

10. G. Xanthopoulou // *Chemical Engineering and Technology*. – 2001. – V. 24 (10). – P. 1025–1034.
11. G. Xanthopoulou // *Applied Catalysis A*. – 1999. – V. 185. – P. 185–192.
12. G. Xanthopoulou // *Applied Catalysis B*. – 1998. – V. 19. – P. 37–44.
13. G. Xanthopoulou, G.A.Vekinis // *Eurasian Chemico-Technological Journal*. – 2010. – V. 12 (1). – P. 17–21.
14. P. Bera, K.C. Patil, V. Jayaram, G.N. Subbanna, M.S. Hegde // *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. – 2008. – V. 12. – P. 44–50.
15. G. Xanthopoulou, S. Varitis, K. Karanasios, G. Vekinis // *SHS Journal*. – 2014. – V. 23 (2). – P. 92–100.
16. K. Karanasios, G. Xanthopoulou, G. Vekinis, L. Zoumpoulakis // 2014. – V. 23. (4). – P. 221–229.
17. M. Piumetti, D. Fino, N. Russo // *Applied Catalysis B*. – 2015. – V. 163. – P. 277–287.
18. C.-F. Yan, H. Chen, R.-R. Hu, S. Huang, W. Luo, C. Guo, M. Li, W. Li // *International Journal of Hydrogen Energy*. – 2014. – V. 39. (32). – P. 18695–18701.
19. L.H. Reddy, G.K. Reddy, D. Devaiah, B.M. Reddy // *Applied Catalysis A*. – 2012. – V. 445–446. – P. 297–305.

## **СТИМУЛИРОВАНИЕ ПРОДУКЦИИ ПИОЦИАНИНА БАКТЕРИЕЙ PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

*Д.Н. Токарева, магистрант гр. 4ГМ31,*

*К.А. Худеева, студент гр. 4Д10*

*Томский политехнический университет, 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30,*

*тел.(3822)-563-861*

E-mail: tokarevadarya328@mail.ru

В современной медицине антибиотики занимают особое место. Их специфичность заключается в высокой физиологической активности даже в очень низких концентрациях по отношению к определенным группам микроорганизмов (вирусам, бактериям, грибам, водорослям, простейшим) или к злокачественным опухолям [1]. К сожалению, многие распространенные антибиотикосо временем теряют свою активность вследствие формирования у бактерий резистентности к ним. Перспективной антибиотической субстанцией является соединение феназинового ряда – пиоцианин (PYO), темно-синий пигмент, продуцируемый бактерией *Pseudomonasaeruginosa* в процессе естественной жизнедеятельности.

Для любого промышленного производства важными являются критерии эффективности технологии. Увеличение/уменьшение продукции пиоцианина зависит не только от происхождения бактериального штамма, но и от условий культивирования продуцента (рН, аэрация, температура, состав питательной среды).

Условия, искусственно создаваемые для развития микроорганизма, можно легко варьировать и контролировать, что позволяет определять роль и влияние отдельных факторов среды на рост и развитие продуцента. На способность проявлять антибиотические свойства микроорганизмов влияет сложный комплекс условий культивирования [1].

Поэтому целью данной работы стало определение условий стимулирования продукции пиоцианина бактерией *Pseudomonasaeruginosa*.

*P. aeruginosa*, известная так же как синегнойная палочка, относится к условно-патогенным микроорганизмам. Температурные границы роста от 5-7 до 41°C (оптимум 25-37°C). Сохраняет жизнеспособность в растворах со значениями pH от 4,5 до 9,0, оптимальный диапазон pH – 7,2-7,5 [2]. *P. aeruginosa* продуцирует характерные феназиновые пигменты, в том числе пиоцианин (окрашивает питательную среду в сине-зеленый цвет), пиовердин (желто-зеленый и флуоресцентный), и пиорубин (бурый). Также известны и беспигментные штаммы этого вида [3].

Пиоцианин представляет собой активное окислительно-восстановительное соединение и изменяет цвет в зависимости от pH среды и степени окисления [4].

В работе использовали непатогенный пигментообразующий штамм *Pseudomonasaeruginosa*. Данный штамм продуцирует пиоцианин в достаточном количестве, чтобы изучить влияние различных факторов на его продукцию, а также для его выделения в кристаллическом виде. Штамм претерпел ряд пересевов, однако, способности продуцировать пиоцианин при этом не утратил.

Синтез пиоцианина в основном зависит от содержания источников углерода и азота в питательной среде [5]. Однако наличие некоторых ионов может существенно снизить или повысить выход пигмента. В литературных источниках нет единого мнения о влиянии тех или иных элементов на накопление биомассы бактерии *P. aeruginosa* на биосинтез пиоцианина.

Кривая роста микроорганизма дает полное представление об изменении роста культуры во времени, а по её типу в известной мере можно судить о процессах, лежащих в основе регуляции, изменения популяции.

В настоящее время известно, что характерное приращение оптической плотности в инокулированной питательной среде свидетельствует о размножении в ней микроорганизмов. Высокий уровень корреляции оптической плотности с количеством микробных тел позволяет опосредованно «кривую роста оптической плотности» называть «кривой микробного роста», представленной в виде графиков приращения оптической плотности на каждом шаге измерения [6].

Одной из главных задач нашего исследования стал подбор питательной среды, стимулирующей производство пиоцианина. Для этого был составлен ряд сред. В качестве главных источников углерода были выбраны различные аминокислоты, глюкозу и глицерин с присутствием в питательной среде ионов Mg, K, Ca, Fe, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>.

Качественный состав сред и концентрация пиоцианина, выделившегося через трое суток культивирования, представлены в таблице 1. Культивирование проводили при 32°C, в течение 7 суток при постоянном перемешивании, без дополнительной аэрации. Перемешивание производилось на термостатируемом шейкере ST-3.

Концентрацию пиоцианина определяли методом фотометрии на спектрофотометре СФ-102. Оптическую плотность супернатанта определяли при длине волны 690 нм. Далее рассчитывали концентрацию пигмента по формуле (1).

$$C = M \cdot \frac{A}{\varepsilon \cdot l} \quad (1)$$

где: C – концентрация вещества в растворе, мг/мл; M – молярная концентрация (M<sub>PyO</sub> = 210 г/моль); A – оптическая плотность поглощающего вещества; ε – молярный коэффициент поглощения (для пиоцианина ε<sub>690</sub> = 3400 моль<sup>-1</sup> л см<sup>-1</sup>); l – длина оптического пути (толщина кюветы – 1 см).

Таким образом, были определены два наиболее продуктивных и экономически выгодных состава сред, концентрация пиоцианина в которых оказалась максимальной. Среды № 13 и 18 были выбраны для дальнейших исследований. В качестве стандарта сравнения выбрана коммерческая питательная среда ГРМ – бульон (среда №1).

Сравнивая три характеристики (накопление биомассы, биосинтез антибиотика и продуктивность клеток), можно сделать вывод о том, на какой стадии развития *P. aeruginosa* продуцирует максимальное количество антибиотика [1].

Для получения кривой роста сначала был построен градуировочный график трехсуточной культуры (зависимость колониеобразующих единиц (КОЕ) от оптической плотности культуральной жидкости), затем проведены динамические измерения оптической плотности инокулята через равные промежутки времени при длине волны фотометрирования 580 нм. Контроль оптической плотности велся на спектрофотометре СФ-102.

Таблица 1. Качественный состав сред

№	Состав сред	Концентрация пиоцианина, мг/мл
<b>1</b>	<b>ГРМ - бульон</b>	<b>0,042</b>
2	ГРМ + Glu	0,022
3	ГРМ + Met	0,041
4	ГРМ+ Ala+Leu+Gly	Нет характерной окраски
5	ГРМ +Val	0,058
6	Глюкоза + NH <sub>4</sub> Cl + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, CaCO <sub>3</sub>	0,003
7	Среда №6 + Glu	Нет характерной окраски
8	Среда №6 + Met	0,001
9	Среда №6 + Ala+Leu+Gly	0,003
10	Среда №6 + Val	Нет характерной окраски
11	Глицерин + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O+FeSO <sub>4</sub> +Leu+Gly	Нет характерной окраски
12	Глицерин + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O+FeSO <sub>4</sub> +Ala	0,012
<b>13</b>	<b>Глицерин+K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O+FeSO<sub>4</sub>+Ala+Leu</b>	<b>0,126</b>
14	ГРМ+Глицерин+K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O+FeSO <sub>4</sub> +Leu+Gly	Нет характерной окраски
15	ГРМ+ Глицерин + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O+FeSO <sub>4</sub> +Ala	0,077
16	ГРМ+Глицерин+K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O+FeSO <sub>4</sub> +Ala+Leu	0,092
17	Глицерин+K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> +MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O+FeSO <sub>4</sub> +Ala+Leu+Gly	Нет характерной окраски
<b>18</b>	<b>ГРМ+ Ala + Leu</b>	<b>0,081</b>
19	ГРМ+ глицерин + K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, FeSO <sub>4</sub>	0,051

Таким образом, была построена кривая роста клеток *P. aeruginosa*. Кроме того, на протяжении всего роста культуры, продукцию пиоцианина определяли путем

измерения оптической плотности супернатантов при длине волны 690 нм (рис. 1, 2) [6].

Определив наиболее подходящий состав питательной среды и время культивирования микроорганизма, проводили выделение из культуральной жидкости и очистку пиоцианина.

Для выделения пиоцианина использовали экстракцию органическими растворителями. В работе использовали методику [7], однако в качестве растворителя был выбран хлористый метилен (менее токсичный и более летучий по сравнению с используемым в работе [7] хлороформом).

Чистоту полученного вещества определили с помощью ВЭЖХ (высокоэффективной жидкостной хроматографии) на компактном жидкостном хроматографе Agilent 1200 Compact LC, а также методом тонкослойной хроматографии (элюент:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{C}_6\text{H}_6$  - 80:15:5). Температуру плавления продукта определяли на приборе MP50 MeltingPointSystem.  $T_{\text{пл}} = 133^\circ\text{C}$  (лит.  $133^\circ\text{C}$  [8]).

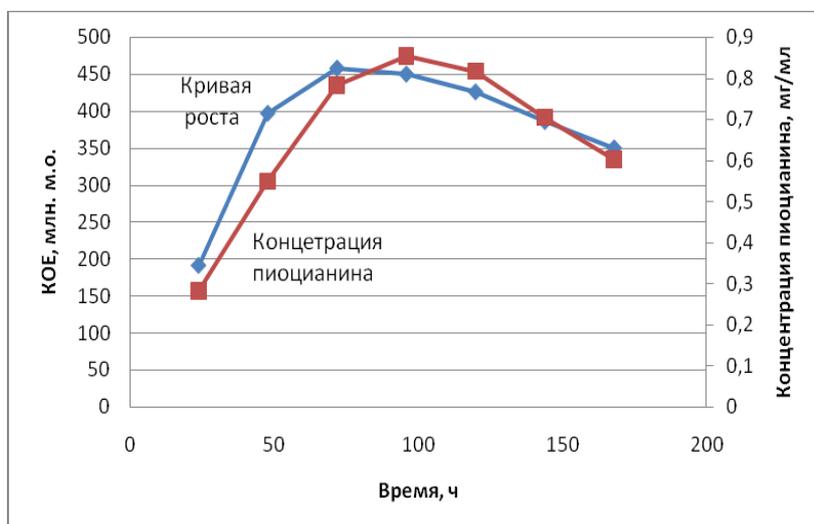


Рис. 1. График корреляции роста культуры и выделения пиоцианина в зависимости от времени (среда №13).

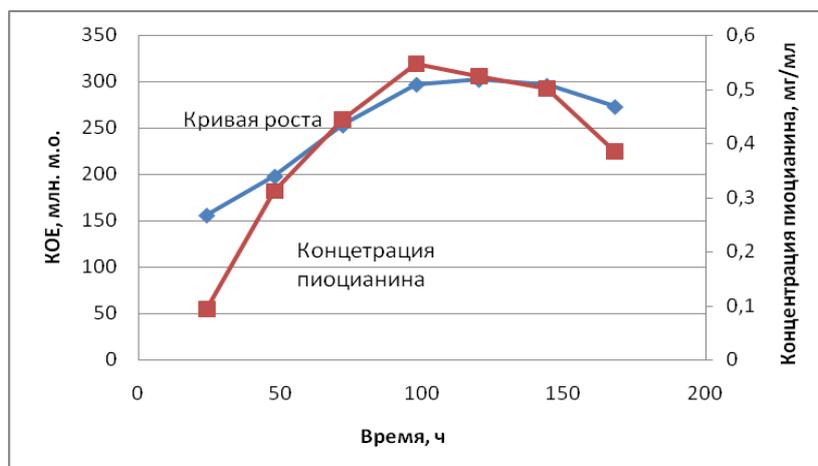


Рис. 2. График корреляции роста культуры и выделения пиоцианина в зависимости от времени (среда №18).

Структуру полученного соединения подтвердили с помощью УФ и ИК – спектроскопии. В исследовании использовались спектрофотометр СФ-102 и ИК-Фурье спектрометр BrukerTensor 27.

Полученное кристаллическое вещество хранили в морозильной камере при температуре – 40°C. Исходя из предположения, что аминокислоты участвуют в одной из стадии биосинтеза пиоцианина (шикиматный путь), а соли неорганических кислот являются медиаторами переноса электронов (ионы – кофакторы), мы использовали различные по составу среды для культивирования *P. aeruginosa*. Мы установили, что композиция аланина и лейцина в сочетании с солями стимулируют синтез пиоцианина.

В результате исследования была построена кривая роста клеток *P. aeruginosa* в зависимости от оптической плотности и определена продукция пиоцианина на каждом этапе роста культуры продуцента. Была проведена экстракция пигмента с заменой растворителя. Так же были проведены исследования на определение чистоты полученного вещества и подтверждение его структуры.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что наличие аминокислот аланина и лейцина в питательной среде стимулирует продукцию пиоцианина. Так же была проведена замена растворителя на менее токсичный, что не только не влияет на выход пиоцианина, но и делает процесс экономически более выгодным.

Таким образом, нами были оптимизированы условия культивирования продуцента *Pseudomonas aeruginosa* и отработана методика выделения и очистки пиоцианина из культуральной жидкости.

#### **Список литературы:**

1. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках: учебник. – М.: Наука, 2004. – 528 с.
2. Воробьев А.А., Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: МИА, 2003. – 236 с.
3. Кузнецова М.В., Микробиология нозокомиальной синегнойной инфекции: мониторинг распространенности, биологические особенности возбудителя и новые подходы к диагностике // Пермская государственная медицинская академия им. ЕА. Вагнера. – 2014. – С. 16–17.
4. J. Huang. Catabolite Repression Control of Pyocyanin Biosynthesis at an Intersection of Primary and Secondary Metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – V. 5. – P. 5016–5020.
5. Яковлев В.И. Технология микробиологического синтеза. – Л.: Химия, 1987. – 272 с.
6. Скала. Л.З. Использование кинетических моделей роста микроорганизмов для оценки антибактериальной активности и клинической эффективности препаратов // Сборник тезисов Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 1996. – С. 206–222.
7. W.M. Ra'oof. 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. – V. 47. – № 3. – P. 405–421.
8. Досон Р. Справочник биохимика. – М.: Мир, 1991. – 544 с.