

**Калюжная О.С.**

Національний фармацевтичний  
університет  
E-mail: kalyuzhnayao.s@gmail.com

**Калюжный О.Б.**

Харківський національний технічний  
університет сільського господарства ім.  
П. Василенка  
E-mail: albokal@ukr.net

**ВИКОРИСТАННЯ ФТОРОПЛАСТОВИХ  
ФІЛЬТРУЮЧИХ ЕЛЕМЕНТІВ У  
БІОТЕХНОЛОГІЧНОМУ ВИРОБНИЦТВІ  
АНТИБІОТИЧНИХ РЕЧОВИН**

УДК 615.014

*Калюжная О.С., Калюжный О.Б. «Використання фторопластових фільтруючих елементів у біотехнологічному виробництві антибіотичних речовин»*

*У роботі показана перспективність подальших досліджень щодо використання пористих фільтрів на основі фторопласта у виробництві антибіотичних речовин.*

*Аналіз досліджень виявив актуальність проблеми антибіотикостійкості інфекційних агентів, у зв'язку з цим виникає необхідність розробки нових видів антибіотиків або вдосконалення існуючих.*

*Сьогодні основним методом отримання нових антибіотиків є біосинтез, який здійснюється ферментацією відповідного мікроорганізму, а завершальним етапом будь-якого біотехнологічного виробництва є виділення цільового продукту з живильного середовища та його очищення. Початковим етапом виділення продукту є фільтрація за допомогою фільтрів різної конструкції. Серед великої кількості конструкцій фільтрів та фільтрувальних елементів різних композицій, що пропонуються на ринку, ми зупинились на фторопластових фільтруючих елементах.*

*Нами вивчено антимікробну активність культуральної рідини *P. aeruginosa* двома методами - методом перпендикулярних штрихів та двократних розведень. Результати досліджень показали, що після фільтрації антимікробна активність децю збільшилась, що може бути обумовлено концентруванням клітин та, відповідно, виділенням більшої кількості антимікробних речовин клітинами мікроорганізму *P. aeruginosa*.*

*Ключові слова: фторопластові фільтруючі елементи, виробництво антибіотичних речовин, антимікробна активність, піоціанін*

*Калюжная О.С., Калюжный А.Б. «Использование фторопластовых фильтрующих элементов в биотехнологическом производстве антибиотических веществ»*

*В работе показана перспективность дальнейших исследований по использованию пористых фильтров на основе фторопласта в производстве антибиотических субстанций на примере пиоцианина.*

*Анализ исследований выявил актуальность проблемы антибиотикорезистентности инфекционных агентов, в связи с этим возникает необходимость разработки новых видов антибиотиков или совершенствования существующих.*

*Сегодня основным методом получения новых антибиотиков является биосинтез, который осуществляется ферментацией соответствующего микроорганизма, а завершающий этап любого биотехнологического производства - выделение целевого продукта из питательной среды и его очистка. Начальным этапом выделения продукта выступает фильтрация. Среди большого количества конструкций фильтров и фильтровальных элементов различных композиций, предлагаемых на рынке, мы остановились на фторопластовых фильтрующих элементах.*

*Нами изучена антимикробная активность культуральной жидкости*

*P. aeruginosa* двумя методами - методом перпендикулярных штрихов и двукратных разведений. Результаты исследований показали, что после фильтрации антимикробная активность несколько увеличилась, что может быть обусловлено концентрированием клеток и, соответственно, выделением большего количества антимикробных веществ клетками микроорганизма *P. aeruginosa*.

Ключевые слова: фторопластовые фильтрующие элементы, производство антибиотических веществ, антимикробная активность, пиоцианин

*Kaliuzhnaia O.S., Kaliuzhnyi O.B. «The use of PTFE filter elements in the biotechnological production of antibiotic substance »*

*The paper shows the prospects of further research on the use of porous filters based on fluoroplastic in the production of antibiotic substances on the example of pyocyanin.*

*The analysis of research has revealed the urgency of the problem of antibiotic resistance of infectious agents, in this regard, there is a need to develop new types of antibiotics or improve existing ones.*

*Today, the main method of obtaining new antibiotics is biosynthesis, which is carried out by fermentation of the corresponding microorganism, and the final stage of any biotechnological production is the isolation of the target product from the nutrient medium and its purification. The initial stage of product isolation is filtration using filters of various designs. Among the large number of filter designs and filter elements of various compositions offered on the market, we focused on fluoroplastic filter elements.*

*The antimicrobial activity of *P. aeruginosa* culture liquid by two methods - the method of perpendicular strokes and two-fold dilutions studied. The research results showed that the antimicrobial activity slightly increased after filtration, which may be due to the concentration of cells and, accordingly, the release of a larger amount of antimicrobial substances by the cells of the *P. aeruginosa* microorganism.*

Key words: PTFE filter elements, production of an antibiotic substance, antimicrobial activity, pyocyanin

## **Вступ**

У сучасній медицині антибіотики займають особливе місце. Їх специфічність полягає у високій фізіологічній активності навіть у дуже низьких концентраціях по відношенню до певних груп мікроорганізмів чи до злоякісних пухлин [1]. Але широко поширені антибіотики з часом втрачають свою активність внаслідок формування у бактерій резистентності до них, внаслідок чого пошук нових або вдосконалення структури та технології виробництва існуючих антибіотиків є актуальним питанням фармацевтичних технологій.

Перспективною антибіотичною субстанцією є сполука феназинового ряду - піоцианін, темно-синій пігмент, який продукується бактерією *Pseudomonas aeruginosa* у процесі природної життєдіяльності.

Піоцианін відноситься до фенозинових сполук і має широкий спектр антибіотичної активності по відношенню до грампозитивних, грамнегативних мікроорганізмів і грибів. Піоцианін має форму темно-синіх голчастих кристалів, Тпл 133 °С, добре розчинний у хлороформі, гарячій воді, етиловому спирті, ацетоні. Окислена форма пофарбована в синій колір, відновлена - безбарвна. Тверда речовина стійка кілька тижнів при зберіганні в сухому темному місці, розкладається при тривалому зберіганні [2].

Механізм дії антибіотиків феназинового ряду обумовлений здатністю легко проникати всередину бактеріальних клітин і вступати в окисно-відновні реакції, приймаючи електрони від глутатіону і NADH і перетворюючись у відносно стабільні

аніони, дані речовини викликають генерацію активних форм кисню ( $O^{2-}$ ,  $OH$  і  $H_2O_2$ ), які мають високу реакційну здатність, результатом чого є індукція окисного стресу і подальша загибель мікроорганізмів [3].

Піоціанін можна отримати як хімічним, так і біотехнологічним методами. Хімічний метод отримання піоціаніну є складним багатостадійним процесом та на сьогоднішній день використовується в лабораторних умовах для отримання досить невеликих об'ємів речовини. Біотехнологічний метод отримання піоціаніну є більш простим, безпечним та вигідним [2].

Культивування мікроорганізму *P. aeruginosa* проводять при 30 °C протягом 168 год в умовах аерації на середовищах загального призначення [4]. Тобто піоціанін не вимагає особливих умов культивування продуцента, а також він простий у виділенні, а тому може стати досить ефективним антибіотиком, виробництво якого можливе в Україні.

Загалом, всі біотехнологічні виробництва містять три стадії: ферментація (біосинтез продукту), розділення культурального середовища (відділення біомаси мікроорганізмів), очищення та виділення продукту з культуральної рідини [5].

Піоціанін є екзопродуктом, тобто виділяється безпосередньо в культуральну рідину, тому наступною стадією після біосинтезу є відділення біомаси продуцента фільтрацією від культуральної рідини, в якій і знаходиться антибіотик [4].

Найважливішим елементом фільтра є фільтруючий матеріал, який і визначає якість фільтрації і продуктивність устаткування. Серед великої кількості запропонованих на ринку конструкцій фільтрів та фільтроелементів різного складу, ми зупинились на не широко розповсюджених у біотехнології фторопластових фільтруючих елементах.

На кафедрі технології матеріалів ННІ Технічного сервісу Харківського національного технічного університету сільського господарства ім. Петра Василенка був розроблений метод виробництва фільтруючих елементів на основі фторопласту, який полягає у формуванні пор певного розміру за рахунок змішування суміші фторопласту з пороутворювачем ( $NaCl$ ), запікання суміші для стійкості форми, а потім ретельного послідовного вимивання пороутворювача [6, 7]. Високі регенеруючі властивості фільтроелементів на основі фторопласту та їх висока продуктивність обґрунтувало вибір даного виробу в якості об'єкту роботи для пошуку шляхів використання у біотехнологічних процесах.

Метою даної роботи було вивчення антимікробних властивостей культуральної рідини *Pseudomonas aeruginosa*, відділеної фільтрацією крізь фторопластові фільтруючі елементи.

#### **Об'єкти та методи дослідження**

Об'єктом даних досліджень були обрані пористі матеріали на основі (полі)тетрафторетилену; вид – диск, діаметр – 90 мм, висота – 6 мм; тонкість фільтрації – 1 мкм.

Культуральна рідина *P. aeruginosa*, що є продуцентом піоціаніну, використовувалась як модельний зразок для фільтрації. Як тест-штами для перевірки антимікробних властивостей були використані: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 11296. Мікробне навантаження становило  $10^7$  мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалася за стандартом McFarland. У роботу брали 18-24 годинну культуру мікроорганізмів.

Дослідження проводили методом перпендикулярних штрихів (на густому живильному середовищі - м'ясо-пептонному агарі МПА) та методом двократних

серійних розведень (на рідкому живильному середовищі - м'ясо-пептонному бульйоні МПБ).

При використанні методу перпендикулярних штрихів поверхню агаризованого середовища в чашці Петрі засівали штрихом досліджуваним мікроорганізмом – *P. aeruginosa*, що продукує антибактеріальну речовину. Посів робили по діаметру чашки, яку потім поміщали в термостат при температурі 37° С. Після завершення росту до досліджуваного мікроорганізму перпендикулярно підсівали штрихами тест-культури, починаючи від штриха культури, не торкаючись її. Чашки поміщали у термостат на 48 год. Якщо досліджуваний мікроорганізм утворює речовину, що надає антимікробну дію відносно тест-культур, то зростання останніх буде починатися на деякій відстані від росту самого антагоніста. Чим більша ця відстань, тим більш чутлива тест-культура до продукуваної антибіотичної речовини. Нечутливі мікроорганізми будуть розвиватися в безпосередній близькості від штриха.

Методом двократних серійних розведень у рідкому живильному середовищі визначали мінімальну бактерицидну концентрацію (МБК). Мінімальну кількість культуральної рідини, що викликає загибель мікроорганізмів через певний час, вважали мінімальною бактерицидною концентрацією.

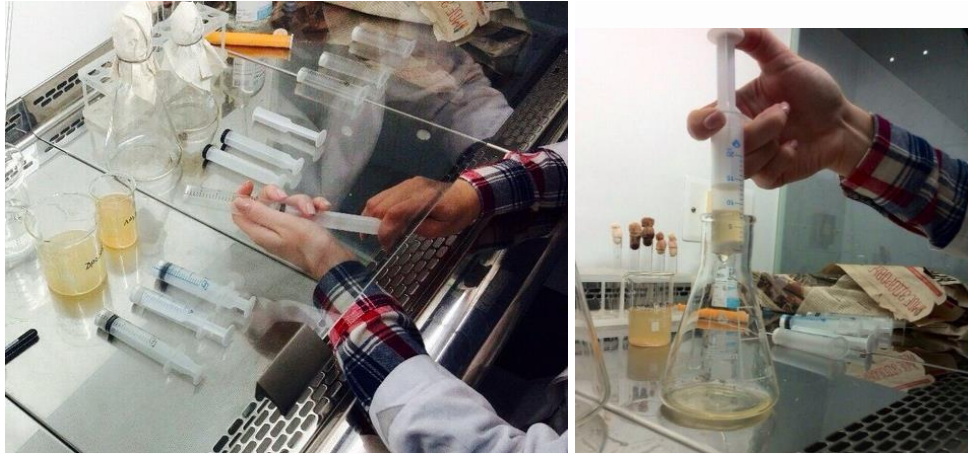
Для отримання основного розчину досліджуваного препарату (в даному випадку культуральну рідину досліджуваного мікроорганізму) розводили фізіологічним розчином 1:1. Далі готували ряд двократних розведень препарату у 2 мл МПБ із 10 пробірок, використовуючи для кожного розведення окрему піпетку. Для контролю середовища використовували 2 пробірки із 2 мл МПБ; для контролю розчинника – 2 пробірки із МПБ із додаванням фізіологічного розчину, що використовується для приготування основного розчину препарату; для контролю росту тест-мікроорганізмів – по 2 пробірки із 2 мл МПБ. Після цього до кожної пробірки, у тому числі й контролю тест-штаму, вносили по 0,2 мл мікробної зависі відповідного тест-мікроорганізму концентрацією  $10^7$  мікробних клітин на 1 мл. Посіви інкубували у термостаті при температурі (37±1) °С протягом (24-48) год.

Результати визначали візуально за наявністю або відсутністю каламутності середовища у пробірках. У контролях росту тест-мікроорганізма має спостерігатися ріст мікроорганізмів; контроль середовища має бути стерильним. Для визначення МБК із 2 останніх пробірок з прозорим середовищем проводили висівання по 0,1 мл вмісту кожної пробірки на чашки із відповідним густим середовищем. Витримували у термостаті при температурі (37±1) °С протягом (24-48) год та відмічали ту мінімальну концентрацію культуральної рідини *P. aeruginosa*, висівання з якої не дає росту на агарі. Ця кількість культуральної рідини відповідає його МБК.

### **Результати та їх обговорення**

Перед початком досліджень з дисків фільтруючих елементів вирізали диск меншого діаметру, який дорівнює внутрішньому діаметру шприцу, нижню частину шприцу відрізали та клеювали підготовлений диск. Для дотримання правил асептики шприц із вклеєним диском обробляли спиртом, потім УФ-опромінювачем та зберігали у герметичному контейнері.

Вивчення антимікробних властивостей культуральної рідини *P. aeruginosa* проводили на кафедрі біотехнології Національного фармацевтичного університету. Всі дослідження проводили в асептичних умовах ламінарного боксу зі стерильним посудом та попередньо обробленими шприцями з вмонтованими фільтроелементами (рис. 1).



**Рис. 1. Монтаж фільтруючого диска у шприці та відділення культуральної рідини та біомаси бактерій в умовах ламінарного боксу**

Вивчення антимікробної активності культуральної рідини *P. aeruginosa* проводили до та після фільтрації двома методами (для попередження отримання неадекватних результатів у зв'язку із різними харчовими компонентами при культивуванні культури на різних за складом і консистенції середовищах).

При вивченні антимікробної активності методом перпендикулярних штрихів про наявність та ступінь антимікробної активності у *P. aeruginosa* робимо висновок за величиною зони зростання тест-культури на межі зі штрихом зростання *P. aeruginosa* (рис.2).



**Рис.2. Ріст *Pseudomonas aeruginosa* і тест-культур при визначенні антимікробних властивостей методом перпендикулярних штрихів**

Результати визначення антимікробної активності культуральної рідини *P. aeruginosa* до та після фільтрації методом перпендикулярних штрихів наведені у табл.1.

Таблиця 1

**Визначення антимікробної активності культуральної рідини *P. aeruginosa* методом перпендикулярних штрихів**

№	Тест-культури	Зона затримки росту культуральної рідини, мм*	
		до фільтрації	після фільтрації
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	12,0±0,6	15,0±0,6
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,5±0,5	12,5±0,5
3.	<i>Proteus vulgaris</i>	8,0±0,7	10,0±0,7
4.	<i>Escherichia coli</i>	6,6±0,5	7,6±0,5

5.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,0±0,5	4,0±0,5
----	------------------------------	---------	---------

Примітки: \* n=3; (M±m)-довірчий інтервал

Вивчення антибіотичної активності показало виражену чутливість до досліджуваних тест-культур. Із табл. 1 бачимо, що найбільша ефективність дії спостерігалася по відношенню до *B. subtilis*, найменша - до *K. pneumoniae*. Порівняння антимікробних властивостей культуральної рідини до та після фільтрації показало деяке збільшення антимікробної активності.

Результати визначення антимікробної активності культуральної рідини *P. aeruginosa* до та після фільтрації методом двократних серійних розведень наведені у табл. 2.

Таблиця 2

**Визначення антимікробної активності культуральної рідини *P. aeruginosa* методом двократних серійних розведень**

№	Тест-культури	Мінімальна бактерицидна концентрація культуральної рідини, мкг/мл	
		до фільтрації	після фільтрації
1.	<i>Bacillus subtilis</i>	15	6,25
2.	<i>Staphylococcus aureus</i>	30	25
3.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	70	50
4.	<i>Escherichia coli</i>	120	100
5.	<i>Proteus vulgaris</i>	210	200

Як і в попередньому дослідженні, порівняння антимікробних властивостей культуральної рідини до та після фільтрації показало деяке збільшення антимікробної активності, що може бути обумовлено концентруванням клітин та, відповідно, виділенням більшої кількості антимікробних речовин клітинами мікроорганізму *P. aeruginosa*.

**Висновки**

Вивчення антимікробної активності культуральної рідини *P. aeruginosa* двома методами - методом перпендикулярних штрихів та двократних розведень, показало, що після фільтрації антимікробна активність дещо збільшилась, що може бути обумовлено концентруванням клітин та, відповідно, виділенням більшої кількості антимікробних речовин клітинами мікроорганізму *P. aeruginosa*.

Таким чином, узагальнюючи результати проведеної роботи, можна стверджувати, що піацианін, який продукується бактерією *P. aeruginosa*, є перспективною антибіотичною субстанцією, а сам мікроорганізм є можливим продуцентом для біотехнологічного отримання субстанції. Слід відмітити, що у процесі виробництва важливими стадіями є відділення культуральної рідини від продуцента і видалення піацианіну, при проведенні яких можна використовувати фторопластові фільтрувальні елементи, що мають багато переваг.

**Список використаних джерел**

1. Ra'oof W. M. In Vitro Study of the Swarming Phenomena and Antimicrobial Activity of Pyocyanin Produced by Pseudomonas Aeruginosa Isolated from Different Human Infections // European Journal of Scientific Research. – 2010. - Vol. 47, № 3. – P.405-421
2. Price-Whelan A., Dietrich L.E.P., Newman D.K. Rethinking «secondary»

metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics // *Nat. Chem. Biol.* 2006. V.2, No. 2. P. 71-78.

3. Baron S. S. Molecular mechanism of the antimicrobial action of pyocyanin / S. S. Baron, G. W. Terranova, J. J. Rowe // *Current microbiology.* – 1989. – Vol. 18. – P. 223 – 230.

4. J. Huang. Catabolite Repression Control of Pyocyanin Biosynthesis at an Intersection of Primary and Secondary Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2012. - Vol. 5. – P.5016-5020.

5. Гончаренко Г. Г. Основы биотехнологии: учебно-методический комплекс для студентов биологических специальностей / Г. Г. Гончаренко - Гомель: УО, 2008. - 282 с.

6. Kalyuzhny A.B., Karpova T.L., Kalyuzhny B.G., Platkov V.Ya. Structure and functional properties of high-porosity material based on Fluoroplast- 4 // *Functional Materials.* - 1999. - Vol. 6, №2. - P. 25-30.

7. Калюжний О.Б., Платков В.Я. Исследование структуры пористого материала методом графического компьютерного моделирования. Науковий журнал «Технічний сервіс агропромислового, лісового та транспортного комплексів» 2017 р. №9 с.74- 77.