

УДК 579.24

## ВЛИЯНИЕ ПЕРФТОРДЕКАЛИНА НА РОСТ *ESCHERICHIA COLI* M-17 ПРИ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Мартинсон Е.А., Бирюков В.В., Бакулин В.М., Крючков А.В., Синцов К.Н.

ФГБОУ ВПО «Вятский государственный университет», Киров, e-mail: vladbakulin@rambler.ru

В Российской Федерации в настоящее время правительством приняты и утверждены комплексные координирующие программы развития биотехнологии. Одной из таких программ является «Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации до 2020 года». На основе этой программы создаются и реализуются подпрограммы для регионов, ведомств и отдельных институтов. Большое внимание со стороны государства уделяется развитию образования в области биотехнологии, развитию науки в области биотехнологии, а также стимулированию потребительского спроса на отечественную биотехнологическую продукцию. Биотехнология, наряду с нанотехнологиями и информационными технологиями выделена государством как одна из ключевых технологий для инновационного развития отечественной экономики. В «Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» одной из приоритетных задач определено создание новых технологий и повышение эффективности существующих технологий производства продуктов биотехнологического синтеза. В представленной работе обобщена возможность использования перфтордекалина с газотранспортной функцией в жидкой питательной среде в качестве стимулятора роста при глубинном культивировании бактерий *E.coli* M-17, что приводит к значительной интенсификации роста биомассы культивируемого биообъекта. Результаты работы могут быть использованы при проведении дальнейших исследований в рамках повышения эффективности существующих технологий производства продуктов биотехнологического синтеза.

**Ключевые слова:** глубинное культивирование, перфтордекалин, бактерии, интенсификация роста, развитие биотехнологии

## INFLUENCE OF PERFLUORODECALIN ON GROWTH OF *ESCHERICHIA COLI* OF M-17 AT DEEP CULTIVATION

Martinson E.A., Birjukov V.V., Bakulin V.M., Kruchkov A.V., Sincov K.N.

Vyatka state universiti, Kirov, e-mail: vladbakulin@rambler.ru

In the Russian Federation currently, the government adopted and approved comprehensive programed coordinating development of biotechnology. One such program is the «Complex program of the development of biotechnology in the Russian Federation up to 2020». On the basis of this programed are created and implemented routines for regions, departments and individual institutions. Great attention by the state is paid to the development of education in the field of biotechnology, the development of science in the field of biotechnology, as well as stimulate consumer demand for domestic biotech products. Biotechnology, along with nanotechnologies and information technologies allocated by the state as one of the key technologies for innovative development of the domestic economy. In the «Comprehensive program of the development of biotechnology in the Russian Federation for the period till 2020» one of the priorities is to create new technologies and improving the efficiency of existing technologies of production of products of biotechnological synthesis. In the presented work the possibility of use of a gas transit function perfluorodecalin in a liquid nutrient medium as a growth promoter in submerged cultivation of bacteria *E. coli* M-17, which leads to significant intensification of the growth of biomass cultivated bioobject. Results of work can be used in conducting further research in order to increase the efficiency of existing technologies of production of products of biotechnological synthesis.

**Keywords:** deep cultivation, perfluorodecalin, bacteria, intensification of growth, the development of biotechnology

Современная биотехнология изучает общие и частные вопросы использования микроорганизмов в микробиологическом синтезе биологически активных веществ, производстве разнообразных препаратов, разрабатывает технологии применения микроорганизмов в различных областях промышленности, создаёт системы микробиологической деградации технических материалов и отходов производств. Биотехнологические товары представлены на мировом и отечественном рынке в фармацевтическом секторе, агропищевом секторе, промышленной биотехнологии, биоэнергетики и секторе так называемых веществ из возобновляемых источников сырья (renewable chemicals).

Бактерии *E. coli* играют важную роль в современной промышленной микробио-

логии, биологической инженерии и биофармацевтике. Научные публикации с результатами исследований по биохимии, физиологии, молекулярной и общей биологии бактерий рода *Escherichia* позволяют довольно широко их использовать как при производстве препаратов-пробиотиков, так и в качестве модельных микроорганизмов при проведении исследований в области биотехнологического синтеза [1]. Некоторые штаммы *E. coli* являются продуцентами ферментов, используемых в пищевой биотехнологии, и реципиентами для клонируемых генов эукариот и прокариот [3].

В «Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» указано, что для инновационного развития современной

экономики ключевыми являются три направления развития технологий: информационные технологии, нанотехнологии и биотехнологии. В качестве одной из первоочередных задач развития биотехнологии определено создание новых производственных технологий и повышение эффективности существующих технологий производства продуктов биотехнологического синтеза [5].

В последние годы авторами проводятся исследования, связанные с оценкой возможности использования перфторорганических соединений (ПФОС) с газотранспортной функцией с целью интенсификации скорости роста и повышения биосинтетической продуктивности микроорганизмов различных групп при глубинном культивировании для последующего внедрения полученных результатов в биотехнологическое производство [2]. Доказано, что перфторорганические соединения обладают уникальными свойствами и находят широкое применение в трансфузиологии, хирургии, реаниматологии и других областях медицины [4]. Однако применение ПФОС в других областях биологической науки и в биотехнологии пока не нашло достойного обсуждения и реализации. На наш взгляд, биотехнология стоит на пороге прорыва и цепной реакции в расширении направлений и областей использования ПФОС. Спрос для биотехнологии на ПФОС ввиду их уникальных газотранспортных свойств в ближайшие годы должен возрасти в десятки и сотни раз. Теоретическому и практическому рассмотрению перспективности использования ПФОС в биотехнологических процессах, связанных с глубинным выращиванием микроорганизмов, посвящена данная научная работа.

**Целью работы** являлась оценка возможности интенсификации темпов роста *E.coli* M-17 при глубинном культивировании с использованием перфторорганических соединений в качестве стимулятора роста.

#### **Материалы и методы исследований**

Для оценки возможности влияния перфторорганических соединений на интенсификацию роста микроорганизмов в экспериментах по глубинному культивированию микроорганизмов использовали перфтордекалин (ПФД) производства ОАО «Кирово-Чепецкий химкомбинат им. Б.П. Константинова». В качестве культивируемого биообъекта использовали выделенную из пробиотического препарата «Колібактерин» культуру штамма *E. coli* M-17. Режим культивирования обрабатывался на лабораторном ферментере BIOSTAT<sup>®</sup>plus фирмы Sartorius (Германия) с рабочим объемом колбы для культивирования 1,5 дм<sup>3</sup>. Температурный оптимум роста культуры проводился при 37°C. Жидкая питательная среда (ЖПС), приготовленная по рекомендованным прописям

и технологиям [6] содержала мясную воду – 700 см<sup>3</sup>; водопроводную воду – 700 см<sup>3</sup>; сухой пептон – 1% и хлорид натрия – 0,5% (по массе). Интенсивность роста культуры *E.coli* M-17 оценивали методом высева серийных разведений отобранных в разные промежутки времени проб культуральной жидкости на плотную питательную среду Эндо. Режим автоклавирования питательных сред, тонкостенной лабораторной посуды для вспомогательных коммуникаций для ведения процесса и перфторорганических соединений для внесения в питательную среду обрабатывался на лабораторном автоклаве Tuttnauer (США).

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

В ходе предварительных экспериментальных исследований авторами была оценена устойчивость ПФД к наиболее часто используемой манипуляции с компонентами микробиологических питательных сред – стерилизации. Экспериментально проанализирован основной метод стерилизации питательных сред – стерилизация паром под избыточным давлением (автоклавированием) при температурном воздействии пара в 126°C, что соответствовало избыточному давлению в 1,5 атмосфер. При этом была выбрана экспозиция в 60 минут. После проведения стерилизации проб ПФОС в стеклянных пробирках по 7 мл оценивали внешний вид, массу стерилизуемого перфтордекалина и чувствительность к ним исследуемой культуры бактерий. Необходимо отметить, что в процессе и после стерилизации перфтордекалина автоклавированием при использованном режиме он не изменил своего исходного внешнего вида и исходной массы даже после пяти циклов стерилизации. Результаты оценки чувствительности бактерий, представленные в таблице к анализируемому ПФОС до и после стерилизации показали отсутствие ингибирующего действия перфтордекалина на жизнеспособность и развитие бактерий в жидкой среде в статических условиях при периодическом встряхивании.

Более того, при выращивании бактериальной культуры отмечалась выраженная тенденция к увеличению скорости роста культуры и выхода общего количества бактериальных клеток в 2 раза (при концентрации перфтордекалина в среде 0,5–2,5%). Дальнейшее повышение концентрации перфтордекалина не приводило к увеличению выхода биомассы использованного штамма, это позволяет предположить, что оптимальная концентрация перфтордекалина в среде находится в диапазоне 0,5–12,5%. Учитывая то, что выход биомассы был максимальным при концентрации в среде 5%, следует признать эту концентрацию оптимальной для данного этапа исследований.

Результаты оценки действия различных концентраций перфтордекалина в жидкой питательной среде на клетки *E.coli* M-17

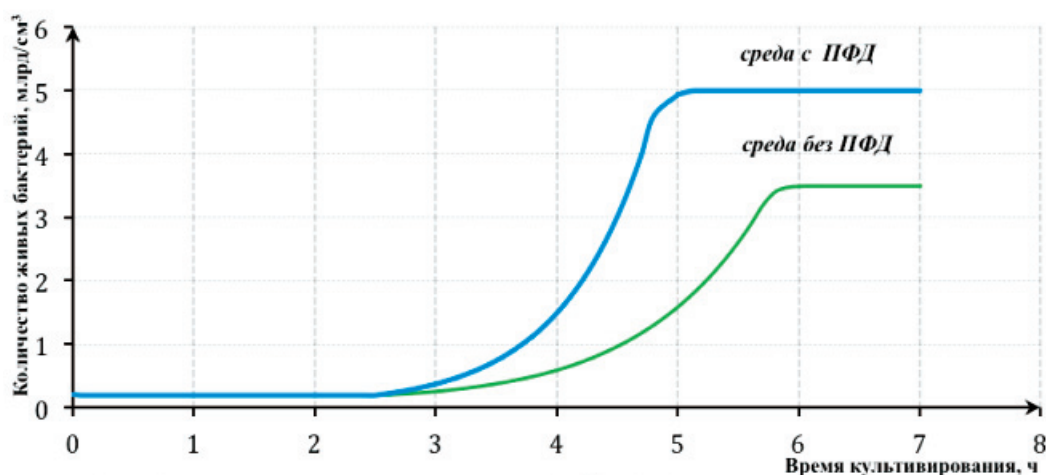
Содержание в среде перфтордекалина, %	Концентрация клеток ( $\cdot 10^7$ ) КОЕ/мл бактерий после выращивания в течение 48 часов в жидкой питательной среде с перфтордекалином стерилизованным ...				
	контроль	111°C, 30 мин *	134°C, 60 мин	134°C, 60 мин	фильтрацией
0	16	16	16	16	16
0,1	15	17	17	15	16
0,5	27	26	28	29	28
5	47	48	45	48	48
12,5	45	46	44	46	47

В ходе основного эксперимента – оценки возможности интенсификации динамики роста *E.coli* M-17 при внесении в питательную среду перфтордекалина – последовательно проводили два эксперимента по глубинному культивированию микроорганизмов (эксперимент № 1 и эксперимент № 2). В эксперименте № 1 использовали жидкую питательную среду без добавления ПФД, в эксперименте № 2 в жидкую питательную среду добавляли ПФД 5 об.%. Температурные параметры, показатели рН, состав питательной среды, плотность посева и прочие технологические параметры процесса в экспериментах задавали в обоих экспериментах одинаковыми. При выполнении эксперимента № 2 введение ПФД (5 об.%) производили после инокуляции посевной культуры в колбу с жидкой питательной средой.

Время начальной фазы роста *E.coli* M-17 в жидкой питательной среде с до-

бавлением ПФД сократилось более чем в 1,5 раза по сравнению с временем роста культуры в среде без ПФД. При этом продолжительность фазы экспоненциального роста в эксперименте с ПФД уменьшилась в 1,6 раза.

Время выхода роста культуры *E.coli* M-17 на стационарную фазу при культивировании в жидкой питательной среде с ПФД составило 5,0 часа, без добавления ПФД – 5,8 часа. Определение общего количества живых клеток по результатам подсчета выросших колоний свидетельствует о том, что в эксперименте № 2 с добавлением ПФД количество микроорганизмов составило  $5,0 \pm 0,3$  млрд. живых микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$  полученной культуральной жидкости, в эксперименте № 1 без добавления ПФД –  $3,5 \pm 0,3$  млрд живых микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$  полученной культуральной жидкости (рисунок).



Динамика роста культуры *E.coli* M-17

**Заключение**

В настоящей работе на примере бактерий *E.coli* M-17 экспериментально обоснована возможность использования ПФД

как вещества, обеспечивающего при культивировании на лабораторном ферментере BIOSTAT®plus фирмы Sartorius интенсификацию роста культуры *E.coli* M-17, проявляющуюся сокращением времени

культивирования и увеличением биомассы культивируемого биообъекта.

Можно высказать предположение, что данные результаты (по аналогии с процессами, описанными для клеток эукариот), получаются за счет более интенсивного транспорта в бактериальную клетку наноконтейнерами на основе перфторуглеродов основных компонентов жидкой питательной среды, необходимых для построения структуры клеток и последующего деления бактерий [4].

#### Список литературы

1. Адхья С. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах. Т.1: пер. с англ.; под ред. А.И. Нетрусова, Т.С. Ильиной / С. Адхья, К.-А. Альперт и др. / под ред. Й. Ленгелера, Г. Дрекса, Г. Шлегеля. – М.: Мир, 2005. – 656 с.
2. Бакулин В.М. Влияние перфтордекалина на рост и антибиотическую активность культур *Streptomyces Albus* и *S. Rimosus* в жидкой среде / В.М. Бакулин, Е.А. Мартинсон и др. // Ветеринарная медицина. – 2012. – № 3–4. – С. 15–17.
3. Глик Б. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение / Б. Глик, Д. Пастернак. – М.: Мир, 2002. – 589 с.
4. Иваницкий Г.Р. Наноконтейнеры на основе перфторуглеродов с функцией переноса оксида азота // Биофизика. – 2008. – № 2. – С. 367–377.
5. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года Утверждена председателем правительства Российской Федерации от 24 апреля 2012 г. Москва № 1853п-П8.

6. Равилов А.З., Микробиологические среды / Равилов А.З., Гильмутдинов Р.Я., Хусайнов М. Ш. // Казань. – 1999. – 398 с.

#### References

1. Adhya S. *Sovremennaya mikrobiologiya. Prokarioty: V 2-h tomah. T.1 Per. s angl. pod red Netrusova A.I. i Iliny T.S. / Adhya S., Alpert K.-A. i dr. Pod red. Lengelera Y., Drevsa G., Shlegelya G.*. M.: Mir, 2005. 656 p.
2. Bakulin V.M. *Vliyaniye perftordekalina na rost i antibioticheskuu aktivnost kultur STREPTOMYCES ALBUS i S.RIMOSUS v zhidkoy srede* / Bakulin V.M., Martinson E.A. i dr. // *Veterinarnaya medicina*, 2012, no. 3–4. pp. 15–17.
3. Glik B. *Molekulyarnaya biotekhnologiya. Principy i primeneniye* / Glik B., Pasternak D. // M.: Mir, 2002. 589 p.
4. Ivanickiy G.R. *Nanokonteynery na osnove perftoruglerodov s funkciy perenosa oksida azota* / Ivanickiy G.R. // *Biofizika*. 2008. no. 2. pp. 367–377.
5. *Kompleksnaya programma razvitiya biotekhnologiy v Rossiyskoy Federacii na period do 2020 goda Utverzhdena predsedatelem pravitelstva Rossiyskoy Federacii ot 24 aprelya 2012 g.* Moskva no 1853p–pp. 8.
6. Ravilov A.Z., *Mikrobiologicheskie sredy* / Ravilov A.Z., Gilmudinov R. Ya., Hycainov M. Sh. // *Kazan*. 1999. 398 p.

#### Рецензенты:

Погорельский И.П., д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник НИЦ ФГКУ «33 ЦНИИИ» Минобороны России, г. Киров;

Рылов А.В., д.м.н., профессор, заместитель генерального директора по научной и испытательной работе, ФГБУ РМНПЦ РОСПЛАЗМА ФМБА России, г. Киров.

Работа поступила в редакцию 26.02.2014.