідкісні випадки мультиформної еритеми, що іноді були подібними до синдрому Стівенса – Джонсона.

Серйозні анафілактичні реакції потребують невідкладного інтенсивного лікування із застосуванням адреналіну, кисневої терапії та в/в введенням стероїдів. За наявності показань слід також відновити прохідність дихальних шляхів, якщо необхідно – шляхом інтубації.

- З боку шкіри та слизових оболонок: повідомляли про випадки свербіж, шкірних висипань, кропив'янки, вагініту та про рідкісні випадки ексфоліативного та везикульозно-бульозного дерматиту.

- З боку печінки: при терапії лінкоміцином спостерігали виникнення жовтяниці та зміну показників функції печінки (зокрема підвищення рівнів трансаміназ сироватки крові).

- З боку нирок: хоча прямого взаємозв'язку між лінкоміцином та ураженням нирок не встановлено, в окремих випадках спостерігали порушення функцій нирок, про що свідчили азотемія, олігурія та/чи протеїнурія.

- З боку органа слуху та рівноваги: в окремих випадках повідомляли про виникнення дзвону у вухах та вертиго.

Застосування лінкоміцину може бути причиною надмірного росту нечутливих організмів, зокрема дріжджових грибів [10].

Особливості застосування:

Необхідно провести мікробіологічні дослідження з метою визначення збудників та їхньої чутливості до лінкоміцину.

Було продемонстровано ефективність застосування лінкоміцину для лікування стафілококових інфекцій, резистентних до інших антибіотиків та чутливих до лінкоміцину. Виявлені штами стафілококів, резистентних до

лінкоміцину, тому при терапії препаратом лінкоміцин необхідно проводити бактеріологічні посіви та дослідження чутливості збудників. У разі застосування макролідів можлива часткова, але не повна, перехресна резистентність. За наявності показань лікарський засіб можна застосовувати одночасно з іншими антибактеріальними препаратами.

З метою зниження швидкості виникнення резистентних до лікарського засобу бактерій та збереження ефективності лінкоміцину та інших антибактеріальних препаратів лінкоміцин слід застосовувати лише для лікування чи профілактики інфекцій, які доведено або з дуже високою ймовірністю спричинені чутливими бактеріями. У випадках, коли наявна інформація про результати бактеріологічних посівів та визначення чутливості, її необхідно враховувати під час вибору або зміни антибактеріальної терапії. При відсутності цих даних на емпіричний вибір терапії можуть вплинути місцеві епідеміологічні дані та місцеві особливості характеристик чутливості.

Застосування лінкоміцину не показане для лікування незначних бактеріальних інфекцій та вірусних інфекцій. Призначення лінкоміцину у разі відсутності підтвердженої чи підозрюваної з високою ймовірністю бактеріальної інфекції навряд чи буде корисним для пацієнта та підвищує ризик виникнення бактерій із резистентністю до лікарського препарату.

У зв'язку з ризиком розвитку псевдомембранозного коліту перед прийняттям рішення щодо застосування лінкоміцину лікар повинен проаналізувати природу інфекції та оцінити придатність менш токсичних альтернативних препаратів (наприклад еритроміцину).

Про виникнення діареї, пов'язаної з *C. difficile*, повідомлялося при застосуванні майже усіх антибактеріальних засобів, включаючи лінкоміцин.

Тяжкість проявів може бути від помірної діареї до коліту з летальним кінцем. Застосування антибактеріальних препаратів впливає на нормальну флору кишечника та призводить до підвищеного росту *C. difficile*, що продукують токсини А та В. Пов'язана з *C. difficile* діарея може проявлятися у легкій формі з водянистими рідкими випорожненнями, але також може прогресувати до тяжкої

стійкої діареї, лейкоцитозу, гарячки, сильних абдомінальних спазмів, слизу або крові у випорожненнях.

У разі псевдомембранозного коліту легкого ступеня тяжкості зазвичай достатньо припинити прийом препарату. При ступені тяжкості від середнього до тяжкого слід проводити лікування із введенням р-нів, електролітів, білків та призначення антибактеріальних засобів, ефективних проти *C. difficile* при коліті.

Одразу після встановлення первинного діагнозу «псевдомембранозний коліт» слід розпочати лікування. Діагноз зазвичай встановлюють на основі клінічної симптоматики, але для підтвердження діагнозу також можуть бути використані дані ендоскопії або визначення *C. difficile* та його токсинів у випорожненнях пацієнта.

При відсутності лікування у пацієнта може розвинутися потенційно летальний перитоніт, шок і токсичний мегаколон.

Діарея, асоційована з *C. difficile*, частіше розвивається та має тяжчий перебіг в ослаблених пацієнтів та пацієнтів літнього віку. Причиною підвищеної захворюваності та летальності також можуть бути штами *C. difficile*, здатні до збільшеної продукції токсинів.

Можливість виникнення діареї, пов'язаної з *C. difficile*, необхідно враховувати у пацієнтів із діареєю, що виникла після застосування антибіотиків. Необхідно провести ретельний аналіз анамнезу, оскільки розвиток діареї, пов'язаної з *C. difficile*, описували навіть через 2 місяці після завершення антибактеріальної терапії.

Лінкоміцин слід з обережністю призначати пацієнтам, у яких в анамнезі є захворювання ШКТ, особливо коліт.

Лінкоміцин не можна застосовувати для лікування менінгіту, оскільки рівні препарату в СМР недостатні.

Під час довготривалого лікування слід контролювати функцію печінки та нирок, а також проводити аналізи крові.

Застосування лінкоміцину може призводити до надмірного росту нечутливих організмів, зокрема дріжджових грибів. У разі виникнення

суперінфекції слід вживати відповідних заходів, показаних відповідно до клінічної ситуації. Якщо лікування лінкоміцином потребують пацієнти із вже наявними грибковими інфекціями, необхідно одночасно проводити протигрибкову терапію [10].

Лінкоміцин слід з обережністю застосовувати пацієнтам з анамнезом, обтяженим БА або вираженою алергією.

Призначені хірургічні процедури слід проводити у поєднанні з антибіотичною терапією.

Показано, що лінкоміцин здатен блокувати нервово-м'язову передачу імпульсів, тому може посилювати дію інших нервово-м'язових блокаторів. Таким чином, лінкоміцин слід з обережністю застосовувати для лікування пацієнтів, які приймають препарати цього класу.

Лінкоміцин необхідно з обережністю застосовувати для лікування пацієнтів з атопією.

Лінкоміцин слід з обережністю застосовувати для лікування пацієнтів із тяжкими порушеннями функції нирок та печінки, що супроводжуються тяжкими порушеннями обміну речовин. Для цих пацієнтів слід змінювати дозу препарату. Під час лікування високими дозами у таких пацієнтів необхідно контролювати рівень лінкоміцину у сироватці крові, оскільки $T_{1/2}$ препарату у цих категорій пацієнтів може подовжуватися у 2–3 рази.

Застосування у період вагітності та годування грудьми. У людини лінкоміцин здатен проникати через гематоплацентарний бар'єр. При цьому рівні препарату у сироватці пуповинної крові сягають 25% рівнів препарату у сироватці крові матері. Значного накопичення препарату в амніотичній рідині не відбувається. Контрольованих досліджень із застосуванням препарату вагітними не проводили. У 302 дітей, народжених жінками, які отримували лікування лінкоміцином на різних фазах вагітності, не спостерігалось зростання частоти вроджених аномалій чи затримки росту порівняно з контрольною групою протягом перших 7 років життя.

Лінкоміцин не слід застосовувати у період вагітності, за винятком випадків, коли лікування вкрай необхідне. Лінкоміцин виявлений у грудному молоці у концентрації від 0,5 до 2,4 мкг/мл. У зв'язку з можливістю виникнення тяжких реакцій на лінкоміцин у немовлят на грудному вигодовуванні слід прийняти рішення щодо припинення годування грудьми або припинення лікування препаратом залежно від необхідності застосування препарату для матері.

Здатність впливати на швидкість реакції при керуванні транспортними засобами чи роботі з іншими механізмами. Особливого впливу на швидкість реакції при керуванні транспортними засобами чи роботі з іншими механізмами не відзначено, але повідомляли про окремі випадки виникнення запаморочення.

Взаємодія з іншими ЛЗ:

Можливе посилення ефекту препаратів класу блокаторів нервово-м'язової передачі.

Одночасний пероральний прийом каоліново-пектинових сумішей уповільнює поглинання лінкоміцину на 90%. Тому для уникнення подібної взаємодії ці суміші слід приймати щонайменше за 2 год до або через 3–4 год після прийому лінкоміцину.

In vitro спостерігалися антагоністичні взаємодії між лінкоміцином та еритроміцином, а також макролідними сполуками, хімічна структура яких споріднена з еритроміцином. У зв'язку з можливим клінічним значенням описаної взаємодії ці два лікарські препарати не слід призначати одночасно.

Лінкоміцин може впливати на результати визначення рівнів ЛФ крові. Внаслідок цього результати аналізу можуть демонструвати помилкове підвищення рівнів ферменту.

Повідомлялося про перехресні випадки резистентності між лінкоміцином та кліндаміцином.

Передозування:

При передозуванні можливе виникнення розладів з боку ШКТ, включаючи біль у животі, нудоту, блювання та діарею.

Для лікування передозування слід спровокувати блювання або за наявності показань – провести промивання шлунка. Специфічний антидот невідомий.

Гемодіаліз та перитонеальний діаліз неефективні для видалення лінкоміцину із крові [10].

1.5. Висновки до розділу

З проведеного огляду, можна зробити висновки, що під антибіотиками розуміють хіміотерапевтичні речовини, отримані з мікроорганізмів чи інших природних джерел, і навіть їх напівсинтетичні аналоги і похідні, що мають здатність вибірково пригнічувати в організмі хворого збудників захворювань, і затримувати розвиток злоякісних новоутворень. Механізм дії антибіотиків складний, вони порушують різні сторони метаболізму.

У деяких антибіотиків переважає бактерицидна дія – пеніциліни, аміноглікозиди; у інших – бактеріостатична – тетрацикліни, левоміцетин, макроліти. Лінкоміцин – це природний антибіотик, синтез якого характерен для деяких видів актиноміцетів роду *Streptomyces* природний антибіотик з групи лінкозамідів, що у терапевтичних дозах діє бактеріостатично, при більш високих дозах має бактерицидну дію. Чутливими до дії лінкоміцину є грампозитивні мікроорганізми: аеробні – стафілококи, стрептококи, в тому числі пневмококи, а також анаеробні неспороутворюючі мікроорганізми – клостридії, пептококи, пептострептококи, фузобактерії, пропіонобактерії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали для дослідження

2.1.1. Середовища для культивування

Вирощування культури в колбах. Початковим посівним матеріалом для отримання лінкоміцину служить культура *Streptomyces lincolnensis* на агаризованому середовищі. Вирощування культур відбувається паралельно. Спори *S. lincolnensis* отримані на агарі, використовують для приготування посівного матеріалу. Споривий матеріал може зберігатися протягом року при кімнатній температурі. Ним засівають рідке посівне середовище, що містить кукурудзяний екстракт і крохмаль, рН 6,5-8,0. Вирощують посівний міцелій протягом 36-48 годин на круговій качалці, що робить 220-250 об/хв. Час вирощування залежить від особливостей штаму-продуцента, а також від кількості внесеного до посівного середовища спорового матеріалу [11]. Кількість посівного міцелія, що передається в середовище ферментації, обумовлене відношенням продуцента до концентрації неорганічного фосфору (посівне середовище містить багато розчиненого фосфору), залежить від складу середовища ферментації і технології процесу ферментації, зокрема від інтенсивності аерації. Якщо ферментація проводиться в колбах, об'єм посівного матеріалу складає зазвичай 2-4 %, у ферментерах він може досягати 30 %.

Якщо для приготування посівного і ферментаційного середовищ використовується кукурудзяний екстракт, багатий фосфором, після передачі посівного міцелія концентрація фосфору в середовищі ферментації може виявитися дуже високою, несприятливою для біосинтезу антибіотика. В цьому випадку слід використовувати посівне середовище з меншою кількістю кукурудзяного екстракту, крейдою, мінеральним азотом і крохмалем або кукурудзяним борошном. Через 24-30 годин на цьому середовищі зростає рясна

міцеліальна маса і виявляється повністю вичерпаним мінеральний фосфор. Посівний матеріал, вирощений на такому середовищі, може бути використаний для засіву в збільшеній кількості без збитку для біосинтезу антибіотика. Збільшення кількості посівного міцелія сприяє прискоренню протікання процесу [12, 13].

Засівати середовище в посівних апаратах можна безпосередньо спорами на пшоні, що практикують в тих випадках, коли повторне вирощування перед засівом небажано. Проте цей спосіб пов'язаний з великою витратою дорогого посівного матеріалу, і тому для засіву середовища в посівних апаратах, як правило, вирощують міцеліальну культуру в колбах [14].

Залежно від умов роботи і потрібної кількості міцеліальної культури, розмноження спорової культури ведуть в один (первинне розмноження) або в два ступені (первинне і вторинне розмноження).

2.1.2. Характеристика середовища для культивування

Вирощування продуцента зазвичай здійснюють на середовищі, що має наступний склад (у %):

Кукурудзяне борошно6	Натрію хлорид 0,4
Кукурудзяний екстракт ...1,5	Крейда.....0,8
Амонія сульфат0,6	Вода.....до 1 л

Додаванням 30%-го розчину їдкого натру рН середовища доводять до 7-7,5, враховуючи, що після стерилізації він повинен знизитися до 6,5-6,6.

Розмноження посівного матеріалу (отримання міцеліальної маси) проводять в дві генерації: в колбах (на 750 мл з 200 мл поживного середовища) і на качалці (160-180 об/хв), і в посівному апараті. Тривалість кожної генерації 2-3 доби, температура вирощування 26-28 °С.

Розмноження в колбах, ємність яких зазвичай складає 750-1000 мл. У колби наливають 120-160 мл поживного середовища, вказаного вище складу. Кількість колб залежить від потрібної кількості міцеліальної культури. Колби з середовищем стерилізують в автоклаві 20 хв при надмірному тиску 1 ат.

Після охолодження вмісту колб до 28-30°C в кожну колбу стерильно вносять з флакону посівний матеріал і ставлять колби на качалку, яка повинна робити 220-240 об/хв (23,1-25,2 рад/сек). Вирощування культури ведеться при температурі 26-28°C протягом 24-30 год. Вміст однієї-двох колб використовують для визначення якості культури, що виросла, а інше – для вторинного розмноження або для засіву середовища в посівних апаратах залежно від умов роботи [15].

Вторинне розмноження ведеться в декількох колбах залежно від потрібного об'єму міцеліальної культури для засіву середовища в посівних апаратах. У кожну з колб ємністю 750-1000 мл наливають по 120-160 мл поживного середовища і всі колби поміщають в автоклав для стерилізації середовища, яке ведеться при надмірному тиску 1,2 ат протягом 40 хв. Після охолодження до 30 °C в кожну колбу стерильно вносять 5-6 мл міцеліальної культури з колби першого розмноження і всі колби ставлять на качалку [15].

Засів посівних апаратів. Міцеліальна маса, отримана після другої генерації, служить для засіву живильного середовища посівних апаратів з розрахунку 600-800 мл на 1 м³. Далі посівний матеріал розмножується в посівних апаратах (при постійній аерації, температурі 26-28 °C, протягом 45-50 год) до кількості, рівної 10-12 % робочого об'єму основного ферментера. Для цих цілей використовується поживне середовище наступного складу (у %):

кукурудзяне борошно	6
кукурудзяний екстракт	1,5
сірчаноокислий амоній	0,6
куховарська сіль	0,4
крейда	0,8
жир	1,5-2,0

Виробниче культивування проводиться на середовищі того ж складу, тільки для підвищення вмісту вітаміну В12, в неї додають хлорид кобальту з

розрахунку 1 г на 1 м³ середовища. Вирощування культури триває 160-168 год при температурі 27-28 °С, при постійному перемішуванні і аерації. Зважаючи на сильний піноутворюючий ступінь, заповнення апарату не повинен перевищувати 50 %.

Піногасіння. При аерації і перемішуванні середовища утворюється значна кількість піни. Ступінь спінювання середовища не постійний і залежить від складу середовища [15].

Спінювання вельми небезпечно для технологічного процесу з ряду причин. Безперервне піноутворення веде до викиду піни з ферментера в повітря, що перш за все приводить до значних втрат середовища. Крім того, потрапляючи у викидну повітряну трубу і потім в атмосферу, піна створює умови для інфікування середовища, що приведе до псування всього вмісту ферментера [16].

Для боротьби з піноутворенням і викидом піни, застосовуються різні засоби. Перш за все обмежують ступінь заповнення ферментера, наповнюючи його зазвичай не більше ніж на 65-70 % загальної ємкості. Для зниження піноутворення ще в процесі приготування середовища вносять до неї рослинної олії в кількості 1,0-1,5 кг/м³ середовища. Крім цього, при утворенні великої кількості піни в процесі росту безпосередньо у ферментер вносять деяку кількість заздалегідь простерилізованого рослинної олії, як піногасник.

Перед внесенням до ферментера, піногасники стерилізують нагрівом до 130-140 °С протягом 1-2 год. Тому бачки для піногасників повинні мати парові сорочки або змійовики для прогрівання [1].

Процес вирощування культури. Після засіву середовища в посівному апараті починається процес вирощування міцеліальної культури, який ведеться при постійній аерації і перемішуванні з підтримкою температури 27-28 °С.

Зростання культури супроводжується виділенням тепла, унаслідок чого необхідна температура підтримується великим або меншим пуском води, що охолоджує, в сорочку апарату. Всякі відступи від температурного режиму несприятливо позначаються на зростанні посівного матеріалу і тому не повинні допускатися. Тривалість вирощування міцеліальної культури досягає 24-30 год.

Отриманий посівний матеріал передається у ферментери по спеціальних комунікаціях, які заздалегідь повинні бути простерилізовані протягом години паром під надмірним тиском 1 ат. [1].

Іноді готовий посівний матеріал не може бути використаний негайно із-за невідповідності ферментера. І в таких випадках його слід охолодити до 16-18°C. При такій температурі він може зберігатися до 20 год.

2.1.3. Ферментер для культивування лінкоміцину

Ферментер є герметичною циліндричною посудиною - корпус, забезпечений барботером для подачі стерильного повітря і мішалкою з електроприводом. Всередині, ферментер, вздовж його корпусу і перпендикулярно до нього, закріплюють вузькі металеві смуги - відбійники для підвищення ефективності перемішування (рис.2.1). При безперервному процесі культивування мікроорганізмів, ферментер, додатково обладнується, стерилізується резервуарами для зберігання компонентів живильного середовища і насосами для їх безперервної подачі в ферментер.

Використовують ферментер в промисловості при мікробіологічному синтезі антибіотиків, ферментів, вітамінів, амінокислот, нуклеотидів, білково-вітамінних концентратів і т.д., в наукових дослідженнях в галузі мікробіології, біохімії і ін.

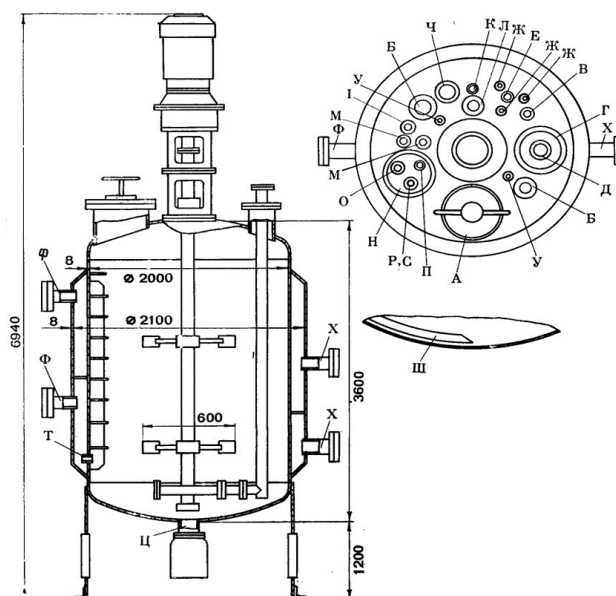


Рис. 2.1. Ферментер для вирощування продуцента лінкоміцину

А – люк; Б – оглядове вікно; В – для завантаження добавок; Г – для труби барботера;

Д – для труби барботера; Е – для завантаження піногасника; Ж – для прикріплення бачка піногасника; І – для виходу повітря; К – завантаження поживного середовища та посівного матеріалу; Л – для датчика рН-метра М – для КПП; Н – резервний О – для гільзи ртутного термометра; П – для манометра; Р – для взяття проби; С – для взяття проби; Т – для термометра опору; У – для очистки оглядових вікон; Ф – для входу охолоджуючої води; Х – для виходу охолоджуючої води; Ц – для нижнього спуску; Ч – резервний для труби передавлювання; Ш – для труби передавлювання.

Об'єм ферментера, призначених для лабораторних досліджень, частіше до 30 л, для напівзаводських експериментів - 0,05-5 м³, промислового використання - 50-100 м³. Лабораторні ферментери можуть виготовлятися з термостійкого скла (їх стерилізують в автоклавах), ферментер великих розмірів - з нержавіючої сталі (вони мають парову сорочку для стерилізації та підтримки температури).

Ферментер, як правило, обладнується пристроями для вимірювання і регулювання температури, кількості повітря, що продувається і тиску всередині ферментера. У разі необхідності, ферментер додатково забезпечують пристроями для вимірювання і регулювання рН середовища, концентрації розчиненого кисню в культуральній рідині, вуглекислого газу у вихідному повітрі, сигналізатором рівня піни і пристосуваннями для механічного або хімічного піногасіння. При безперервному процесі культивування мікроорганізмів, ферментер, додатково обладнується, стерилізується резервуарами для зберігання компонентів живильного середовища і насосами для їх безперервної подачі в ферментер.

Підготовка ферментера. Робочий цикл ферментера починається з підготовки його до процесу вирощування культури продуцента: миття, огляду, перевірки герметичності і стерилізації.

Після звільнення від вирощеної культури ферментер ретельно миють зсередини теплою водою з брандспойта через відкритий люк. Сильним струменем води з внутрішніх поверхонь ферментера видаляють всі залишки середовища і міцелія [17]. У тих випадках, коли цим способом не вдається

досягти бажаного ефекту, частинки, що пристали до поверхні, видаляють металевими щітками.

Одночасно з миттям ферментера звільняють мірник від залишків піногасника. У разі потреби в мірник набирають воду, кип'ятять її і спускають у ферментер в процесі миття.

Промиті ферментер, мірник піногасника і повітряний фільтр піддають технічному огляду, в процесі якого перевіряють стан всіх вентилів, кранів, фланців, прокладок люка, сальників валу мішалки і його підшипників, а також справність всієї арматури: манометра, термометра, пробовідбірника, оглядового скла і тому подібне. Після закінчення технічного огляду і усуненні всіх відмічених несправностей проводиться перевірка герметичності. Для цього ферментер наповнюють повітрям з надмірним тиском 0,5 ат і витримують його протягом півгодини при закритих вентилях. Якщо тиск повітря у ферментері за цей час впаде не більше ніж на 0,05 ат, герметичність вважається задовільною. Інакше проводять ретельну перевірку вентилів, кранів, люка, сальників, фланців і іншого за допомогою мильного розчину, що наноситься щіточкою на місця з'єднань. При такому способі перевірки щонайменший пропуск повітря буде виявлений по мильних бульбашках, що утворюються в цьому місці [18].

Після того, як справність і герметичність ферментера перевірені, приступають до стерилізації його паром. Перед стерилізацією воду з водяних сорочок і змішувачів спускають і в них подають пару по повітряній трубці, а також через пробовідбірник. Для видалення повітря з ферментера перші 5-10 хв пар подають в нього при відкритому вихідному повітряному вентилі. Коли все повітря буде витиснено і ферментер прогріється до 100 °С, повітря і спусковий ventилі закривають, і створюють у ферментері надмірний тиск до 1 ат. Під цим тиском ферментер витримують протягом 2 год. Щоб уникнути накопичення конденсату, що заважає прогрівання дна, його спускають кожні 20-30 хв. [18].

Охолодження ферментера починається із зниження тиску усередині нього при одночасному припиненні подачі пару в сорочку. Коли надмірний тиск у ферментері знизиться до 0,1-0,2 ат, починають подавати повітря через

повітряний фільтр, підтримуючи в ньому цей тиск. При пониженні температури ферментера до 95-98 °С пускають воду в сорочку ферментера.

Коли ж температура ферментера знизиться до 60-70 °С, у нього направляють стерилізоване охолоджене середовище із стерилізаційної установки і наповнюють його до заданого рівня. Починаючи подачу середовища, приводять в рух мішалку ферментера. За ходом наповнення ферментера середовищем спостерігають через оглядове скло у верхньому дні. В процесі наповнення ферментера, систематично стежать за температурою середовища в ньому, добиваючись, щоб до кінця цієї операції температура була в межах 27-29 °С, для чого відповідним чином регулюють подачу води в теплообмінник і в сорочку ферментера.

2.1.4 Характеристика продуцента лінкоміцину

Лінкоміцин продукують ряд видів актиноміцетів роду *Streptomyces*. Однак основним продуцентом лінкоміцину визнаний *Streptomyces lincolnensis* (Рис. 2.2) здатний синтезувати до 5900 мкг/л антибіотика. Культури актиноміцетів вельми варіабельні і кожному штаму повинна відповідати певне середовище і свій режим для розвитку мікроорганізму. На їх мінливість впливають умови культивування і особливо склад середовищ (на більш багатих за складом середовищах спостерігається і більш швидка мінливість).



Рис. 2.2. Колонії культури *S. lincolnensis*.

Характеризуючи загальні закономірності біохімічних процесів, що відбуваються в ході розвитку штаму, можна відзначити дві реальні фази.

Перша фаза. Для фази характерні швидкий ріст і розвиток стрептоміцетів з енергійним використанням основних компонентів субстрату і максимальним споживанням кисню. Маса міцелію досягає максимуму, цитоплазма базофільних, клітин з високим вмістом РНК, ДНК на ранніх стадіях розвитку відсутня і з'являється тільки через 12 год розвитку. рН середовища спочатку дещо знижується, потім поступово підвищується. Утворення лінкоміцину не відбувається.

Друга фаза. Для цієї фази характерно повільне споживання поживних речовин, що залишилися в середовищі. Зростання стрептоміцетів сповільнюється, різко знижується споживання кисню. Вміст РНК у міцелії падає, базофілія ядерної речовини підвищується, вміст ДНК в ньому збільшується. Основна маса міцелію піддається автолізу, що призводить до збільшення вмісту в середовищі аміачного азоту і неорганічного фосфору. У другій фазі максимальний ріст лінкоміцину зазвичай досягається при максимумі біомаси. Іншими словами, максимальне накопичення антибіотика в культуральній рідині відбувається в період, коли в культурі автолітичні процеси починають переважати над процесами зростання. Однак неправильно вважати, що виділення лінкоміцину в навколишнє середовище пов'язано з тим, що він звільняється з клітин міцелію в результаті їх автолізу.

Якби це було так, то слід було б очікувати, що в процесі розвитку стрептоміцетів в його міцелії накопичується лінкоміцину. Але прямі дослідження показали, що кількість антибіотика, пов'язана з клітинами міцелію, в ході розвитку організму мало змінюється.

Вміст лінкоміцину в міцелії залежить від стану міцелію. Таким чином, можна вважати цілком доведеним, що біосинтез лінкоміцину здійснюється міцелієм у другу фазу росту стрептоміцетів (в специфічних умовах середовища, що характеризується, з одного боку, виснаженням основних поживних

компонентів, а з іншого – збагаченням субстрату продуктами життєдіяльності стрептоміцетами і продуктами автолізу його клітин).

Визначення речовин, що містяться в культуральній рідині продуцента лінкоміцину *S. lincolnensis* в кінці процесу біосинтезу антибіотика, показало, що в культуральній рідині знаходяться мінеральні (зольні) елементи, білки, нуклеїнові кислоти, жири, лінкоміцин, амінокислоти, полісахариди та інші речовини.

Як продуцент лінкоміцину обрано *Streptomyces lincolnensis*. Порівнюючи його з іншими штамми, бо він є найбільш вигідним продуцентом що використовується в промисловості.

Особливості *Streptomyces lincolnensis* – продуцента антибіотика лінкоміцину.

За калсифікацією вищого порядку таксонів: Домен: Бактерії

Тип: *Actinobacteria*

Родина: *Actinomycetales*

Сім'я: *Streptomycetaceae*

Рід: *Streptomyces*

Штам: *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466

Streptomyces в цілому, піддається перебудові ДНК, таким як посилення і видалення особливо на кінцівках. Геном *Streptomyces lincolnensis* в даний час досліджений в Університеті Токіо.

Плазмідні з *Streptomyces lincolnensis* ідеально підходять для використання в силу різного метаболізму і мають потенціал для їх використання в якості векторів клонування в генетичних маніпуляціях.

Streptomyces lincolnensis має товстий шар пептидогліканів і ліпідів, розтягування своєї клітинної стінки робить його проникність вищею.

Коли *Streptomyces lincolnensis* обробляють лізоцимом протягом шести годин, клітини не вмирають, а ще в змозі рости. Це показує, що лізоцин був не в

зможі досягти муреїну. У клітинної стінки *Streptomyces lincolnensis* є широкий заповнених водою канал, який містить сайт зв'язування антибіотика стрептоміцину. Клітинні стінки мають меншу щільність, ніж цитоплазматичні мембрани.

Життєвий цикл *Streptomyces lincolnensis*:

Штам має підкладку і міцелій. Міцелій має розгалуження, що має гіфи, які утворюють ланцюжки, що називаються артроспорами. А-фактор бере участь у вторинному метаболізмі і морфологічній диференціації, також несе відповідальність за запуск оновлення міцелію.

Кращим джерелом вуглецю для виробництва лінкоїцину є за порядком переваги: глюкоза, маноза, крохмаль, декстрин і маніт.

L-аспарагіну і L-гістидин є хорошим джерелом азоту для виробництва антибіотика. *Streptomyces lincolnensis* можуть отримувати азот з органічних і неорганічних джерел. Їх життєвий цикл доходить до завершення з споруутворенням. *S. lincolnensis* спорує дуже добре, коли знаходиться в культуральній рідині. Можуть утворюватися ендоспори. Різноманітність метаболізму *Streptomyces* дозволяє ламати нерозчинні залишки інших організмів і з'єднань, включаючи з'єднання, такі як хітин. Відповідно до сучасних досліджень, даний штам не викликає яких-небудь захворювань. Хоча може продукувати корисний антибіотик.

Для селекції був обраний штам-прототип *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466. Штам має наступні ознаки:

- на середовищі з кукурудзяним екстрактом на дев'ятий день зростання утворює плоскі колонії, слабоскладчасті з невеликим кратером, слабо спорулюючі, діаметром 7,5 мм;
- на горохової середовищі колонії сильноскладчасті, майже аспорогенні (втратили здатність утворювати спори) з темним субстратним міцелієм, діаметр якого складає 7,5 мм;
- на середовищі Ваксмана колонії дрібні, зі світло-коричневим субстратним міцелієм, діаметр 3 мм;

- на середовищі СР-1 з глюкозою колонії безбарвні, пливчасті, аспорогенні з коричневим субстратним міцелієм в центрі колонії, діаметр 8 мм.

Фізіолого-біохімічні ознаки: повністю пептонізують молоко на сьому добу; інтенсивно розріджують желатину на п'яту-сьому добу; слабо коагулює молоко на дев'яту добу; накопичує до 10 мг/мл лінкоміцину на середовищі з 7,5% крохмалю.

Недоліком цього штаму є низька здатність до накопичення лінкоміцину, тому метою роботи є підвищення здатності продуцента лінкоміцину до антибіотикоутворення [19].

Штам *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 має такі відмінні ознаки.

Морфолого-культуральні ознаки.

Характеристика колоній на щільних середовищах.

Вирощування проводили при температурі 28 °С протягом 10-12 діб на поверхні агаризованих середовищ в чашках Петрі.

- На середовищі з кукурудзяним екстрактом колонії мають розмір 6 мм, опуклі з рівним краєм, шкірясті, слабоскладчасті з кратером, повітряний міцелій світло-сірого кольору, зворотна сторона колонії коричнева. У середовище виділяють бурий пігмент.

- На соєвому середовищі колонії мають розмір 5 мм, опуклі з нерівним краєм, шкірясті, по краях радіально-складчасті, центр колонії спорулюючий, а край – аспорогенний, повітряний міцелій коричневий, колір спорової маси сіруватий. У середовище виділяють бурий пігмент.

- На вівсяному середовищі колонії мають розмір 4 мм, плоскі, край рівний, повітряний міцелій в центрі сірого кольору, по краях – коричневого.

- На гороховоому середовищі розмір колоній 6 мм, колонії опуклі, радіально-складчасті з кратером. Повітряний міцелій темно-коричневий, край колоній нерівний.

- На середовищі Гаузе колонії мають розмір 6 мм, опуклі з кратером, край колоній нерівний, повітряний міцелій світло-сірого кольору, в центрі колонії темно- сірі.

- На середовищі Ваксмана діаметр колонії 4 мм, колонії плоскі з рівним краєм, повітряний міцелій темно-сірий.
- На середовищі Гаузе з глюкозою колонії плоскі, діаметром 4 мм, з рівним краєм. Повітряний міцелій коричневий, по краях колонії світло-коричневі, центр колоній споруючий, край – аспорогенний. У середовище виділяють коричневий пігмент.
- На середовищі Гаузе з крохмалем колонії плоскі, діаметром 2 мм з рівним краєм, повітряний міцелій темно-сірого кольору. У середовище виділяють коричневий пігмент.
- На середовищі Чапека колонії пливчасті, діаметром 4,5 мм з рівним краєм, повітряний міцелій темно-коричневий, по краях колонії світло-коричневі. Пігмент у середовище не виділяє.
- Крохмально-аміачний агар. Колонії плоскі, діаметром 3 мм. Повітряний міцелій білий. Край колонії нерівний. Виділяє коричневий пігмент.
- Картопляний агар. Колонії складчасті з нерівним краєм, діаметром 5 мм. Повітряний міцелій розвинений слабко, кремового кольору.
- СР-1 з глюкозою. Колонії плоскі, з рівним краєм, діаметром 3 мм, неспорулюючі, повітряний міцелій світло-коричневий. Виділяють жовто-коричневий пігмент.
- СР- 1 з сахарозою. Колонії пливчасті, з рівним краєм, діаметром 3 мм, повітряний міцелій сірий, розвинений слабко.

Клітини. При температурі 28 °С на щільному середовищі у віці 10-12 діб колонії не мають яскраво вираженого поділу на окремі клітини. У глибинних умовах гіфи міцелію розділені на клітини різної довжини, діаметр ниток до 1 мкм. Клітини грампозитивні. Ступінь зафарбованості залежить від віку і у міру старіння знижується. Клітинна стінка має слабо виражений слизовий шар на поверхні. Має у своєму складі гліцин і діамінопімелінову кислоту. Розчиняється лізоцимом, кислото- і спиртостійкість для клітин штаму не характерна [20].

Спороутворення. При температурі 28 °С на 10-12 добу зростання утворює спори на повітряному міцелії на середовищах з кукурудзяним екстрактом,

соєвому, вівсяному, гороховому середовищах, середовищі Гаузе з глюкозою, крохмалем, крохмале-аміачному агарі, картопляному агарі, СР-1 з сахарозою.

Спороносці прямі, розгалужені, суперечки на спороносці овальні, розташовані парами або ланцюжками. Рухливі клітини відсутні [21].

Фізіолого-біохімічні ознаки.

Для *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 характерно аеробне дихання, умовою для якого є доступ кисню в чашки Петрі при культивуванні на поверхні агаризованого середовища і примусова аерація при культивуванні в глибинних умовах. Культура є аерофілом, однак ступінь аерофільних нижче, ніж у штаму-прототипу.

Штам *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466 росте при температурі від 25 до 35 °С, оптимум температури 28 °С. Межі рН для росту культури від 6,5 до 8,0, оптимальне значення рН 7,0.

На середовищах із сірчанокислим і азотнокислим амонієм засвоює амонійний азот, на середовищах з амінокислотами або кукурудзяним екстрактом засвоює амінний азот. Нітрати на середовищі Чапека з реактивом Грісса відновлює слабо.

Реакція на гідроліз крохмалю – інтенсивно гідролізує, на 24 год відбувається повне знебарвлення. Реакція на інверсію сахарози негативна.

Біотехнологічні ознаки. Штам утворює до 24,5 мг/мл ліносіцину, в середньому 21,5-22,5 мг/мл на 192-192 год ферментації при визначенні спектрофотометричним методом. Зберігає активність при зберіганні на твердому середовищі протягом 10 місяців. Не знижує активності в семи генераціях [22].

2.2 Методи отримання лінкоміцину

2.2.1. Технологія промислового виробництва лінкоміцину

Вирощування культури в колбах. Початковим посівним матеріалом для отримання лінкоміцину служить культура *Streptomyces lincolnensis* на агаризованому середовищі. Вирощування культур відбувається паралельно.

Спори *S. lincolnensis* отримані на агарі, використовують для приготування посівного матеріалу. Споривий матеріал може зберігатися протягом року при кімнатній температурі. Ним засівають рідке посівне середовище, що містить кукурудзяний екстракт і крохмаль, рН 6,5-8,0. Вирощують посівний міцелій протягом 36-48 годин на круговій качалці, що робить 220-250 об/хв. Час вирощування залежить від особливостей штаму-продуцента, а також від кількості внесеного до посівного середовища спорового матеріалу [11]. Кількість посівного міцелія, що передається в середовище ферментації, обумовлене відношенням продуцента до концентрації неорганічного фосфору (посівне середовище містить багато розчиненого фосфору), залежить від складу середовища ферментації і технології процесу ферментації, зокрема від інтенсивності аерації. Якщо ферментація проводиться в колбах, об'єм посівного матеріалу складає зазвичай 2-4 %, у ферментерах він може досягати 30 %.

Якщо для приготування посівного і ферментаційного середовищ використовується кукурудзяний екстракт, багатий фосфором, після передачі посівного міцелія концентрація фосфору в середовищі ферментації може виявитися дуже високою, несприятливою для біосинтезу антибіотика. В цьому випадку слід використовувати посівне середовище з меншою кількістю кукурудзяного екстракту, крейдою, мінеральним азотом і крохмалем або кукурудзяним борошном. Через 24-30 годин на цьому середовищі зростає рясна міцеліальна маса і виявляється повністю вичерпаним мінеральний фосфор. Посівний матеріал, вирощений на такому середовищі, може бути використаний для засіву в збільшеній кількості без збитку для біосинтезу антибіотика. Збільшення кількості посівного міцелія сприяє більш пришвидшеному протіканню процесу [12, 23].

Засівати середовище в посівних апаратах можна безпосередньо спорами на пшоні, що практикують в тих випадках, коли повторне вирощування перед засівом небажано. Проте цей спосіб пов'язаний з великою витратою дорогого посівного матеріалу, і тому для засіву середовища в посівних апаратах, як правило, вирощують міцеліальну культуру в колбах [13].

Залежно від умов роботи і потрібної кількості міцеліальної культури, розмноження спорової культури ведуть в один (первинне розмноження) або в два ступені (первинне і вторинне розмноження).

Вирощування продуцента зазвичай здійснюють на середовищі, що має наступний склад (у %):

Кукурудзяне борошно	0,6	Натрію хлорид	0,4
Кукурудзяний екстракт ...	1,5	Крейда.....	0,8
Амонія сульфат	0,6	Вода.....	до 1 л

Додаванням 30%-го розчину їдкого натру рН середовища доводять до 7-7,5, враховуючи, що після стерилізації він повинен знизитися до 6,5-6,6.

Розмноження посівного матеріалу (отримання міцеліальної маси) проводять в дві генерації: в колбах (на 750 мл з 200 мл поживного середовища) і на качалці (160-180 об/хв), і в посівному апараті. Тривалість кожної генерації 2-3 доби, температура вирощування 26-28 °С.

Розмноження в колбах, ємність яких зазвичай складає 750-1000 мл. У колби наливають 120-160 мл поживного середовища, вказаного вище складу. Кількість колб залежить від потрібної кількості міцеліальної культури. Колби з середовищем стерилізують в автоклаві 20 хв при надмірному тиску 1 ат.

Після охолодження вмісту колб до 28-30°C в кожену колбу стерильно вносять з флакону посівний матеріал і ставлять колби на качалку, яка повинна робити 220-240 об/хв (23,1-25,2 рад/сек). Вирощування культури ведеться при температурі 26-28°C протягом 24-30 год. Вміст однієї-двох колб використовують для визначення якості культури, що виросла, а інше – для вторинного розмноження або для засіву середовища в посівних апаратах залежно від умов роботи [14].

Вторинне розмноження ведеться в декількох колбах залежно від потрібного об'єму міцеліальної культури для засіву середовища в посівних апаратах. У кожену з колб ємністю 750-1000 мл наливають по 120-160 мл поживного середовища і всі колби поміщають в автоклав для стерилізації середовища, яке ведеться при надмірному тиску 1,2 ат протягом 40 хв. Після

охолодження до 30 °С в кожному колбу стерильно вносять 5-6 мл міцеліальної культури з колби першого розмноження і всі колби ставлять на качалку [15].

Засів посівних апаратів. Міцеліальна маса, отримана після другої генерації, служить для засіву живильного середовища посівних апаратів з розрахунку 600-800 мл на 1 м³. Далі посівний матеріал розмножується в посівних апаратах (при постійній аерації, температурі 26-28 °С, протягом 45-50 год) до кількості, рівної 10-12 % робочого об'єму основного ферментера. Для цих цілей використовується поживне середовище наступного складу (у %):

кукурудзяне борошно	6
кукурудзяний екстракт	1,5
сірчаноокислий амоній	0,6
кухварська сіль	0,4
крейда	0,8
жир	1,5-2,0

Виробниче культивування проводиться на середовищі того ж складу, тільки для підвищення вмісту вітаміну В12, в неї додають хлорид кобальту з розрахунку 1 г на 1 м³ середовища. Вирощування культури триває 160-168 год при температурі 27-28 °С, при постійному перемішуванні і аерації. Зважаючи на піноутворюючий ступінь, заповнення апарату не має перевищувати 50 %.

Піногасіння. При аерації і перемішуванні середовища утворюється значна кількість піни. Ступінь спінювання середовища не постійний і залежить від складу середовища [15].

Спінювання вельми небезпечно для технологічного процесу з ряду причин. Безперервне піноутворення веде до викиду піни з ферментера в повітря, що перш за все приводить до значних втрат середовища. Крім того, потрапляючи у викидну повітряну трубу і потім в атмосферу, піна створює умови для інфікування середовища, що приведе до псування всього вмісту ферментера [16].

Для боротьби з піноутворюванням і викидом піни, застосовуються різні засоби. Перш за все обмежують ступінь заповнення ферментера, наповнюючи його зазвичай не більше ніж на 65-70 % загальної ємкості. Для зниження піноутворювання ще в процесі приготування середовища вносять до неї рослинної олії в кількості 1,0-1,5 кг/м³ середовища. Крім цього, при утворенні великої кількості піни в процесі росту безпосередньо у ферментер вносять деяку кількість заздалегідь простерилізованого рослинної олії, як піногасник.

Перед внесенням до ферментера, піногасники стерилізують нагрівом до 130-140 °С протягом 1-2 год. Тому бачки для піногасників повинні мати парові сорочки або змійовики для прогрівання [1].

Процес вирощування культури. Після засіву середовища в посівному апараті починається процес вирощування міцеліальної культури, який ведеться при постійній аерації і перемішуванні з підтримкою температури 27-28 °С.

Зростання культури супроводжується виділенням тепла, унаслідок чого необхідна температура підтримується великим або меншим пуском води, що охолоджує, в сорочку апарату. Всякі відступи від температурного режиму несприятливо позначаються на зростанні посівного матеріалу і тому не повинні допускатися. Тривалість вирощування міцеліальної культури досягає 24-30 год.

Отриманий посівний матеріал передається у ферментери по спеціальних комунікаціях, які заздалегідь повинні бути простерилізовані протягом години паром під надмірним тиском 1 ат. [1].

Іноді готовий посівний матеріал не може бути використаний негайно із-за невідповідності ферментера. І в таких випадках його слід охолодити до 16-18°С. При такій температурі він може зберігатися до 20 год.

Ферментер є герметичною циліндричною посудиною - корпус, забезпечений барботером для подачі стерильного повітря і мішалкою з електроприводом. Всередині, ферментер, вздовж його корпусу і перпендикулярно до нього, закріплюють вузькі металеві смуги - відбійники для підвищення ефективності перемішування. При безперервному процесі культивування мікроорганізмів, ферментер, додатково обладнується,

стерилізується резервуарами для зберігання компонентів живильного середовища і насосами для їх безперервної подачі в ферментер.

Використовують ферментер в промисловості при мікробіологічному синтезі антибіотиків, ферментів, вітамінів, амінокислот, нуклеотидів, білково-вітамінних концентратів і т.д., в наукових дослідженнях в галузі мікробіології, біохімії і ін.

2.2.2. Засів середовища.

Перед засівом, подачу повітря в посівний апарат припиняють і тиск в ньому знижують повністю (до нуля). Після цього закривають також і вихідний вентиль [36]. Приймають і інші заходи, що виключають рух повітря біля посівною апарату під час засіву (закривають вікна, двері, зупиняють вентилятори, тощо).

Поживне середовище для виробничих ферментерів готують в окремому апараті – змішувачі, в якому всі компоненти середовища ретельно перемішуються. Об'єм змішувача визначається кількістю середовища, що готується, який у свою чергу залежить від об'єму ферментера і допустимого ступеня його заповнення.

Спочатку ферментери заповнюють поживним середовищем, а потім вже вносять посівну культуру. Вважаючи, що об'єм культури складає 0,1 від об'єму поживного середовища, заповнення ферментера середовищем повинне скласти 60 % і посівною культурою – 6 % від загальної його ємкості [24].

На цей об'єм розраховуються і подаються в змішувач всі компоненти середовища, причому воду вносять по двом прийомам. Спочатку її подають в такій кількості, щоб об'єм середовища склав 70-75 % від заданого. Середовище добре перемішують, підігривають в змішувачі і потім насосом перекачують у ферментер через гріючу колонку, стерилізатор і теплообмінник. Коли ця кількість середовища буде викачана, в змішувач подають таку кількість води, щоб витіснити залишки середовища в цих апаратах і промити їх. Воду при викачуванні стерилізують так само, як і середовище. Її качають до тих пір, поки об'єм середовища у ферментері не досягне заданої величини (по рівню).

Приготоване таким чином середовище перекачують насосом у ферментер через систему стерилізації і охолодження, яку потім промивають водою, як вказано вище. Перекачування промивної води припиняють, коли поживне середовище заповнить весь призначений для нього об'єм ферментера.

Після цього подачу води припиняють, воду з труб, теплообмінника, витримувача і насоса спускають і всі труби і апарати стерилізують паром протягом години при 120 °С.

Процес біосинтезу. Біосинтез лінкоміцину може здійснюватися при культивуванні продуцентів на найрізноманітніших синтетичних або комплексних середовищах в порівняно широких інтервалах рН, аерації і температури. Проте накопичення максимальної кількості лінкоміцину спостерігається тільки в строго певних умовах, значно більш специфічних, ніж умови для зростання продуцента.

Утворення лінкоміцину пов'язане з певним періодом життєдіяльності культури. У перший період розвитку культури переважають конструктивні процеси, спостерігається інтенсивне зростання міцелія, що відрізняється гомогенною базифільною протоплазмою, багатою білками і фосфорними з'єднаннями, головним чином нуклеїновими кислотами. В цей час швидко споживаються джерела вуглецю, азоту і мінерального фосфору і інтенсивно використовується розчинений в культуральній рідині кисень. Утворення лінкоміцину в цей період не спостерігається. Більш того, в культуральній рідині в невеликій кількості накопичуються піровиноградна і оцтова кислоти, які далі використовуються для синтезу молекули лінкоміцину. Біосинтез лінкоміцину здійснюється в другий період розвитку культури, що характеризується зниженням інтенсивності зростання продуцента, швидкістю споживання ним основних компонентів середовища і розчиненого кисню. Накопичення піровиноградної і оцтової кислот в цей період не спостерігається. Міцелії відрізняється слабкою базифілією і добре вираженою диференціацією протоплазми. Вміст білка і фосфорних з'єднань, особливо РНК, в ньому значно нижче, ніж в перший період розвитку [18].

Культурі *S. lincolnensis* властивий ранній розпад на глибинні спори з подальшим проростанням цих спор і обривків і утворенням вторинного міцелія. Із сказаного виходить, що початкове середовище ферментації не є сприятливим для біосинтезу антибіотиків. Лінкоміцин утворюється в умовах, що відрізняються від початкових. До моменту інтенсивного утворення лінкоміцину концентрація поживних речовин в середовищі значно нижче початкової, а розчинений мінеральний фосфор відсутній. Проте обов'язковою умовою утворення лінкоміцину є наявність достатньої кількості вуглеводів і деякої кількості азоту до кінця процесу ферментації. Умови, сприятливі для біосинтезу лінкоміцину, створюються в процесі зростання культури. Тому середовище ферментації повинне забезпечувати не тільки інтенсивне зростання міцелія в перший період ферментації, але і сприятливі умови для біосинтезу антибіотика в другий період. Необхідно, не тільки щоб в середовищі були присутні всі потрібні для зростання культури і біосинтезу лінкоміцину компоненти в сприятливій формі, але щоб їх співвідношення і концентрація були також оптимальними [4].

S. lincolnensis росте на середовищах з різноманітними моно-, ди- і полісахаридами: крохмалем, декстрином, мальтозою, фруктозою і так далі.

Продуцент не споживає лактозу і сахарозу. Кращим джерелом вуглецю для біосинтезу лінкоміцину є картопляний крохмаль, зазвичай той що використовується у виробництві цих антибіотиків. Як джерело крохмалю може бути використана також кукурудзяне або пшеничне борошно. З інших джерел вуглецю продуценти лінкоміцину використовують органічні кислоти (оцтову, лимонну, молочну, янтарну), багатоатомні спирти (гліцерин, сорбіт, маніт), а також тваринні і рослинні жири. Стимулюючу дію на утворення лінкоміцину має молочна кислота. Багато жирів і масел використовуються продуцентами лінкоміцину як за відсутності інших джерел вуглецю, так і разом з вуглеводами. Додавання різних жирів як піногасників в процесі ферментації, у ряді випадків, робить позитивний вплив на зростання продуцентів і біосинтез лінкоміцину, особливо якщо в середовищах міститься недостатня кількість вуглеводів. Додавання надлишку жиру (3% і більш), як правило, несприятливо для

біосинтезу лінкоміцину. Продукент добре росте і утворює лінкоміцин на середовищах з амонійними солями як єдині джерела азоту. Нітратний азот значно менш сприятливий як для зростання, так і для біосинтезу антибіотиків.

Як джерело фосфору часто використовується кукурудзяний екстракт. При визначенні кількості кукурудзяного екстракту в середовищі ферментації повинен враховуватися вміст в ньому фосфору. У синтетичні середовища фосфор вносять у вигляді фосфорнокислих солей. У кукурудзяному екстракті міститься від 5 до 25 % молочної кислоти. У зв'язку з тим, що молочна кислота сприятливо впливає на біосинтез лінкоміцину, бажано використовувати кукурудзяні екстракти з високим вмістом молочної кислоти.

У середовищах повинні бути присутніми також деякі метали, зокрема магній, марганець, залізо, цинк, мідь, які вносяться до синтетичних середовищ у вигляді мінеральних солей, найчастіше сульфатів. У комплексні середовища мінеральні елементи зазвичай не додають. Слід мати на увазі, що деякі метали, зокрема залізо, утворюють з лінкоміцином біологічно неактивні комплекси, тому надлишок заліза може різко понизити активність культуральної рідини. Оптимальною концентрацією заліза є 20-40 мг/мл. Збільшення концентрації заліза в середовищі до 100-150 мг/мл помітно знижує утворення антибіотика.

Велике значення для зростання продукента і біосинтезу лінкоміцину має рН середовища. Оптимальним є рН 6,9-7,4, встановлюваний зазвичай в початковому середовищі. Процес біосинтезу лінкоміцину протікає при рН від 7 до 7,5. Нижчий або вищий рН несприятливо відбивається на біосинтезі лінкоміцину, тому в середовище для біосинтезу лінкоміцину додають вуглекислий кальцій, який нейтралізує аніони, що звільняються при споживанні амонійних солей, і органічні кислоти, що утворюються в процесі обміну речовин актиноміцетів, і таким чином підтримує рН культуральної рідини на рівні, сприятливому для зростання продукентів і біосинтезу антибіотиків. Крім того, вуглекислий кальцій утворює з лінкоміцином нерозчинні комплекси, тим самим знижуючи концентрацію розчинених в культуральній рідині антибіотиків, що надають токсичну дію на продукенти [2, 25].

Для отримання максимальної кількості лінкоміцину необхідно, щоб співвідношення основних компонентів (вуглеводів, азоту і фосфору) в середовищі було строго визначеним. Недолік одного з цих компонентів веде до передчасної зупинки зростання, зменшення ваги міцелія, ранньому автолізу і зниженню інтенсивності біосинтезу антибіотиків. При надлишку вуглеводів в середовищі значна їх частина залишається неспожитою до кінця ферментації. Кількість міцелія і активність культуральної рідини практично не збільшуються в порівнянні з показниками, отриманими на середовищі з оптимальною концентрацією вуглеводів. Надлишок азоту в середовищі приводить до деякого збільшення кількості міцелія, що супроводжується ранішим використанням вуглеводів і деяким зниженням інтенсивності біосинтезу унаслідок недоліку вуглеводів для побудови молекул лінкоміцину.

Особливо великий вплив на біосинтез лінкоміцину надає надлишок неорганічного фосфору в середовищі. При цьому прискорюється зростання продуцента, споживання вуглеводів, відбувається накопичення піровиноградної і оцтової кислот, різко падає антибіотична активність. Мабуть, мінеральний фосфор є основним регулятором переходу культури з фази зростання у фазу біосинтезу антибіотика. Оптимальною для біосинтезу є така концентрація фосфору, при якій він повністю споживається в перший період ферментації, і його відсутність лімітує подальше зростання продуцента за наявності в середовищі достатньої кількості вуглеводів і азоту, необхідних для утворення лінкоміцинової молекули. В цьому випадку основне значення має розчинений неорганічний фосфор, який навіть при великому вмісті в середовищі швидко використовується продуцентом. Слід мати на увазі, що вуглекислий кальцій зв'язує частину розчиненого мінерального фосфору в середовищі, знижуючи його концентрацію [26, 27].

Одночасне пропорційне збільшення концентрації основних компонентів середовища приводить до утворення відповідно більшої кількості антибіотика, що пов'язане із збільшенням кількості міцелія при збереженні сприятливого для біосинтезу лінкоміцину умов. При такому збільшенні концентрації компонентів

спостерігаються ті ж закономірності зростання і розвитку міцелія і зміни складу культуральної рідини, які мають місце на менш концентрованому середовищі.

Істотний вплив на інтенсивність біосинтезу лінкоміцину роблять умови аерації. Продуценти лінкоміцину відносяться до аеробних мікроорганізмів. Їх зростання і утворення ними антибіотиків можливі тільки в умовах посиленої аерації. Погіршення умов аерації і навіть короточасні перерви в аерації, особливо в ранній період розвитку, несприятливо впливають на зростання продуцентів і негативно позначаються на біосинтезі лінкоміцину. Культура *S. lincolnensis* для зростання і біосинтезу потребує порівняно меншої кількості розчиненого кисню. Використання більш концентрованих середовищ, на яких утворюється більше міцелія, вимагає посилення аерації.

Велике значення для біосинтезу лінкозамідів має температура культивування. Оптимальною температурою ферментації є 27-28 °С.

Описано ряд речовин, стимулюючих біосинтез лінкоміцину.

До них відносяться β -індолоцетова, фенілоцетова, α -нафтилоцетова і йодоцетова кислоти, бензальдегід, парадиметиламінобензальдегід, фенілацетамід і ін. Проте всі ці речовини втрачають свій вплив при проведенні ферментації на комплексних середовищах, а також при використанні високоактивних штамів. Виключення представляє роданистий бензил [33, 18].

Виділення і хімічне очищення. Процес виділення лінкоміцинових антибіотиків з культуральної рідини включає звичайні для виробництва антибіотиків стадії: попередню обробку культуральної рідини, концентрування антибіотиків і отримання технічних продуктів або концентратів, отримання товарних продуктів. Особливе значення для підвищення виходу і поліпшення якості товарних продуктів має виключення з технологічного процесу умов, що викликають розщеплювання антибіотиків і утворення речовин, які забруднюють антибіотики (епімерів, продуктів окислення).

Попередня обробка культуральної рідини. Лінкозамідні антибіотики утворюють нерозчинні з'єднання з багатьма речовинами, присутніми в культуральній рідині (солями кальцію і магнію, деякими амінами, білками і

іншими продуктами). В процесі ферментації ці нерозчинні з'єднання накопичуються на міцелії, концентрація Лінкозамідних антибіотиків в розчині залишається невисокою. Наприклад, концентрація лінкоміцину в кінці ферментації складає 5900-6000 мкг/мл. Найбільш поширені такі методи виділення лінкозамідних антибіотиків, які при первинній обробці культуральної рідини забезпечують перехід активної речовини в розчин, можливе повніше осадження домішок, відділення міцелія і потім виділення антибіотика з нативного розчину. Розчинення лінкозамідних антибіотиків досягається підкисленням культуральної рідини до рН 1,5-2,0. Одночасно з цим осаджують іони заліза, іони кальцію (частково або повністю), коагулюють білки, щоб забезпечити хорошу фільтрованість рідини.

Найчастіше для підкислення застосовують щавлеву кислоту або щавлеву кислоту в суміші з мінеральною кислотою. Відомі методи, коли застосовують тільки мінеральну кислоту (сірчану, соляну). Використання щавлевої кислоти має певні переваги: при обробці досягається видалення іонів кальцію, випадний оксалат кальцію полегшує коагуляцію білків і освітлює розчин, в результаті виходить рідина, що добре фільтрується. Недоліком застосування щавлевої кислоти є її відносно висока вартість, а також різке зростання швидкості епімеризації лінкоміцину в щавлевокислих розчинах (вплив оксалат-іонів). Для уповільнення епімеризації вводять охолодження при обробці культуральної рідини, отриманні і переробці нативного розчину, скорочують тривалість цих процесів.

2.2.3. Обробка і фільтрації культуральної рідини

Після закінчення ферментації культуральну рідину охолоджують в теплообміннику з неіржавіючої сталі типу труба в трубі (1) розсолем до 10°C. Обробку кислотою ведуть в плоскодонному апараті з мішалкою (2), де до культуральної рідини при перемішуванні додають щавлеву кислоту і жовту кров'яну сіль (для осадження іонів заліза). Фільтрацію обробленої культуральної рідини здійснюють на рамних фільтр-пресах (3), заправлених перхлорвеніловою тканиною або бельтингом з байкою (швидкість фільтрації 20-40 л/хв•м²).

Вологість осаду 80-90 %. Для фільтрації можуть бути використані барабанні вакуум-фільтри з насосним шаром або полотном, що саморегенерується. Все устаткування захищають антикорозійним покриттям.

На рис. 2.3 представлена апаратурна схема обробки і фільтрації культуральної рідини.

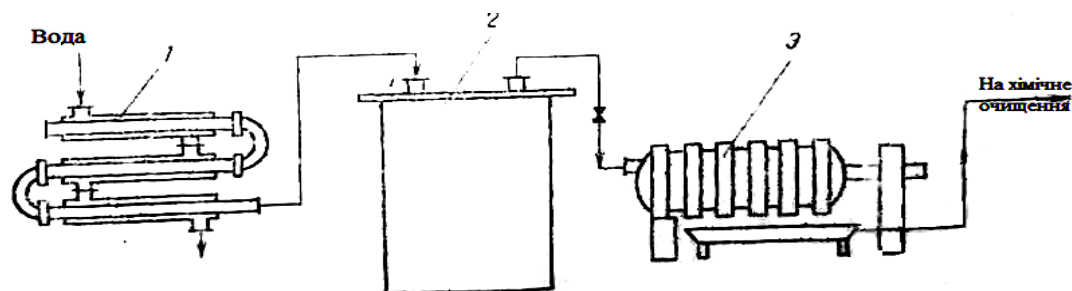


Рис. 2.3. Апаратурна схема обробки і фільтрації культуральної рідини

1 – теплообмінник, 2 – плоскодонний апарат з мішалкою, 3 – рамні фільтр-преси

Після виділення і хімічного очищення антибіотика його необхідно висушити – видалити з отриманого препарату вільну і зв'язану воду. Оскільки більшість антибіотиків в тому або іншому ступені термолабільні, для їх висушування необхідно застосовувати методи, що не приводять до втрати біологічної активності і не змінюють колір препарату.

На сучасному етапі промислового отримання антибіотиків використовують різні методи зневоднення препаратів. Широкого поширення набула ліофільна сушка антибіотиків, яка проводиться при порівняно низьких температурах (-8, -12 °C).

Прогресивним методом при роботі з великими кількостями антибіотика є висушування із застосуванням розпилювальної сушарки. Розчин антибіотика пневматично розпилюється до найдрібніших крапель в камері потоком нагрітого повітря. Процес висушування антибіотиків протікає протягом кількох секунд. При цьому навіть термолабільні препарати не міняють своїх властивостей.

Готовий антибіотик піддається ретельному біологічному контролю.

Біологічний контроль дозволяє визначити стерильність готового препарату. Для цього використовують, як правило, два методи. Перший пов'язаний з інактивацією антибіотика і висівом його у відповідне поживне середовище.

Другий метод визначення стерильності антибіотиків визначається тим, що для більшості цих сполук немає біологічних інактиваторів їх біологічної активності. Тому у контрольованих препаратах виявляють наявність стійких до них форм мікроорганізмів, а також визначають можливу присутність чутливої мікрофлори.

Для визначення можливої присутності в препаратах чутливих до них бактерій розчин антибіотиків пропускають через мембранні фільтри (діаметр пор не більше 0,75 мкм) [28].

Розфасовка і упаковка антибіотика – завершальний етап виробництва. Розфасований і упакований антибіотик з вказівкою показника біологічної активності, дати випуску і терміну придатності поступає в продаж [28].

2.3. Визначення антимікробної активності лінкоміцину

Визначення антимікробної активності антибіотиків ґрунтується на їх здатності пригнічувати ріст мікроорганізмів. Визначення проводять методом дифузії в агар на твердому поживному середовищі шляхом порівняння розмірів зон пригнічення росту тест-мікроорганізмів, що утворюються при випробуванні розчинів відомих концентрацій Державного стандартного зразка і випробовуваного препарату антибіотика [29].

Антимікробна активність антибіотиків виражається в одиницях дії – ОД. Для більшості антибіотиків 1 ОД відповідає 1 мкг активної речовини.

Стандартні зразки, що використовуються для кількісного визначення, являють собою речовини, активність яких точно встановлена відповідно до міжнародного стандартного препарату. Стандартні зразки антибіотиків затверджуються і розсилаються Державним науково-дослідним інститутом по

стандартизації і контролю лікарських засобів Міністерством охорони здоров'я України, зберігаються і використовуються відповідно до рекомендацій, вказаних на етикетці стандартного зразка.

Кількісне визначення лінкоміцину проводять біологічним методом дифузії в агар з використанням трьохдозного варіанту із тест-мікробом *Bacillus pumilus* NCTC 8241 СІР 76.18 за фармакопейним стандартним зразком лінкоміцину гідрохлориду (ФСЗ Державної фармакопеї України) відповідно до вимог ГФ ХІ, вип. 2, с. 213 [29].

У чашки Петрі, встановлені на столиках із строго горизонтальною поверхнею, розливають розплавлені поживні середовища певного складу в один або два шари.

При кількісному визначенні лінкоміцину для нижнього шару використовують незасіяне середовище № 6, а для верхнього шару – агарове середовище № 6, що заздалегідь засівається тест-мікробом *Bacillus pumilus* NCTC 8241 СІР 76.18.

Якщо культура є суспензією вегетативних клітин, то температура розплавленого середовища, в яке вносять тест-мікроб, повинна бути (49 ± 1) °С, при використанні суспензії спор – 65-70 °С. До середовища слід додати таку кількість суспензії вегетативних клітин або спор, яке забезпечує оптимальний ріст тест-мікробу і чіткість зон пригнічення його росту. В даному випадку використовують таку посівну дозу – $5 \cdot 10^7$ спор на 1 мл середовища [29].

Для визначення використовують середовище № 6 наступного складу:

панкреатичний гідролізат м'яса (за Хоттінгеном) – 5 г;

- динатрію гідрофосфат – 3 г;

- агар – 15 г;

- вода очищена – до 1000 мл.

Глюкозу додають у розплавлене поживне середовище у вигляді стерильного 40 %-го розчину. Середовище має містити від 30 мг % до 35 мг % амінного азоту. рН середовища повинен бути рівним 7,9. Кількість поживного

середовища на одну чашку Петрі діаметром 100 мм становить 20 мл для нижнього шару і 5 мл для верхнього шару.

Шість стерильних циліндрів єдиного розміру і маси, висотою $(10,0 \pm 0,1)$ мм і внутрішнім діаметром $(6,0 \pm 0,1)$ мм, з неіржавіючої сталі або алюмінію розставляють на поверхні середовища, що засівається, на рівній відстані один від одного і від краю чашки. Замість циліндрів можуть бути використані лунки діаметром від 6 до 8 мм, зроблені в товщі агару за допомогою стерильного свердла або іншого відповідного пристосування.

Для проведення випробування готують три розчини стандартного зразка (С31, С32, С33) і три розчини випробовуваного зразка (В31, В32, В33). Концентрації розчинів, що містять малу, середню і велику дози, повинні знаходитися між собою в кратному співвідношенні (1:2:4) [29].

У циліндри або лунки кожної чашки вносять рівні об'єми робочих розчинів стандартного і випробовуваного зразків таким чином, щоб розчини з великими концентраціями не стикалися між собою. Можна закапувати розчини в циліндри чи лунки наступним чином: С31→В33→С32→В31→С33→В32. Послідовність внесення розчинів стандартного і випробовуваного зразків в циліндри або лунки кожної чашки повинно бути наступною: першим вносять розчин з малою концентрацією стандартного зразка (С31) і відповідний розчин випробовуваного зразка (В31). Потім розчини з середньою концентрацією (С32 і В32), останніми вносять розчини з великими концентраціями (С33 і В33).

Основні розчини стандартних і випробовуваних зразків готують в стерильних розчинниках (буферний розчин № 4 при визначенні лінкоміцину). Концентрація основного розчину становить 2 мкг/мл. Потім з основних розчинів готують робочі розчини трьох концентрацій випробовуваного зразка і розчини трьох концентрацій стандартного зразка [29].

Робочі розчини випробовуваних зразків готують з основних розчинів так, щоб їх концентрації не мали істотних відмінностей від концентрацій розчину стандартного зразка. Для приготування основного розчину 5 мл випробовуваного препарату поміщають у мірну колбу місткістю 200 мл, доводять об'єм розчину

буферним розчином №4 до позначки (основний розчин з концентрацією 1000 мкг/мл). Буферний розчин № 4 готують наступним чином: 50 мл 0,2 М розчину калію гідрофосфату змішують з 46,8 мл 0,2 М розчину натрію гідроксиду; об'єм доводять до 200 мл свіжоприготованою методом дистиляції водою [29]. Далі готують робочі розчини випробуваного препарату, використовуючи піпетки «Еппендорф»:

0,1 мл основного розчину поміщають у мірну колбу 100 мл, доводять об'єм розчину до позначки (робочий розчин з концентрацією 1 мкг/мл);

- 0,2 мл основного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, доводять об'єм розчину до позначки (робочий розчин з концентрацією 2 мкг/мл);

- 0,4 мл основного розчину поміщають у мірну колбу 100 мл, доводять об'єм розчину до позначки (робочий розчин з концентрацією 4 мкг/мл).

Для приготування основного розчину СЗ лінкоміцину наважку, яку розраховують за формулою (2.1) поміщають в мірну колбу місткістю 10 мл, розчиняють у 5 мл буферного розчину № 4, доводять об'єм розчину буфером № 4 до позначки та перемішують.

Масу наважки СЗ лінкоміцину (M), у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$M = \frac{A_p \cdot V}{A_{cm}},$$

де A_p – активність 1 мл СЗ лінкоміцину сульфату, зазначена у сертифікаті якості СЗ лінкоміцину гідрохлориду, у мікрограмах;

V – об'єм ємкості для розведення, у мілілітрах;

A_{cm} – активність 1 мг СЗ лінкоміцину гідрохлориду, зазначена у сертифікаті якості СЗ лінкоміцину гідрохлориду, у мікрограмах.

Для зменшення впливу коливань в часі між закапуванням розчинів, що використовуються в досліді, рекомендується після їх внесення витримувати

чашки при кімнатній температурі протягом 1-2 год. Потім чашки інкубують при температурі 30-35 °С протягом 18-20 год [13].

Число чашок, що використовуються в кожному досліді, повинне бути достатнім для забезпечення статистичної достовірності результатів, але не менше 6 чашок.

Діаметри зон пригнічення росту тест-мікроба за допомогою відповідних приладів вимірюють з точністю до 0,1 мм.

Розрахунок активності і дисперсійний аналіз при використанні трьохдозного варіанту методу дифузії в агар здійснюється відповідно до статті «Статистична обробка результатів хімічного експерименту і біологічних випробувань» (ГФ XI, вып. 1, с. 199). У розділі 11.5 даної статті розчини певних концентрацій стандартного (СЗ) і випробовуваного (ВЗ) зразків позначені DS і DU відповідно [29].

Після вимірювання зон пригнічення росту тест-мікроба результати дослідів y_{ij}^S і y_{ij}^U ($i = 1, 2, 3$ – номери доз, $j = 1, 2, \dots, n$ – номери чашок) записують в таблицю (табл. 2.1). Там же записують отримані методом розрахунку наступні допоміжні величини:

Суми по чашках для кожної дози стандарту і випробовуваного зразка:

$$S_i = \sum_j y_{ij}^S \quad U_i = \sum_j y_{ij}^U$$

Суми по всіх дозах для кожної чашки:

$$T_j = \sum_i y_{ij}^S + \sum_i y_{ij}^U$$

Суми всіх діаметрів зон затримки росту окремо для стандарту і для випробовуваного зразка:

$$S = S_1 + S_2 + S_3 \quad U = U_1 + U_2 + U_3$$

Суми всіх діаметрів зон затримки росту тест-мікроба по всіх дозах і чашках:

$$y = \sum_{i,j} y_{ij} = S + U = \sum_j T_j$$

Далі обчислюють «лінійні контрасти» для стандарту і для випробовуваного зразка за формулою [13]

$$L_S = S_3 - S_1 ; L_U = U_3 - U_1$$

Таблиця 2.1

Результати вимірювання зон пригнічення росту тест-мікроба

Ном ер чашки	Стандартний зразок			Випробувальний зразок			Су ми по всім дозам для кожної чашки
	D_1^S	D_2^S	D_3^S	D_1^U	D_2^U	D_3^U	
1	y_{11}^S	y_{21}^S	y_{31}^S	y_{11}^U	y_{21}^U	y_{31}^U	T_1
2	y_{12}^S	y_{22}^S	y_{32}^S	y_{12}^U	y_{22}^U	y_{32}^U	T_2
3	y_{13}^S	y_{23}^S	y_{33}^S	y_{13}^U	y_{23}^U	y_{33}^U	T_3
4	y_{14}^S	y_{24}^S	y_{34}^S	y_{14}^U	y_{24}^U	y_{34}^U	T_4
5	y_{15}^S	y_{25}^S	y_{35}^S	y_{15}^U	y_{25}^U	y_{35}^U	T_5
6	y_{16}^S	y_{26}^S	y_{36}^S	y_{16}^U	y_{26}^U	y_{36}^U	T_6
Сум и по всім чашках для кожної дозы	S_1	S_2	S_3	U_1	U_2	U_3	y

Для перевірки законності подальших розрахунків слід провести дисперсійний аналіз результатів дослідження [29].

Якщо дисперсійний аналіз дав потрібний результат (тобто виконуються вказані умови), то обчислюється логарифм відношення активностей випробовуваного зразка і стандарту по формулі:

$$M = \lg \frac{A_U}{A_S} = \frac{4}{3} \cdot I \cdot \frac{U - S}{L_U + L_S} ,$$

де A_U і A_S – активності, що відповідають робочим розчинам; I – логарифм знаменника прогресії розведення ($I = \lg X$, де X – розведення). Тоді відношення активностей розраховують наступним чином:

$$R = \text{antilg } M = 10^M$$

Щоб знайти відношення активностей основних розчинів a_U/a_S , треба помножити величину R на коефіцієнт, що враховує відповідні (наприклад, максимальні) ступені розведення основних розчинів стандарту і зразка (γ_S і γ_U). Тоді маємо:

$$a_U = a_S \cdot R \cdot \frac{\gamma_U}{\gamma_S \text{ Од/мл.}}$$

Точність випробування повинна бути такою, щоб вірогідні межі при $P=95\%$ відхилялись від середнього значення не більше, ніж на $\pm 5\%$.

1 одиниця дії (ОД) відповідає 1 мкг лінкоміцину.

2.4. Визначення лінкоміцину в організмі людини

Суть методу полягає в екстракції Лінкозамідів із зразка екстракційним буферним розчином [30]; очищення та концентрування отриманого екстракту з використанням картриджа для твердофазної екстракції і подальшої ідентифікації та визначенні змісту цих антибіотиків методом обернено-фазової ВЕРХ з використанням рідинного хроматографа зі спектрофотометричним детектором при довжині хвилі детектування 350 нм.

Орієнтовний час підготовки проби – 2 години. Час хроматографічного аналізу – 30 хвилин.

Діапазон вимірюваних масових часток лінкоміцину при масі наважки аналізованої проби 10 г становить 0,01-5 мг/кг. Згідно СанПіН 2.3.2.1078-01 з урахуванням СанПіН 2.3.2.2804-10, вміст лінкоміцину в продуктах тваринного походження не допускається (менше 0,01 мг/кг).

При виконанні вимірювань застосовуються такі обладнання та реактиви:

рідинний хроматограф зі спектрофотометричним детектором;
хроматографічна колонка з предколонкою, заповнені обернено-фазовим сорбентом.

Картриджі для твердофазної екстракції;

- пристрій для перемішування проб;
- лабораторна центрифуга (не менше 4000 об/хв);
- лабораторний вакуумний насос (мембранний або водострумний);
- пристрій для видалення розчинника;
- пристрій для подрібнення проби;
- лінкоміцин, вміст основної речовини не менше 95 %;
- амоній щавлевокислий, 1-водний, х.ч.;
- Трилон Б, х.ч.;
- кислота трифтороцтова;
- кислота лимонна, 1-водна, х.ч.;
- натрій фосфорнокислий двоаміщений, 2-водний, ч.д.а.;
- ацетонітрил для рідинної хроматографії, ос.ч.;
- метиловий спирт, або карбинол, х.ч.

Збір, обробку і виведення даних здійснюють за допомогою персонального комп'ютера з ОС не нижче «Windows®2000/XP», на якому встановлена відповідна програма збору та обробки даних.

2.5. Визначення лінкоміцину в повітрі робочої зони

Метод заснований на здатності фенольної групи молекули лінкоміцину вступати у взаємодію з хлорним залізом у кислому середовищі з утворенням забарвленого продукту [26]. Мінімальна кількість антибіотику, яку можливо визначити – 1 мкг/мл.

Реактиви та апаратура. Стандартні розчини лінкоміцину гідрохлориду в концентрації 0,0125; 0,025; 0,0375 мг/мл готують розчиненням відповідних

наважок стандартного зразка кристалічного лінкоміцину з активністю 890 мг/мл в 0,01 н НСІ. Розчини можуть зберігатися 10-12 днів.

Глікоколовий буфер, рН 2,3-2,4, отримують шляхом змішування рівних об'ємів 0,1 н НСІ і 0,2 н глікоколу (15,17 г глікоколу і 11,7 г натрію хлористого, ГОСТ 4233-48, вода до 1 л).

Залізо хлорне окисне, ГОСТ 4174-48, 0,03 – відсотковий розчин в глікоколовому буфері. Наважку хлорного заліза (30 г) розчиняють в 0,5 л глікоколового буфера, визначають точний зміст хлорного заліза йодометрично і з відтитрованого розчину готують 0,03-відсотковий розчин FeCl в глікоколовому буфері. Розчин стійкий 3 дні.

Застосовувані посуд і прилади: повітродувка, колби Ерленмейера на 50 мл, піпетки Мора на 5, 10 і 15 мл, фільтри з тканини ФПП, фотоелектроколориметр.

Відбір проби повітря. Поглинання пилу лінкоміцину з повітря відбувається на фільтри з тканини ФПП зі швидкістю до 20 л/хв (5 л повітря).

Опис визначення. Фільтр з пробою за допомогою пінцета переносять в хімічний стакан або велику широку пробірку, розправляють, заливають 15 мл 0,01 н НСІ. При періодичному перемішуванні залишають на 35-40 хв. для розчинення антибіотика. Після закінчення зазначеного часу в колбу Ерленмейера відбирають 10 мл проби і аналізують за способом, описаному при побудові градуювального графіка.

Побудова градуювального графіка. Наважки, взяті на аналітичних вагах, розчиняють в 0,01 н НСІ для отримання стандартних розчинів з концентраціями 0,0125; 0,025; 0,0375 мг/мл лінкоміцину. З кожного стандартного розчину в колби Ерленмейера відбирають по 10 мл розчину антибіотика, додають по 15 мл 0,3 – процентного розчину FeHCl в глікоколовому буфері, поміщають в темне місце на 20-25 хв., потім переливають в кювету з товщиною шару 5 см. Пофарбовані розчини колориметрируют по відношенню до контролю (контроль: 10 мл води + 15 мл, 03-процентного FeCl) при синьому світлофільтрі. Забарвлення розчинів стійке тривалий час. Концентрацію антибіотика в мг/куб. м повітря X розраховують за формулою:

$$X = \frac{G \cdot V_1 \cdot 1000}{V \cdot V_0},$$

де, G – кількість речовини, мг, знайдених в аналізованому об'ємі;

V1 – загальний об'єм проби, мл;

V – об'єм проби, взятий для аналізу, мл;

V0 – об'єм повітря (л), відібраний для аналізу та приведений до нормальних умов за формулою.

Приведення об'єму повітря до нормальних умов відбувається згідно з газовими законами Бойля-Маріотта і Гей-Люссака за такою формулою :

$$V_0 = \frac{V_t \cdot 273 \cdot P}{(273 + t) \cdot 760'}$$

де, Vt – об'єм повітря, відібраний для аналізу, л;

P – барометричний тиск, мм.рт.ст.;

t – температура повітря в місці відбору проби, °C.

2.5. Висновки до розділу

Було розглянуто матеріали та методи досліджень. Визначення антимікробної активності антибіотиків засноване на їх здатності пригнічувати ріст мікроорганізмів. Визначення проводять методом дифузії в агар на твердому поживному середовищі шляхом порівняння розмірів зон пригнічення росту тест-мікроорганізмів, що утворюються при випробуванні розчинів відомих концентрацій Державного стандартного зразка і випробовуваного препарату антибіотика.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Результати дослідження середовищ культивування

Для культивування селекціонованого штаму *S. lincolnensis* ATCC 25466 було досліджено 4 варіанти поживних середовищ (табл. 3.1.).

Варіант поживного середовища 1. Культуру штаму засівають на посівне середовище наступного складу, %: борошно кукурудзяне 7,0; борошно соєве 0,5; екстракт кукурудзяний 4,8; амоній сірчаноокислий 0,6; рН 6,5; крейда 1,0; все інше вода.

Вирощування проводять при температурі 28 °С на гойдалці з числом оборотів 200 об/хв протягом 168 год.

Отриманим посівним матеріалом у кількості 6 % засівають ферментаційне середовище наступного складу, %: борошно кукурудзяне 12,0; екстракт кукурудзяний 2,8; амоній сірчаноокислий 1,4; крейда 1,4; жир риба'ячий 3,6; кобальт хлористий 0,0003; лапрол 0,06, все інше вода.

Ферментацію проводять протягом 168 год при температурі 28 °С на гойдалці з числом оборотів 200 об/хв. Вміст лінкоміцину визначають спектрофотометричним методом, що складає 22 мг/мл.

Варіант поживного середовища 2. Посівний матеріал готують, як зазначено у варіанті 1. Отриманим посівним матеріалом засівають середовище наступного складу, %: борошно кукурудзяне 12,0; екстракт кукурудзяний 2,0; 4,0; амоній сірчаноокислий 1,4; крейда 1,6; жир риба'ячий 3,6; кобальт хлористий 0,0003; лапрол 0,06; все інше вода.

Ферментацію проводять, як у варіанті 1. Вміст лінкоміцину в культуральній рідині становить до кінця процесу 24 мг/мл.

Склад поживних середовищ для культивування продуцента лінкоміцину

Компоненти поживного середовища	Вміст, %			
	Варіант 1	Варіант 2	Варіант 3	Варіант 4
кукурудзяне борошно				
кукурудзяний екстракт				
сірчаноокислий амоній				
крейда				
риб'ячий жир				
хлорид кобальту				
лапрол				
амілосубтілін				
Умови культивування	Час – 192 год, t – 27 °С, pH – 5,6 об/хв	час – 192 год, t – 27 °С, pH – 5,6 об/хв	час – 168 год, t – 27 °С, pH – 5,6 об/хв	Час – 168 год, t – 27 °С, pH – 5,6 об/хв
Вихід лінкоміцину, мг/мл				

Варіант поживного середовища 3. Посівний матеріал вирощують на середовищі, зазначеного у варіанті 1, причому роблять дві генерації. Матеріалом другої генерації засівають посівне середовище такого ж складу в посівному апараті місткістю 750 л, коефіцієнт заповнення становить 0,33. Температура вирощування 27 °С, число оборотів мішалки 180 об/хв, надлишковий тиск 0,04-0,05 МПа. Для піногасіння в апарат вносять 0,5 % рослиної олії, повітря подають в апарат у кількості 1 обсяг завантаженого поживного середовища в хвилину [14].

Процес вирощування посівного матеріалу в посівному апараті ведуть протягом 25-35 год, після чого передають в ферментатор, в який попередньо завантажують середовище наступного складу, %: борошно кукурудзяне 12,0;

екстракт кукурудзяний 2,8; амоній сірчаноокислий 1,0; крейда хімічно обкладена 1,4; кобальт хлористий 0,0003; рослину олію 2,0; амілосубтілін 0,005; все інше вода. Ферментатор заповнюють середовищем на 73 %.

Режим культивування штаму: температура 28°C, надлишковий тиск 0,04-0,05 МПа, аерація 1 обсяг на обсяг завантаженого середовища в хвилину. Тривалість ферментації становить 192 год. В процесі ферментації вносять сірчаноокислий амоній у вигляді 25%-ного розчину для підтримки вмісту амонійного азоту в середовищі в межах 20-40 мг% і розчин аміаку для підтримки рівня рН 6,6.

Для гасіння піни, утворюється в процесі ферментації використовують рослину олію [14].

Вміст лінкоміцину в отриманій культуральній рідині, визначений спектрофотометричним методом, становить 21 мг/мл.

Варіант поживного середовища 4. Підготовку та вирощування посівного матеріалу, процес ферментації проводять так само, як зазначено у прикладі 3, але використовують ферментаційне середовище наступного складу, %: борошно кукурудзяне 12,0; екстракт кукурудзяний 1,0; крейда 1,6; кобальт хлористий 0,0003; рослину олію; амілосубтілін 0,005; все інше вода. Вміст лінкоміцину в отриманій культуральній рідині в цьому випадку становить 24 мг/мл.

Для промислово виробництва лінкоміцину обираємо 4 варіант, оскільки при культивуванні на поживному середовищі 4-го варіанту відмічаємо:

- Час культивування на 24 год менший ніж при культивуванні на поживному середовищі 2-го варіанту (Рис 3.1)

Було проведено культивування отриманого штаму на традиційному поживному середовищі (табл. 3.2).

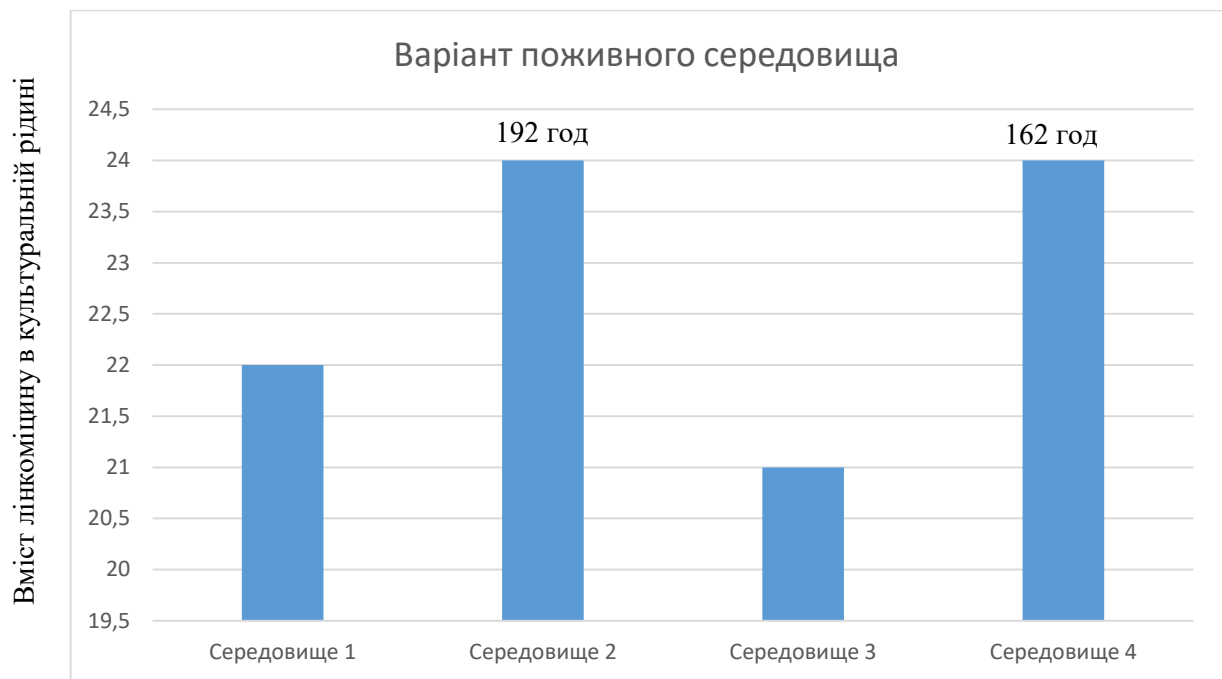


Рис. 3.1. Вміст лінкоміцину при культивуванні продуцента на різних поживних середовищах

Було проведено культивування отриманого штаму на традиційному поживному середовищі (табл. 3.2).

Таблиця 3.2.

Порівняльна стандартного та запропонованого поживних середовищ

Компоненти поживного середовища	Вміст, %	
	Стандартне поживне середовище	Запропоноване поживне середовище
кукурудзяне борошно	12,0	12,0
кукурудзяний екстракт	-	1,0
сірчаноокислий амоній	0,6	-
крейда	1,4	1,6
Рослинна олія	3,6	2,0

хлорид кобальту	0,0003	0,0003
Умови культивування	Час - 192 год, t – 28 оС, рН – 7 200 об/хв	Час - 168 год, t – 28 оС, рН – 7 180 об/хв
Вихід лінкоміцину, мг/мл	20	24

Показано, що при культивуванні культури *Streptomyces lincolnensis* (опроміненої ультрафіолетом) на стандартному поживному середовищі відмічається вихід антибіотику на 17 % менше, ніж при культивуванні на запропонованому.

Таким чином, штам вигідно відрізняється підвищеною здатністю до утворення лінкоміцину, оскільки дозволяє отримати в середньому 22,5 мг/мл цього антибіотику в культуральній рідині на 168 год ферментації, на відміну від штаму ЛТС-416, що дозволяє отримати 10 мг/мл на 192 год ферментації [16, 6].

3.2. Удосконалена технологічна схема виробництва антибіотику лінкоміцину

Удосконалена технологічна схема виробництва антибіотику лінкоміцину наведена на рис.3.4. Удосконалення відбувається на:

- Стадії вибору чистої культури *Streptomyces lincolnensis*. Використовуємо селекційний штам *Streptomyces lincolnensis* ATCC 25466, який опромінений ультрафіолетом.
- Стадії приготування поживного середовища. Обираємо 4 варіант поживного середовища.
- Стадії ферментації.

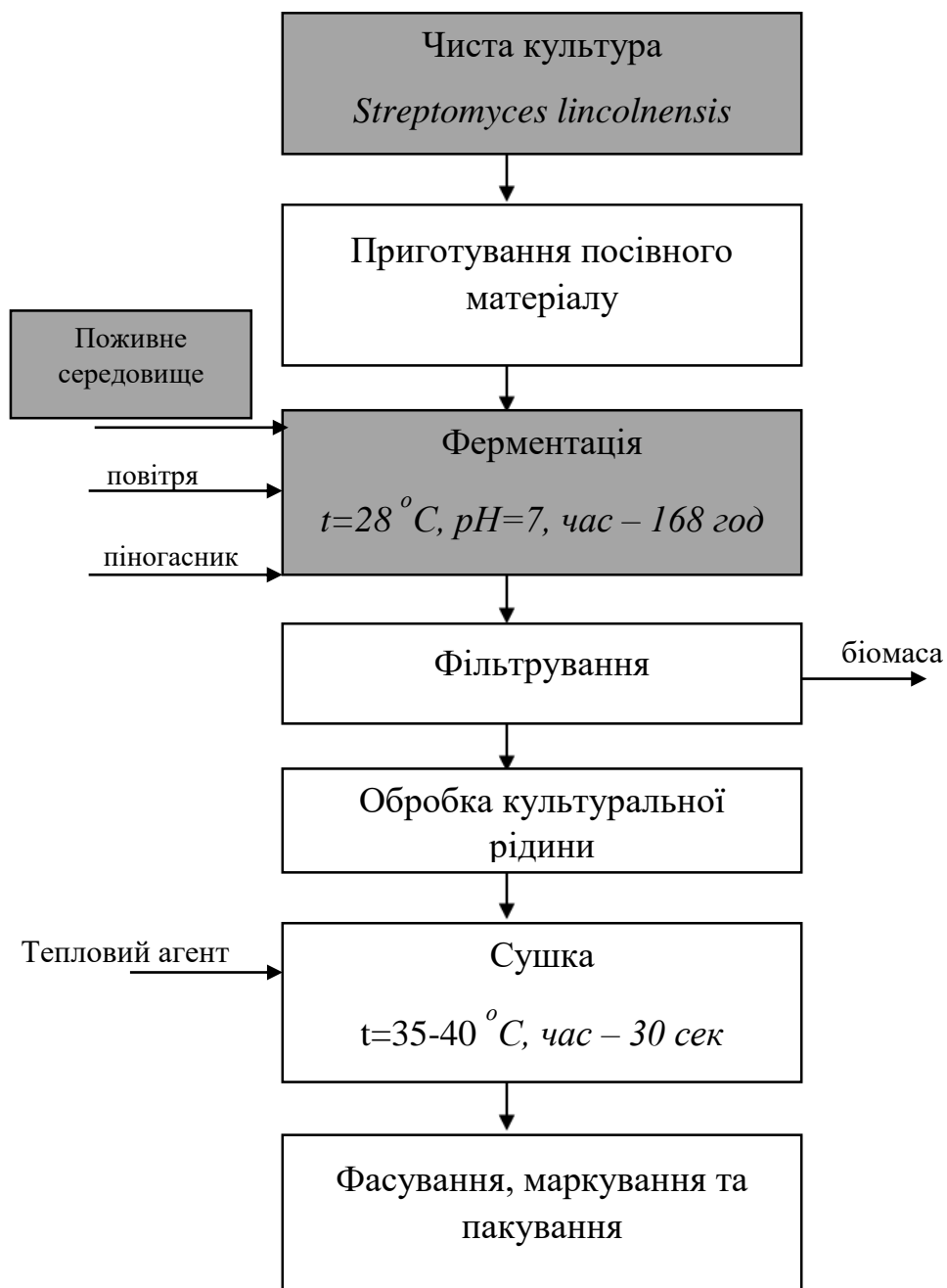


Рис. 3.1. Удосконалена технологічна схема виробництва антибіотику лінкоміцину

Переваги удосконаленої технологічної схеми виробництва антибіотику лінкоміцину в порівнянні з стандартною схемою:

Дозволяє отримати майже у два з половиною рази більше антибіотику.
Знизити час ферментації на 24 годин.

3.3. Показники АФІ Лінкоміцин по фарм статті

До того як Активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ) Лінкоміцин буде взято для виготовлення лікарського засобу, він має пройти контроль згідно фарм статті. Основні показники на які перевіряється АФІ наведено в таблиці 3.3.

Таблиця 3.3

Основні показники на які перевіряється АФІ

Опис	Кристалічний порошок білого або майже білого кольору
Ідентифікація	А. Інфрачервоний спектр субстанції має відповідати спектру СО <i>лінкоміцину гідрохлориду</i> В. Розчин субстанції дає реакцію на хлориди
Прозорість розчину	Розчин S має бути прозорим
Кольоровість розчину	Колір розчин S має бути не інтенсивніше еталону Y ₆
pH	Від 3,5 до 5,5
Оптичне обертання	Від +135° до 150°, в перерахунку на безводневу субстанцію
Супутні домішки	Домішки А – не більше 0,5% Домішки В - не більше 0,5% Домішки С – не більше 0,2% Будь яка неспецифічна домішка не більше 0,10%. Сума домішок – не більше 2,0%
Вода	Від 3,1% до 4,6%
Сульфатна зола	Не більше 0,5%

Бактеріальні ендотоксини	Менше 0,50 МЕ/мг
Залишкова кількість органічних розчинників	н-Бутанол – не більше 5000 ppm Октанол – не більше 2 ppm
Кількісне визначення	А. Вміст лінкоміцину гвдрохлориду та лінкоміцину В гідрохлориду в субстанції має бцуги не менше 96,0% і не більше 102,0%, в перерахунку на безводну речовину В. Вміст лінкоміцину В гідрохлориду в субстанції має бути не більше 5,0%, в перерахунку на безводну речовину

3.4. Висновки до розділу

Підсумовуючи матеріал викладений в розділі, можна зробити висновки, оскільки *Streptomyces lincolnensis* –продуцент лінкоміцину, основна кількість якого входить до складу ЛЗ Лінкоміцин, необхідно шукати методи підвищення біосинтезу цього антибіотику даним мікроорганізмом. Тому було отримано продуцент лінкоміцину *Streptomyces lincolnensis*. Отриманий продуцент володіє антибіотичною активністю, зниженою потребою в кисні. При вирощуванні на органічних рідких середовищах утворює до 24 мг/мл лінкоміцину.

Технологія виробництва антибіотику лінкміцину розпочинається етапів: підбір продуцента для отримання антибіотику, підбір поживного середовища для отримання антибіотику лінкоміцину, вибору чистої культури *Streptomyces lincolnensis*, приготування поживного середовища, стадії ферментації, культивування. Було запропоновано поживне середовище, яке дозволяє отримати у майже два з половиною рази більше антибіотику та знизити час ферментації на 24 години.

РОЗДІЛ 4

ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори при отриманні антибіотику лінкоміцину

Відповідно до ГОСТ 12.0.003-74 небезпечні і шкідливі виробничі фактори, підрозділяються за своєю дією на наступні групи [31]:

- фізичні;
 - хімічні;
 - біологічні;
 - психофізіологічні.
- В приміщенні, де відбуваються процеси отримання антибіотику лінкоміцину можуть бути такі небезпечні та шкідливі фізичні фактори виробничого середовища:
- недостатня освітленість робочої зони;
 - підвищена температура повітря в робочій зоні;
 - підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може відбутися через тіло людини.

Серед небезпечних та шкідливих хімічних факторів виробничого середовища виділяють наступні:

- токсичні;
- подразнюючі;
- Біологічні фактори:
- патогенні мікроорганізми та продукти їхньої життєдіяльності.

Недостатня освітленість робочої зони. Фактором, що визначає сприятливі умови праці, є раціональне освітлення робочої зони і робочих місць. Коли правильно розраховано і підібрано освітлення виробничих приміщень, очі працюючого протягом тривалого часу зберігають здатність добре розрізняти

предмети і знаряддя праці. Такі умови освітлення сприяють зниженню виробничого травматизму і професійного захворювання очей. Погане освітлення виробничої зони може призвести до погіршення якості виконуваних робіт, наприклад, можуть залишитися непоміченими розриви, що з'явилися, потертості, механічні домішки й інше, що, у свою чергу, призводить до зниження безпеки праці. Погане освітлення виробничих територій може стати причиною багатьох важких і смертельних випадків, таких, як наїзд самохідних засобів механізації, що рухаються.

Цей фактор є активним на протязі всього робочого часу, який проводиться на виробництві. Причинами недостатньої освітленості є забруднені вікна, недостатня кількість світильників, неправильне розміщення робочого місця оператора відносно вікна та відносно світильників.

Підвищена температура повітря в робочій зоні — шкідливий фактор, що виникає при віддачі нагрітими частинами обладнання тепла у повітря приміщення, де працюють люди. Такі процеси відбуваються під час стерилізації апаратури (інокуляторів, посівних апаратів, ферментерів) та комунікацій (матеріальних і посівних ліній). Розгалужена система комунікацій і апарати великої ємкості до 50 м³ є інтенсивними джерелами надходження надлишкового тепла у виробничі приміщення. В зв'язку з цим температура повітря може значно підвищуватися в момент стерилізації апаратів і перевищувати норму [22].

Внаслідок цього у людей погіршується тепловіддача тіла, підвищується втомлюваність, виникають розлади серцево-судинної та нервової системи.

Основними нормативними документами, що визначають параметри мікроклімату виробничих приміщень є ГОСТ 12.1.005–88 та ДСН 3.3.6.042–99.

Важливим небезпечним фактором є підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може відбутися через тіло людини. На виробництві використовується обладнання, яке живиться від електричного ланцюга змінного струму з величиною напруги 220 В. Може відбутися замикання цього ланцюга крізь тіло людини внаслідок випадкового дотику до відкритих струмопровідних частин, наприклад у разі пробою ізоляції, обриву, перетирання

проводу та замикання на корпус. Таке може виникнути при роботі з обчислювальними системами і проведенні налагоджувальних і профілактичних робіт. Також небезпека ураження електричним струмом виникає від провідників, що знаходяться під струмом.

Небезпечним хімічним виробничим фактором на виробництві є висококонцентровані розчини та дрібнодисперсний пил антибіотику лінкоміцину, джерелами яких є проби, що відбираються працівниками в цехах виділення і хімічної очистки, бокси розпилювальних сушарок, фасувальні установки та биті флакони.

Лінкоміцин може проникати в організм робітників через дихальні шляхи у вигляді аерозолів, що призводить до наявності скарг у робітників на головні болі, подразнення слизової оболонки очей, дихальних шляхів і шкірних покривів. Також можливі явища дисфункції кишечника, нудота, втрата апетиту, і як наслідок, дисбактеріоз, дефіцит вітамінів C , B_1 і B_2 [32].

Джерелом біологічних факторів повітряного середовища приміщень ферментації є розбризані проби біомаси з апаратів, що періодично відбираються працівниками для здійснення контролю росту продуценту лінкоміцину *Streptomyces lincolnensis*. Згідно Наказу МОЗ №521 від 26.10.2004 року про затвердження методичних вказівок «Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів» максимальна ГДК мікроорганізмів-продуцентів в повітрі робочої зони обмежується величиною $5 \cdot 10^4$ КУО/м³ [33].

4.2. Технічні та організаційні заходи, що зменшують рівень впливу на працівника небезпечних та шкідливих виробничих факторів на виробництві антибіотику лінкоміцину

На виробництві антибіотику лінкоміцину виникає необхідність виконувати відповідні заходи, які усувають або знижують вплив на працівника небезпечних і шкідливих виробничих факторів [34].

Освітлення. Система освітлення повинна задовольняти наступним вимогам.

По відношенню до вікон робочі місця повинні розміщуватися так, щоб природне світло падало збоку, переважно зліва [34, 35].

Штучне освітлення у приміщеннях з ПК повинно здійснюватися системою загального рівномірного освітлення. У випадках переважної роботи з документами рекомендується застосувати системи комбінованого освітлення (до загального освітлення додатково встановлюються світильники місцевого освітлення). При виборі приміщень для розміщення робочих місць з ПК необхідно враховувати, що вікна можуть викликати значну засліпленість у людей, що сидять перед ними, особливо літом і в сонячні дні.

У якості джерел світла при штучному освітленні рекомендується застосовувати (як правило) люмінесцентні лампи, які дають рівномірне освітлення. Допускається застосування ламп накаливання у світильниках місцевого освітлення.

Загальне освітлення слід виконувати у вигляді суцільних ліній або ліній, що перериваються, та розміщувати збоку від робочих місць (переважно справа), паралельно лінії зору робітників.

Застосування світильників без розсіювачів і екрануючих решіток забороняється.

Для того, щоб позбутися підвищеної температури повітря в робочій зоні необхідно поставити вентиляційні установки біля апаратів та механізмів, що

найбільше нагріваються (ферментери, інокуляти, посівні апарати). Можна також застосовувати спеціальні теплообмінники.

Для забезпечення електробезпеки на об'єкті, що планується, потрібно застосовувати окремо або в поєднанні один з одним такі технічні способи та засоби:

- захисне заземлення;
- занулення;
- захисне відключення;
- ізоляцію струмопровідних частин (робоча, додаткова, посилена, подвійна);
- компенсацію струмів замикання на землю;
- захисні пристрої;
- попереджувальну сигналізацію, блокування, знаки безпеки;
- засоби захисту й запобіжне пристосування.

Захист від прямих ударів блискавки передбачається окремо стоячим блискавковідводом, приєднаним до пристрою заземлення [36].

Для забезпечення безпеки під час проведення робіт зі зняттям напруги в діючих електроустановках або поблизу них мають виконуватися такі технічні заходи:

відключення установки (частини установки) від джерела живлення електроенергією;

- механічне замикання приводів, відключення комутаційних апаратів, зняття запобіжників, роз'єднання кінців живильних ліній та інші заходи, що забезпечують неможливість помилкової подачі напруги до місця роботи;

- установка знаків безпеки й обгороджування струмопровідних частин, що залишаються під напругою, до яких у процесі роботи можна торкнутися або наблизитися на неприпустиму відстань;

- накладання заземлень (включення ножів для заземлення або накладання переносних заземлень).

Для захисту людей від ураження електричним струмом при пошкодженні ізоляції застосовується захисне занулення. Зануленню підлягають всі металеві частини електрообладнання, які не ведуть струм, металеві корпуси щитків розподілення, сталеві труби електропроводок, металеві опори освітлення.

Опір пристрою заземлення, призначеного для відводу зарядів статичної електрики, не повинний перевищувати 100 Ом.

Для захисту працівників від висококонцентрованих розчинів та дрібнодисперсного пилу антибіотику лінкоміцину проводиться систематичний контроль за їх вмістом в повітрі виробничих приміщень та використовуються індивідуальні засоби захисту (комбінезон, чепчик-берет, рукавички, бахіли, пневмошолом з подачею чистого повітря, що дозволяє виключити із зони дихання аерозолів антибіотика).

Особлива увага приділяється попереднім та періодичним медоглядам персоналу, при яких виявляється схильність до алергічних захворювань. Один раз в рік проводяться дослідження на виявлення дисбактеріозу у працівників. В зимовий та весняний період року проводиться вітамінізація працівників, особливо тих, які зайняті на завершальних етапах виробничого процесу [32].

Для зменшення рівня біологічних факторів повітряного середовища приміщень виконуються роботи з прибирання та дезінфекції приміщень, проводиться постійний мікробіологічний контроль, дотримання правил особистої гігієни та вивчення загальної і професійної захворюваності працівників.

В зв'язку з тим, що в цеху по виробництву антибіотику лінкоміцину повітря робочої зони найбільш заповнене дрібнодисперсним антибіотиком, а також утворюється велика кількість надлишкового тепла, проведемо розрахунок вентиляції приміщення для очистки повітря.

4.2.1. Розрахунок вентиляції виробничого приміщення в цеху по виробництву антибіотику лінкоміцину

Розрахунок продуктивності місцевої витяжної вентиляції

$$L_M = F \cdot V \cdot 3600,$$

де F – площа поперечного перерізу отвору місцевої витяжки, м² ($F = 0,4$ м²);

V – швидкість руху повітря в цьому отворі, м/с ($V = 0,1$ м/с);

Розрахуємо продуктивність місцевої вентиляції згідно формули

$$L_M = 0,4 \cdot 0,1 \cdot 3600 = 1440, \text{ м}^3/\text{год.}$$

Розрахунок продуктивності загальнообмінної витяжної вентиляції для приміщення зі шкідливими речовинами:

$$L_{ШР} = \frac{U}{C_1 - C_0},$$

де U – маса шкідливих речовин, що надходять в приміщення, мг/год ($U = 1,1 \cdot 10^6$ мг/год);

C_1 – ГДК шкідливих речовин в повітрі приміщення, мг/м³ ($C_1 = 200$ мг/м³ – дрібнодисперсний антибіотик, біологічний агент, складові поживного середовища);

C_0 – концентрація шкідливих речовин в припливному повітрі, мг/м³ ($C_0 = 8$ мг/м³).

Розрахуємо продуктивність загальнообмінної витяжної вентиляції для приміщення, де відбувається виробництво антибіотику лінкоміцину згідно формули:

$$L_{ШР} = \frac{1,1 \cdot 10^6}{200 - 8} = 5555,56, \text{ м}^3/\text{год.}$$

Розрахунок продуктивності загальнообмінної припливної вентиляції для приміщення із надлишком тепла:

$$L_T = \frac{Q}{C \cdot \gamma (t_g - t_n)},$$

де Q – надлишкове тепло;

C – питома теплоємність повітря, кДж/год ($C = 130$ кДж/год);

γ – питома густина припливного повітря, кг/м³ ($\gamma = 1,239$ кг/м³);

t_g – температура, що видаляється з приміщення, К ($t_g = 305$ К);

t_n – температура припливного повітря, К ($t_n = 296$ К).

Розрахуємо продуктивність загальнообмінної припливної для приміщення, де відбувається виробництво антибіотику лінкоміцину згідно формули :

$$L_T = \frac{130}{1 \cdot 1,239 \cdot (305 - 296)} = 11,65, \text{ м}^3/\text{год.}$$

Отже, для забезпечення нормального вентилявання та циркулювання повітря у виробничому приміщенні, де відбувається виробництво антибіотику лінкоміцину необхідно мати загальнообмінну припливну вентиляцію із продуктивністю 11,65 м³/год, загальнообмінну витяжну вентиляцію із продуктивністю 5555,56 м³/год, а продуктивність місцевої витяжної вентиляції повинна становити 1440 м³/год.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки на виробництві антибіотику лінкоміцину

Причинами пожежі на виробництві можуть бути [37]:

- необережне поводження з вогнем;
- незадовільний стан електротехнічних пристроїв та порушення правил їх монтажу та експлуатації;
- samozapalювання і samozаймання речовин і матеріалів при неправильному їхньому збереженні чи застосуванні;
- невиконання вимог нормативних документів з питань пожежної безпеки тощо.
- Приміщення повинні бути забезпечені автоматичною пожежною сигналізацією, вогнегасниками, які розташовують у доступних місцях. Бокс та приміщення, в яких розміщені сушильно-стерилізаційні шафи і термостати, забезпечують вогнегасником та азбестовою або вовняною ковдрою. Забороняється розміщувати на сушильно-стерилізаційних шафах і термостатах та біля них сторонні предмети, вибухонебезпечні, легкозаймісті, горючі, токсичні та агресивні речовини. Підходи до засобів пожежогасіння повинні бути вільними.

- Для попередження виникнення пожежі забороняється:
- використовувати відкритий вогонь, палити в цехах виробництва, окрім спеціально відведених місць, класти недопалки на підлогу і інші місця приміщень;
- залишати та зберігати папір, вату, марлю, спирт та інші легкозаймисті речовини та матеріали на шафах та поза ними, на радіаторах центрального опалення, поблизу палаючих пальників, електричних проводів і приладів;
- зберігати легкозаймисті, вибухові та вогненебезпечні речовини (бензин, ефір тощо) без дотримання правил безпеки;
- нагрівати легкозаймисті речовини на відкритому вогні, електроплитах тощо;
- залишати без нагляду включені електроприлади, електричне освітлення, запалені газові пальники;
- користуватися електроплитами та іншими електронагрівальними приладами там, де не передбачено технологічними процесами;
- прибирати випадково проліті легкозаймисті речовини при запалених пальниках і включених електроприладах;
- порушувати електропроводку, заставляти шафами, завішувати плакатами, картинами, газетами електропроводи, електровимикачі, розетки;
- захаращувати переходи, виходи, сходи і доступи до протипожежних засобів шафами, столами та іншими предметами;
- користуватися саморобними, несправними або з відкритою спіраллю електронагрівальними приладами;
- порушувати стан електропроводки, тобто: подовжувати проводку, вставляти саморобні запобіжники, обгортати і заклеювати електролампи та електропровід папером та тканиною, підвішувати на проводах будь-які предмети, закручувати або зав'язувати електропровід вузлом тощо.
- На підприємстві повинні бути наявні інструкції з пожежної безпеки, з обслуговування установок пожежогасіння, з обслуговування установок пожежної сигналізації, план пожежогасіння, оперативні картки дій на випадок

виникнення пожежі, схема евакуації людей на випадок пожежі, встановлена система оповіщення людей про пожежу, плани та графіки проведення протипожежних тренувань, навчання і перевірки знань персоналу, технічного нагляду за системами пожежного захисту, порядок проведення планово-попереджувальних ремонтів та оглядів електроустановок, опалювального, вентиляційного, технологічного та іншого інженерного обладнання тощо.

Приміщення повинні бути забезпечені первинними засобами пожежогасіння: вогнегасниками, пожежним інвентарем (пожежними щитами та стендами, пожежними відрами тощо), пожежним знаряддям (пожежними ломачами тощо) та засобами зв'язку.

На випадок пожежі або вибуху терміново викликається пожежна охорона, при необхідності здійснюється евакуація людей згідно з діючим планом евакуації. Одночасно з цим організовується відключення мереж електро- і газопостачання; зупинка систем вентиляції та кондиціонування повітря і здійснення інших заходів, які сприяють запобіганню поширенню пожежі; та гасіння пожежі своїми силами з допомогою наявних засобів пожежогасіння. Електропроводку і електроприлади, які загорілися, гасять вуглекислотними та порошковими вогнегасниками. Воду або вогнегасник з піною застосовують тільки після знеструмлення лінії електропостачання. Відповідальність за протипожежний стан приміщення і виконання вимог даних правил несе керівник виробничого підрозділу.

4.4. Висновки до розділу

У розділі розглянуто, що в приміщенні, де відбуваються процеси отримання антибіотику лінкоміцину можуть бути такі небезпечні та шкідливі фізичні фактори виробничого середовища: недостатня освітленість робочої зони, підвищена температура повітря в робочій зоні, підвищене значення напруги в електричному ланцюзі, замикання якого може відбутися через тіло людини.

Небезпечним хімічним виробничим фактором на виробництві є висококонцентровані розчини та дрібнодисперсний пил антибіотику лінкоміцину, джерелами яких є проби, що відбираються працівниками в цехах виділення і хімічної очистки, бокси розпилювальних сушарок, фасувальні установки та биті флакони. Джерелом біологічних факторів повітряного середовища приміщень ферментації є розбризкані проби біомаси з апаратів, що періодично відбираються працівниками для здійснення контролю росту продуценту лінкоміцину *Streptomyces lincolnensis*.

Приміщення повинні бути забезпечені автоматичною пожежною сигналізацією, вогнегасниками, які розташовують у доступних місцях. Бокс та приміщення, в яких розміщені сушильно-стерилізаційні шафи і термостати, забезпечують вогнегасником та азбестовою або вовняною ковдрою.

Підходи до засобів пожежогасіння повинні бути вільними.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Вплив виробництва антибіотиків на навколишнє середовище

Промислове отримання антибіотиків має чотири основні стадії, кожна з яких повинна здійснюватися з урахуванням чинників можливої несприятливої дії на навколишнє середовище та на зміну екологічного фону [32].

На першій стадії, пов'язаній з отриманням високоактивних штамів продуцентів антибіотичних речовин, широко використовуються різні хімічні мутагени, що приводять до змін в ДНК мікроорганізмів. Серед найбільш активних мутагенів можна назвати сполуки, що складаються з біфенільного ядра, в параположенні якого є нітрогрупа. До них належать динітрофенантренхінон, тринітрофенантренхінон, тринітробіфенол-2-карбонова кислота і ряд інших. Нерідко як мутагени використовуються етиленімін, нітрозогуанідин, етидій бромю, деякі антибіотики, що взаємодіють з ДНК (актиноміцин D, мітоміцин)

При необережній роботі з такими препаратами вони можуть потрапити в навколишнє середовище і викликати неконтрольовані мутації не тільки у мікроорганізмів, але і у інших видів живих істот [38, 22].

Застосування генно-інженерних маніпуляцій при конструюванні різних мікроорганізмів – продуцентів антибіотиків – не виключає вірогідності потрапляння цих штамів в природні умови і їх розмноження. Хоча можливості розвитку мікробів, отриманих генно-інженерним способом, в природних умовах вельми обмежені, проте при роботі з ними повинна бути проявлена максимальна обережність, щоб повністю виключити їх попадання в навколишнє середовище. Фахівці, що працюють в цій області, несуть відповідальність за результати своїх експериментів. Вони повинні строго дотримуватися правил і умов роботи і

пам'ятати про те, як легко порушити екологічну рівновагу, що склалася в природі.

На стадії біосинтезу антибіотиків можливі випадки помітного втручання в навколишнє середовище. На цьому етапі нерідко порушується процес розвитку продуцента антибіотика у ферментері, що пов'язане з фаговим зараженням культури, із забрудненням сторонньою мікрофлорою та іншими чинниками, внаслідок чого вміст ферментера необхідно злити в трап. Тут недопустима халатність виконавців вказаної операції: зливати заражену культуру продуцента в трап можна тільки після її попередньої стерилізації. При порушенні цього основного правила може відбутися різке зрушення в екологічній рівновазі водного басейну, куди потрапить така культура мікроорганізмів у великій кількості [39].

Серйозні екологічні проблеми виникають при промисловому виробництві антибіотиків у зв'язку із захистом водоймищ від стічних вод, що утворюються у великому об'ємі в біотехнологічних процесах. Основним способом очищення стічних вод і захисту від них природних водоймищ є будівництво дорогих спеціальних очисних споруд, а також замкнутих систем водообігу.

В ході біотехнологічного процесу отримання антибіотиків найбільш забрудненими стічними водами виявляються відпрацьовані нативні розчини, що містять різні високо- і низькомолекулярні органічні і синтетичні неорганічні речовини.

Як правило, перед спуском стічних вод в очисні споруди відпрацьовані нативні розчини піддають попередній обробці: ультрафіолетовому опромінюванню з одночасним введенням окислювача або фотохімічному окисленню, або використовують інші способи, що дозволяють здійснити деструкцію високомолекулярних органічних сполук з утворенням низькомолекулярних речовин, що піддаються біологічному окисленню в системі очисних споруд [39, 22].

Важливе завдання захисту навколишнього середовища в процесі промислового отримання антибіотиків представляє різке скорочення викидів

шкідливих речовин в атмосферу. Вирішення її пов'язане з глибоким очищенням димових газів і з виключенням розсіювання в атмосфері кінцевого продукту. Останнє стосується останньої стадії, пов'язаної з проведенням операцій розфасовки антибіотика.

Повніше і раціональніше вирішення вищеназваних проблем, пов'язаних із захистом навколишнього середовища при промисловому виробництві антибіотиків, повинне базуватися на сучасних принципах розробки біотехнологічних виробництв, заснованих на безвідходній або хоч би маловідходній технології. Це найбільш прогресивний шлях вирішення екологічних проблем в області синтезу антибіотика [22].

Використання на практиці значного числа антибіотичних речовин, широке розповсюдження в природі ксенобіотиків і великого числа хімічно синтезованих препаратів, що застосовуються в сільському господарстві, викликає помітні зміни екологічного фону, у сфері дії якого знаходяться вже відомі антибіотики. Все це разом узятє приводить до зміни реакції організму на антибіотик, що вводиться (поява алергічних реакцій, зниження дії препарату і ін.).

У зв'язку з вищесказаним необхідно детально вивчати дію антибіотиків на стан екологічних систем як усередині організму людини і тварин, так і в навколишньому середовищі [38].

5.2. Вплив антибіотиків на живі організми

З отриманих тисяч антибіотиків в клінічній практиці знаходять застосування лише 150-200 препаратів. Пояснюється це тим, що велика кількість антибіотиків, які є ефективними антимікробними засобами, спричинюють виражену негативну дію на організм і для лікування не можуть бути використані. Навіть ті кілька десятків антибіотиків, котрі використовуються, як і всі лікарські препарати, мають побічну дію.

Розрізняють кілька груп ускладненої антибіотикотерапії.

Токсичні реакції. Токсична дія антибіотиків залежить від властивостей препарату, його дози, способу введення, стану хворого. Серед ускладнень цієї групи на першому місці стоїть ураження печінки. Такої дією володіють наприклад тетрацикліни. Друге місце посідають антибіотики з нефротоксичною дією, наприклад аміноглікозиди. Левоміцетин може порушувати органи кровотворення, він же володіє ембріотоксичною дією. Цефалоспорини III покоління порушують синтез вітаміну К, в результаті чого можливі кровотечі. Найменш токсичний із використовуваних антибіотиків пеніцилін, але при тривалому його застосуванні можливе ураження ЦНС.

Дисбіози. При використанні антибіотиків широкого спектру дії поряд зі збудниками захворювання, для знищення яких їх застосовують, гинуть і деякі представники нормальної мікрофлори, чутливі до цих антибіотиків. Звільняється місце для антибіотикорезистентних мікроорганізмів, які починають швидко розмножуватись та можуть стати причиною вторинних ендогенних інфекцій, як бактеріальних так і грибкових.

Дія на імунітет. Застосування антибіотиків може викликати алергічні реакції, виникнення яких залежить від властивостей препарату (найбільш сильними алергенами є пеніциліни та цефалоспорини), способу введення та індивідуальної чутливості хворого. Можуть з'являтися висип, зуд, кропивниця та ін. Дуже рідко виникає таке тяжке ускладнення як анафілактичний шок.

Імунодепресивна дія. Наприклад, левоміцетин пригнічує утворення антитіл, тетрациклін пригнічує фагоцитоз. В останні роки при операціях по трансплантації органів та тканин дуже широко застосовують циклоспорин, який попереджає їх відторгнення. Цей препарат було вилучено як протигрибковий засіб, але його імунодепресивна дія значно перевищує його антимікробні властивості. Велика кількість антибіотиків діє негативно на різні відділи імунної системи. Що викликає необхідність призначати їх дуже обережно [14].

Рациональна антибіотикотерапія інфекційних захворювань базується на результатах бактеріологічної діагностики захворювання з виділенням та ідентифікацією збудника. При цьому дуже важливо мати інформацію про

чутливість збудника захворювання до антибактеріального препарату, вибраного для лікування.

У клінічній практиці чутливими до антибіотика вважаються ті мікроорганізми, на які випробуваний антибіотик в концентрації, оптимальній у джерелі інфекції, спричинює бактеріостатичну або бактерицидну дію [40].

Практичне використання антибіотиків полягає у наступному:

- при лікуванні інфекційних захворювань людини та тварин. Але вони можуть мати побічну дію: викликати алергії, дисбактеріози, анафілактичний шок та навіть смерть, тому приймати антибіотики слід цілком обережно;
- для захисту рослин від захворювань, які викликають бактерії та гриби;
- для стимуляції росту сільськогосподарських тварин;
- для попередження псування м'яса, риби та інших продуктів;
- як інструменти для дослідження специфічних функцій клітини [11].

5.3. Рекомендації щодо зниження негативного впливу виробництва антибіотиків на живі організми та навколишнє середовище

5.3.1. Зниження негативного впливу антибіотиків на живі організми

Мікробіологічний принцип. Антибіотики слід використовувати лише по показанням, коли захворювання викликане мікроорганізмами, по відношенню до яких існують ефективні препарати. Для їх підбору необхідно до призначення лікування взяти у хворого матеріал для дослідження, виділити чисту культуру збудника та виявити його чутливість до антибіотиків [41]. Часто в якості епідемічного маркера використовують резистограму штамів – дані по їх чутливості до хіміопрепаратів, що дозволяє оцінити ідентичність штамів, виділених з різних джерел. При використанні антибіотиків на практиці важливо визначити чутливість до них клінічно важливих штамів мікроорганізмів [42].

Фармакологічний принцип. При призначенні антибіотика необхідно визначити правильне дозування препарату, необхідні інтервали між введенням

лікарського засобу. Тривалість антибіотикотерапії, методи введення. Слід знати фармакокінетику препарату, можливості взаємодії різних лікарських засобів.

Як правило, лікування інфекційних захворювань триває за допомогою одного антибіотику (моноантибіотикотерапія). При захворюваннях довготривалих (септичний ендокардит, туберкульоз та інші) для попередження формування антибіотикорезистентності застосовують комбіновану антибіотикотерапію.

Клінічний принцип. При призначенні антибіотиків враховують загальний стан хворих, вік, стать, стан імунної системи, супутні захворювання, наявність вагітності.

Епідеміологічний принцип. При виборі антибіотику необхідно знати, до яких антибіотиків стійкі мікроорганізми у середовищі, що оточує хворого (відділення, лікарня, географічний регіон). Розповсюдження стійкості до даного антибіотика не залишається постійною, а змінюється в залежності від того, наскільки широко використовується антибіотик.

Фармацевтичний принцип. Необхідно враховувати строк та умови зберігання препарату, так як при його тривалому та неправильному зберіганні утворюються токсичні продукти деградації [43].

Антибіотикотерапія – це лікування інфекційних та пухлинних захворювань антибактеріальними препаратами, які не є продуктами реакції організму на збудника.

До таких препаратів пред'являють ряд вимог. Антибіотик повинен володіти етіотропністю, тобто пригнітять життєдіяльність та розвиток збудника захворювання або пухлинних клітин. Антибіотики повинні достатньо добре розчинятися у воді, так як тільки в розчинному стані вони можуть потрапити у внутрішнє середовище організму. Антибіотики, з одного боку, повинні бути достатньо стабільні у внутрішньому середовищі організму, але, з другого боку не повинні мати кумулятивного ефекту [44]. Антибіотики повинні бути ефективні в низьких концентраціях; не спричиняти імунодепресивного ефекту [45].

Крім того, речовини, які використовуються для антибіотикотерапії, повинні бути нешкідливі. Не дивлячись на те, що любий антибактеріальний препарат володіє тією чи іншою побічною дією на макроорганізм, ця дія повинна бути по можливості мінімальною, а тератогенний та мутагенний ефекти по можливості повинні бути відсутні [44].

5.3.2. Зниження негативного впливу виробництва антибіотиків на навколишнє середовище.

Очистка стічних вод. В процесі отримання антибіотику лінкомцину споживається велика кількість води, яка забруднюється шкідливими мікроорганізмами, мінеральними і органічними компонентами. Забруднюючі речовини знаходяться в розчиненому і нерозчиненому станах. З метою запобігання шкідливому впливу стічних вод на стан водоймищ очищені стічні води не повинні містити збудників захворювань, а також запахів і присмаків, здатних передатися рибі. У стічних водах обмежується вміст токсичних речовин, що окисляються мікроорганізмами, і зважених частинок [46].

У виробничих процесах отримання антибіотиків промислові стоки діляться на умовно чисті і забруднені. До умовно чистих відносяться води, що пройшли теплообмінні апарати. В них не відбувається зміни складу, а тільки температури. Решта виробничих стоків відноситься до забруднених. Забруднені промислові стоки характеризуються присутністю органічних і неорганічних речовин [47].

При визначенні необхідного ступеня очищення промислових стічних вод необхідно враховувати такі нормативні показники: БСК, вміст завислих речовин, реакцію рН води водойми, температуру води, кольоровість, запах і мінеральний склад тощо.

Способи очищення стічних вод розділяються на механічні, фізико-хімічні, біохімічні, термічні (теплові) [46].

Механічне очищення здійснюють в пісколовках, відстійниках, центрифугах, флотаторах і фільтрах.

Фізико-хімічні методи (коагуляція, флокуляція, електрокоагуляція і сорбція) застосовують для очищення стічних вод від колоїдних і розчинених з'єднань, кількість яких у воді після споруд механічного очищення залишається практично незмінною.

Біологічне очищення проводять в аеротенках або в біоокислювачах з інтенсивною аерацією середовища. Очищені і освітлені стічні води поступають або у водоймище, або на рециркуляцію у виробництво [46].

Найбільш поширена схема очистки стічних вод включає первинну і вторинну очистку. Первинна очистка полягає в механічному відділенні забруднень. Вторинна очистка передбачає очищення стічних вод в системі очисних споруд, або очищення стічних вод в природних умовах на полях зрошення [48].

Очистка відпрацьованого повітря. На підприємствах по виробництву антибіотиків в процесі ферментації як відхід виробництва утворюється велика кількість відпрацьованого повітря, що викидається в атмосферу, разом з яким можуть викидатися і невеликі кількості культуральної рідини у вигляді дрібних бризок, що містять великі кількості мікроорганізмів-продуцентів. Вміст клітин продуцента залежить від його виду та часу ферментації, і складає від $1 \cdot 10^3$ до $1 \cdot 10^5$ клітин в 1 м^3 повітря [48].

Відносна вологість повітря, що виходить з ферментера, наближається до 100 %. Встановлено, що таке повітря на заводах антибіотиків містить від 2 до 4 мг/м^3 речовин з неприємним запахом.

Одним з найважливіших заходів, що знижують викид мікроорганізмів в навколишнє середовище, є герметизація ферментерів, флотаторів і устаткування вузла сепарації.

Відпрацьоване повітря очищається методом з використанням сітчастих фільтрів. Повітря, проходячи крізь такий фільтр, вивільняється від крапель культуральної рідини з мікроорганізмами. Фільтр складається з циліндричного корпусу з кришкою і днищем, де всередині розміщений фільтруючий елемент, який виготовлений з металевих сіток трикотажного плетіння з діаметром проволочки $0,28 \text{ мм}$ з нержавіючої сталі [14ц].

Очищення повітря до чистого або стерильного стану можна здійснювати за допомогою фільтрів грубого і тонкого очищення та шляхом спалювання. У ряді випадків зниження шкідливих викидів в атмосферу можна досягти шляхом вдосконалення технології.

5.4. Висновки до розділу

У розділі розглянуто, що основними екологічними проблемами, з якими стикається біотехнологічне підприємство по виробництву антибіотика терравіту, є забруднені стічні води, що скидаються у прилеглі водойми, та відпрацьоване повітря, що викидається в атмосферу, а також вірогідність потрапляння культури-продуцента антибіотика в природні умови і його подальше розмноження, а також вірогідність потрапляння хімічних мутагенів, які використовуються для створення штаму, що може викликати неконтрольовані мутації у мікроорганізмів та у інших видів живих істот навколишнього середовища.

Показано, що антибіотики можуть негативно впливати на живі організми викликаючи дисбактеріози, токсичні, імунодепресивні дії та дії на імунітет.

З метою зниження негативної дії антибіотиків на живі організми рекомендується дотримуватися мікробіологічних, фармацевтичних, клінічних, фармакологічних та епідеміологічних заходів.

З метою зниження негативного впливу виробництва антибіотиків на навколишнє середовище рекомендується очищати стічні води за допомогою механічних, фізико-хімічних, біохімічних та термічних методів. Відмічено, що найбільш поширеною є схема очистки стічних вод, що включає первинну і вторинну очистку.

Рекомендовано очищати відпрацьоване повітря, що утворюється на стадії ферментації, застосовуючі методи з використанням сітчастих фільтрів.

ВИСНОВКИ

1. Антибіотики представляють найчисленнішу групу лікарських засобів. Їх використовують задля унеможливлення і лікування запальних процесів, викликаних бактеріальною мікрофлорою. Виробництво антибіотиків представляє нині сильну, добре розвинену галузь, що входить у фармацевтичну (у нашій країні в медичну і мікробіологічну) промисловість. Вона займає одне з провідних місць у виробництві лікарських препаратів. Промисловий спосіб отримання антибіотиків – складний багатоступеневий процес, що включає ряд технологічних стадій.

2. Підібрано поживне середовище для отримання лінкоміцину, що дозволяє скоротити процес ферментації на 24 години, підвищити вихід лінкоміцину у 2,4 рази у порівнянні з традиційною технологією отримання лінкоміцину.

3. Технологія виробництва антибіотику лінкоміцину розпочинається з таких етапів як, підбір продуцента для отримання антибіотику, підбір поживного середовища для отримання антибіотику лінкоміцину, вибору чистої культури *Streptomyces lincolnensis*, приготування поживного середовища, стадії ферментації, культивування. Було запропоновано поживне середовище, яке дозволяє отримати майже у два з половиною рази більше антибіотику та знизити час ферментації на 24 години.

4. Запропоновано удосконалену технологічну схему виробництва лінкоміцину на основі використання культури *Streptomyces lincolnensis*, підбраного поживного середовища та умов культивування. Дозволяє збільшити

СПИСОК БІБЛОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. ГОСТ 12.0.003-74 (1999) – ССБТ. Опасные и вредные производственные факторы классификации.
2. Антонов В. К. «Хімія антибіотиків» т.1 / Антонов В.К. – М., 1990-324 с.
3. Белооков А.А. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции: учебное пособие / А. А. Белооков. – Троицк: УГАВМ, 2006. – 112 с.
4. Залюбовська О.І. Антибіотики // Фармацевтична енциклопедія / голова ред. ради та автор передмови В.П. Черних; Нац. фармац. ун-т України. — 2-ге вид., переробл. і доповн. — Київ: МОРІОН, 2010. — 1632 с.
5. Защитное заземление, зануление: ГОСТ 12.1.030 – 81. ССБТ. – [Введен 01.05.82]. М.: Госстандарт, 1982. – 5 с.
6. Кафаров В.В. «Антибіотики. Експериментально-клінічне вивчення» / Кафаров В.В. – М., 1990. – 360с.
7. Михайлов И.Б. Клиническая фармакология. — СПб, 2002;
8. Посохова К.А., Вікторов О.П. Антибіотики (властивості, застосування, взаємодія). — Тернопіль, 2005;
9. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. — М., 2002.
10. <https://compendium.com.ua/dec/260807/> Компендіум, довідник лікарських препаратів.
11. Грачева И. М. Технология ферментных препаратов: Учебник / И. М. Грачева, А. Ю. Кривова. – 3-е изд., перераб и доп. – М.: Элеватор, 2000. –512 с.: ил.
12. Бирюков В. В. Основы промышленной биотехнологии: учебник [для вузов] / В. В. Бирюков. – М. : Колос, 2004. – 302 с.

13.Штейнберг Г. Б. Гигиена труда в производстве антибиотиков / Г. Б. Штейнберг // Гигиена труда в химической и химико-фармацевтической промышленности: под общ. ред. Н. Ф. Измерова. – М., 1976. – С. 140–147.

14.Виестур У.Э. Биотехнология. Биотехнологические агенты, технология, аппаратура / У.Э. Виестур, И.А. Шмите, А.В. Жилевич. – Рига, 1987. – 567 с.

15.Жуковина О.В. Охорона праці у фармацевтичній галузі: навч. посібник [для студ. вищ. фармац. закл. освіти III-IV рівнів акредитації] / О.В. Жуковина, О.І. Зайцев, О.І. Жуковін, Г.А. Грецька. – К.: Медицина, 2009. – 431 с.

16.Егоров Н. С. «Основы вчення про антибіотики / Егоров Н.С. – М.: У, 1994. - 512 с.

17.Ланчини Д. Антибиотики / Д. Ланчини, Ф. Паренти; [пер. с англ. Ю. В. Дудник]. – М.: Мир, 1985. – 272 с.

18. Марчук О. С. Технологія ліків: навч. посібник / О. С. Марчук, Н. Б. Андрощук. – К.: Медицина, 2008. – 488 с.

19. Промышленная микробиология: Учеб. Пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология»/З.А. Аркадьева, А.М. Безбродов, И.Н. Блохина и др.; Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.

20. Гров Д.С. «Хімія антибіотиків» / Гров Д.С., Рендал В. А. – М.,1990. – 334 с.

21. Машковский М.Д. Лекарственные средства: в 2 т. / М.Д. Машковский. – [10-е изд. стер.]. – М.: Медицина, 1985. – Т. 2. – 1985. – 576 с.

22. Желдакова Р.А. Механізми біосинтеза антибіотиків і їх дія на клітки мікроорганізмів: учеб.-метод. комплекс [для студентів спеціальності «Биология»] / Р.А. Желдакова. – Минск: БГУ, 2004. – 111 с.

23. Быков В.А. Биотехнология: учеб. пособие [для вузов]: в 8 кн. / В.А. Быков, И.А. Крылов, М.Н. Манаков [и др.] // Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов. – М.: Высшая школа, 1987. – Кн. 6. – 1987. – 143 с.

24. Мосичев М. С., Складнев А. А., Котов В. Б. Общая технология микробиологических производств. – М.: Легкая и пищевая промышленность. 1982. – 264с.
25. Промышленная микробиология: Учеб. Пособие для вузов по спец. «Микробиология» и «Биология»/З.А. Аркадьева, А.М. Безбродов, И.Н. Блохина и др.; Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Высш. шк., 1989. – 688 с.
26. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: Учеб. Для студентов биолог. Спец. Ун-тов. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. шк., 1986. – 448с.
27. Смирнов В. В. «Антибіотики» / Смирнов В. В. – К: Вища школа, 1985. - 490 с.
28. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – [1-ше вид.]. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 527 с.
29. Громова Н. Ю. Технология синтеза и биосинтеза биологически активных веществ: учебное пособие / Н.Ю. Громова, Ю.Ю. Косивцов, Э.М. Сульман. – Тверь: ТГТУ, 2006. – 84 с.
30. Ланчині Д. «Антибіотики» / Ланчині Д., Паренті Ф. – М.: Мир, 1985. – 315с.
31. Ланчині Д. «Антибіотики» / Ланчині Д., Паренті Ф. – М.: Мир, 1985. – 315с.
32. Тимофеева С. С. Биотехнология обезвреживания сточных вод / С. С. Тимофеева // Химия и технология воды, 1995. – Т. 17, № 5. – С. 52–55.
33. Пирог Т.П. Загальна мікробіологія: підручник / Т.П. Пирог. – К.: НУХТ, 2004. – 471 с.
34. Прищеп Т.П., Чучалин В.С., Зайков К.П., Белова Л.С. Основы фармацевтической биотехнологии: Учебное пособие-Ростов н/Дону,-2006.-256 с.
35. Елинов Н.П. Основы биотехнологии: учебник [для студ. ин-тов, аспирантов и практ. работников] / Н.П. Елинов. – Санкт-Петербург: Наука, 1995. – 600 с.

36. Уебб Ф. «Технологія мікробіологічного синтеза» / Уебб Ф. – М., 1986. – 330с.
37. Моисеев В.С. Клиническая фармакология и фармакотерапия: руководство для врачей / В.С. Моисеев, В. К. Лепяхин. – М. : Мир, 1997. – 532 с.
38. Ахметова В. Ш. Основы биотехнологического производства: опорные конспекты лекций [для студентов специальности «Биотехнология»] / В. Ш. Ахметова. – Павлодар, 2009. – 332 с.
39. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учебник / Н.С. Егоров. – [6-е изд., перераб. и доп.]. – М.: Из-во МГУ, 2004. – 528 с.
40. Про затвердження методичних вказівок «Медико-біологічні дослідження виробничих штамів мікроорганізмів і токсиколого-гігієнічна оцінка мікробних препаратів, визначення їх безпеки та обґрунтування гігієнічних нормативів і регламентів»: наказ МОЗ № 521. – [Чинний від 26.10.2004 р.]. – К.: МОЗ України, 2004. – 34 с.
41. Белооков А. А. Основы биотехнологии переработки сельскохозяйственной продукции: учебное пособие / А. А. Белооков. – Троицк: УГАВМ, 2006. – 112 с.
42. Биотехнология. Учебное пособие для вузов. В 8 кн/под ред. Н.С. Егорова, В.Д. Самуилова. Кн.3: Клеточная инженерия / Р. Г. Бутенко, М.В. Гусев. – М.: Высшая школа, 1987. – 127 с.
43. Волова Т.Г. Биотехнология / Т.Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сибирского отделения Российской Академии наук, 1999. – 252 с.
44. Посохова К.А. Антибіотики (властивості, застосування, взаємодія): навч. посібник / К.А. Посохова, О.П. Вікторов. – Тернопіль: ТДМУ, 2005. – 296 с.
45. Навашин С.М. Биосинтез антибиотиков / С.М. Навашин, Ю.Э. Бартошевич, В.Н. Даниленко, С.Е. Есипов [и др.]. – М.: ВНИИТЭМР, 1985. – 99 с.

46. Сорокин А.Г. Успехи в области изучения и производства антибиотиков / А.Г. Сорокин, С.М. Навашин, Т.И. Николаева // Труды ВНИИА. – 1979. – Вып. 7. – С. 3–55.

47. Протоєрейський О.С. Основи охорони праці. / Протоєрейський О.С., Запорожець О.І. // [навч. посібник.] – К.: НАУ, 2002. – 524 с.

48. Елінов Н. П. «Хімічна мікробіологія» / Елінов Н.П. – М.: Вища школа, 1989. – 322 с.

49. Экологическая биотехнология. [Под ред. К.Ф. Фостера, Д.А. Вейза] / [пер.с англ.] – Л.: Химия, 1990. –384 с.