

УДК 636.09:602:579.842.1/.2

ГОРДІЄНКО О.І., канд. с.-г. наук, gordienko\_1952@i.ua

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ), м. Київ*

### ВИКОРИСТАННЯ ВИСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМУ А-300 ПРИ СУБЛІМАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ

*У статті висвітлені результати проведення аналізу фізико-хімічних властивостей полісорбів (аеросилів) з метою виявлення їх впливу на живі клітини за їх взаємодії.*

*Проведені дослідження щодо використання аеросилу А-300 (аміноорганокремнезему), як складової захисного середовища при ліофільному висушуванні виробничого штаму *E. coli* O55.*

*Показано, що додавання полісорбу А-300 у кількості 0,3% до захисного сахарозо-желатинового середовища Файбіча збільшує вихід життєздатних клітин після ліофільного висушування в 5 разів, завдяки утворенню захисного шару у вигляді сорбованих на поверхні клітини мікрочастинок аеросилу.*

**Ключові слова:** кремнезем, полісорб, аеросил, поверхня клітини, ліофілізація, захисне середовище.

**Вступ.** Високодисперсні кремнеземи – це оброблені за спеціальною методикою двооксид кремнію  $\text{SiO}_2$ . Характерною особливістю його є присутність великої кількості гідроксильних груп [1, 2].

Заміщення їх на інші хімічні елементи суттєво збільшує можливості використання одержаних органокремнеземів для імібілізації біологічно активних препаратів (лікарських засобів, вакцин, ферментів, пестицидів, компонентів захисних та живильних середовищ для клітин).

Високодисперсні органокремнеземи практично не містять домішок, мають велику питому поверхню, ультрамалі розміри частинок, високі сорбційні якості. Вони стійкі до впливу температури, ультрафіолетового випромінювання, що дає змогу стерилізувати їх відомими методами [3].

В межах визначених концентрацій така сполука кремнію фізіологічно нешкідлива і споріднена з біосистемою, стабільна при зберіганні. Хімічна природа приєднаних до діоксиду кремнію груп визначає гідрофільні або гідрофобні якості поверхні високодисперсних аеросилів, що в подальшому визначає його використання в біотехнологіях різного призначення (ад'юванти, диспергатори тощо) [1–4].

Відомо, що фізико-хімічні властивості модифікованих високодисперсних кремнеземів дають змогу використовувати їх у технологіях виготовлення лікарських засобів для покращення їх якостей. Присутність їх у складі захисних середовищ, які використовують у виробництві імунобіологічних засобів, забезпечує стабільність та життєздатність клітин за тривалого зберігання [5, 6].

Одним з представників органокремнеземів є високодисперсний аміноорганокремнезем (аеросил) А-300. Завдяки високим полісорбційним властивостям його використовують в біотехнології, медицині, фармації, а також в лабораторній практиці. Аеросил А-300 має велику осмотичну активність [4, 5].

Аеросил-300 є активним адсорбентом для багатьох видів мікроорганізмів. Частинки аеросилу приблизно в 4 рази менші розміру мікроорганізмів ентерогруп. В момент додавання його до клітин мікроорганізмів він має властивість спочатку утворювати конгломерати, чим збільшує свою адсорбційну ємність і після контакту з живими клітинами може змінювати деякі обмінні процеси [2, 6].

Адсорбційна здатність полісорба для кишкової палички становить 99,8% при концентрації мікробних клітин  $10^9$  та концентрації аеросилу - 6,6 мг/мл та 100% при концентрації мікробних клітин  $10^5$  та концентрації аеросилу 13,3 мг/мл. Взаємодія аеросилу з мікробною клітиною не впливає на фізіологічні властивості клітин [2], тому на поверхні м'ясопептонного агару (МПА) в безпосередній близькості з аеросилом малих концентрацій визначають інтенсивний ріст мікробних клітин.

Відомо, що аеросил має здібність до комплексоутворення з білками, вуглеводами, фосфоліпідами оболонки клітин і може виконувати функцію «зшиваючого» агента в мембранних структурах, а також впливає на обмінні процеси в клітині [5].

**Метою даної роботи** було провести аналіз загальної характеристики фізико-хімічних властивостей аеросилу А-300, для визначення його впливу на поверхню живої клітини при ліофільному висушуванні бактерії *E. coli* O155 та підбір його оптимальної концентрації у захисному середовищі.

#### **Матеріали і методи досліджень.**

Нами були проведені дослідження щодо визначення оптимальної концентрації аеросилу А-300 для його використання, як складової захисного середовища при ліофілізації колекційного виробничому штамі *E.coli*O55.

Спочатку було вирощено добову культуру кишкової палички на поживному м'ясопептонному бульйоні (МПБ).

За основу захисного середовища ми взяли середовище Файбіча (10% сахарози та 1 % желатини) і виготовили три його модифікації додаванням різних концентрацій аеросилу 300: 0,1 %, 0,3 % та 0,4% відповідно

Для вивчення впливу аеросилу А-300 на стабільність та життєздатність клітин *E. coli* O55 під час ліофільного висушування отриману бактерійну культуру розділили на чотири частини. До кожної з частин було додано захисне середовище різних рецептур: середовище Файбіча; середовище Файбіча з 0,1% А-300; середовище Файбіча з 0,3% А-300; середовище Файбіча з 0,4% А-300 . Співвідношення культуральної суспензії до об'єму захисного середовища становило 1:1.

Ліофілізацію проводили на апараті Qriodoz фірми Telstar за параметрами: попереднє заморожування мінус 67°C, температура конденсора мінус (45-50) °C; глибина вакууму – 0,15 - 0,17 mBar ;термін висушування -24 години.

Після висушування була підрахована кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) бактерії.

#### **Результати досліджень та їх обговорення**

Проведені дослідження щодо впливу на збереження життєздатності клітин виробничого штаму *E. coli* O55 за ліофільного висушування з різними варіантами захисного середовища: Файбіча та його варіанти з додаванням різних концентрацій аеросилу А-300.

За показником кількості колонієутворюючих одиниць визначали кількість життєздатних клітин після ліофільного висушування.

Констатувати, що оптимальна концентрація аеросилу А-300 в захисному середовищі Файбіча становила 0,3%. Так, кількість життєздатних клітин за показником КУО після

ліофілізації культури із захисним середовищем, що містило 0,3 % аеросилу була в 5 разів більше ніж у культурі, що була висушена без аеросилу. Результати досліджень наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

**Результати досліджень впливу аеросилу-300 на життєздатність клітин *E.coli* 055, n=3**

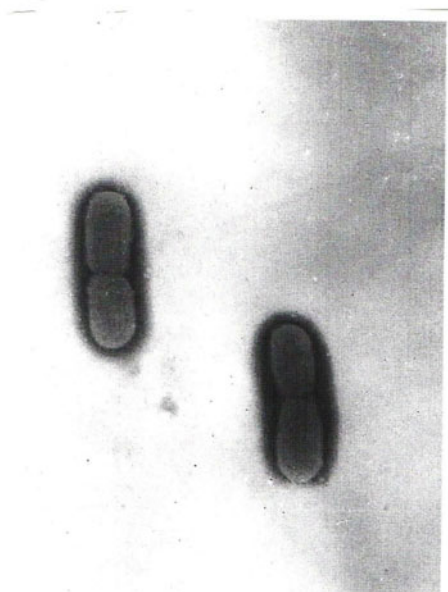
№п/п	Захисне середовище	Кількість живих мікр. клітин, КУО/см <sup>3</sup>	
		До ліофілізації	Після ліофілізації
1	Середовище Файбіча без додавання аеросилу-300	6±0,3 ×10 <sup>6</sup>	1±0,1 ×10 <sup>6</sup>
2	Середовище Файбіча із додаванням 0,1 % аеросилу-300		1,2±0,2 ×10 <sup>6</sup>
3	Середовище Файбіча із додаванням 0,3 % аеросилу-300		5±0,2 ×10 <sup>6</sup>
4	Середовище Файбіча із додаванням 0,4 % аеросилу-300		4,5±0,2 ×10 <sup>6</sup>

Характер взаємодії *E. coli* O55 при додаванні різних концентрацій А-300 спостерігали за використання електронно – мікроскопічних досліджень.

Вони показали, що додавання 0,3% полісорбу є оптимальним. Це підтверджується створенням на поверхнях клітин рівномірного шару завдяки сорбції мікрочастинок аеросилу А-300 (рис 1).

Така штучна оболонка з аеросилу на поверхні живої клітини, завдяки фізико-хімічним процесам, що проходять на поверхні живих клітин, захищає їх від негативного впливу глибокого заморожування біомаси перед висушуванням та безпосереднього сублімування молекул води із замороженої біомаси.

10 x 1000



**Рисунок 1. Клітини *E. coli* 055 оточені захисним шаром із аеросилу-300**

За результатами проведених досліджень можливо стверджувати, що механізм захисту клітин за глибокого заморожування та сублімування обумовлено фізико-хімічними властивостями аеросилу А-300, а саме його сорбційною ємністю, високою дисперсністю та здатністю аглютинувати з утворенням конгломератів у розчинах, утворюючи захисний шар на поверхні клітини

#### Висновки та перспективи подальших досліджень

1. При додаванні аеросилу А-300 у захисне середовище утворюється захисний шар на поверхні клітин виробничого штаму *E.coli* 055 завдяки сорбції високодисперсних частинок.
2. Оптимальна концентрація аеросилу-300 у захисному середовищі Файбіча 0,3 %.
3. Додавання до захисного середовища Файбіча 0,3% аеросилу А -300 забезпечує вихід життєздатних клітин після ліофілізації у 5 разів більший ніж без його додавання.
4. Перспективним є впровадження захисного середовища з додаванням аеросилу А-300 у технології зберігання методом ліофільного висушування інших бактерійних культур.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Чуйко А.А. Химия поверхностных  $\text{SiO}_2$  природа и роль активных центров кремнезема в адсорбционных и хемосорбционных процессах: автореферат. дис. на соискание уч. степени д-ра. хим. наук: 01.04.18 «Физика и химия поверхности»/ А.А. Чуйко. – К., 1971. – С. 28 – 29.
2. Богомаз В.И. Синтез, свойства и применения новых видов модифицированных пирогенных кремнеземов: автореферат дис. на соискание уч. степени канд. хим. наук: 01.04.18 «Физика и химия поверхности» / В.И. Богомаз. – К., 1982. – 21 с.
3. Патент 37444 UA, 7 C01B33/12, B01/20/10 Спосіб одержання кремнеземного адсорбенту/ Миронюк І.Ф., Чуйко О.О., Яремчук Е.М., Огенко В.М. – опубл. 15.08.2002. – Бюл. №8.
4. Миронюк І.Ф. Хімічні аспекти пірогенного синтезу кремнезему / І.Ф. Миронюк // Хімія, фізика і технологія поверхності. – 2001. – Вып. 3.– С. 15– 20.
5. Миронюк И.Ф. и др. Строение, свойства и структура гидрофобизированных поверхностей кремнезема / И.Ф. Миронюк, В.В.Лобанов, В.М. Огенко, А.А. Чуйко // Химия поверхности кремнезема в 2 ч / под ред. акад. НАН Украины А.А. Чуйко. – К.: 2001. – Ч.1.– с. 113–147
6. Characterization of fumed Silicas and their Interaction with Water and Dissolved Proteins/ I. F. Mironyuk, V.M.Gun'ko, V.V. Turov, et al. // Colloid. Surf. A. – 2001 - №180 – p. 87-101

#### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА А-300 ПРИ СУБЛИМАЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ/ Гордиенко О.И.

*В статье описаны результаты проведения анализа физико-химических свойств полисорбов (аэросил) с целью выявления их влияния на живые клетки при их взаимодействии. Проведенные исследования по использованию аэросила А-300 (аминоорганокремнезему), как составляющей в защитной среде при лиофильном высушивании производственного штамма *E. coli* 055. Показано, что при добавлении полисорба А-300 в количестве 0,3% от объема защитной среды Файбича увеличивает выход жизнеспособных клеток после лиофильной сушки в 5 раз, благодаря образованию защитного слоя в виде сорбированных на поверхности клетки микрочастиц аэросила.*

**Ключевые слова:** кремнезем, полисорб, аэросил, поверхность клетки, лиофилизация, защитная среда.

#### USE OF HIGH-DIDISPERS SILICONS A-300 IN THE SUBMLIMATION OF MICROORGANISMS / Gordienko O.I.

**Introduction.** Highly dispersed silica is a specifically treated  $\text{SiO}_2$  silicon dioxide. Its characteristic feature of this is the presence of a highly developed surface covered with a large number of hydroxyl groups. In the limits of certain concentrations, such silicon dioxide is physiologically harmless and related to the

biosystem is stable for storage. The chemical nature of the attached groups determines the hydrophilic or hydrophobic quality of the surface of highly dispersed aerosols, which further determines its use in biotechnologies of various applications (adjuvants, dispersants, etc.)

**The goal of the work.** Analysis of the general characteristics of the physical and chemical properties of the modified aerosil to studying its effect on the surface of the live cell during their interaction and the selection of its optimal concentration in the protective medium during freeze-drying of *E. coli* O55.

**Materials and methods.** Originally, a daily culture was grown on the nutrient broth of the MPB. To one part of the daily culture, a protective medium of Faibicha was added in the ratio 1: 1, to the second part - the medium of Faibicha with 0.1% A-300, to the third part - the medium of Faibicha with 0.3% aerosil-300, to the fourth part - the medium Faibicha with 0.4% A-300.

**Results of the study and discussion.** The number of viable cells in the CFU index increased after freeze-drying in 5 times (500%), namely 5,000,000 cells per cm<sup>3</sup> according to the results with the control sample without the addition of the aerosil-300 in the protective environment. The nature of the interaction of *E. coli* O55 with the addition aerosil-300 of various concentrations was observed using electron microscopic studies. It was established addition of 0.3% polysorb is optimal. It was confirmed by the creation of an even surface of cells with the formation of a layer on its surface due to sorption of microparticles A-300 (polysorb). Such an aerosol artificial shell on the surface of a living cell, due to physical and chemical processes passing on the surface of living cells, provides protection from the negative effects of deep freezing on biomass before drying and direct sublimation of water molecules from frozen biomass.

#### **Conclusions and prospects for further research:**

1. Monitoring of the use of aerosils in biotechnology was conducted.
2. Microparticles of aerosil were sorbed on the surface of the cell and form protective layer.
3. Optimal concentration of aerosil-300 in the protective medium of Faibicha is 0.3%;
4. The level of cells protection of the productive strain *E. coli* O55 for freeze-drying is in 5 times (500%), compared with drying control without aerosil -300.
5. It is promising to introduce a protective atmosphere with aerosil-300 in the technology of storage of other bacterial cultures.

#### **REFERENCES**

1. Chujko A.A. (1971) Himija poverhnosnyh SiO<sub>2</sub> priroda i rol' aktivnyh centrov kremnezema v adsorbcionnyh i hemosorbcionnyh processah [Chemistry of surface SiO<sub>2</sub> nature and role of active centers of silica in adsorption and chemisorption processes] *Extended abstract of candidate's thesis*. Kiev [in Russian]
2. Bogomaz V.I. (1982) Sintez, svojstva i primenenija novyh vidov modifitsirovanyh pirogenykh kremnezemov [Synthesis, properties and applications of new types of modified pyrogenic silica] *Extended abstract of candidate's thesis*. Kiev [in Russian]
3. PAT. 37444 (Ukraine), 7 S01V33/12, V01/20/10 (2002) *Sposib oderzhannja kremnezemnogo adsorbentu [Method for obtaining a silica adsorbent]*/ I.F. Mironjuk, O.O. Chujko, E.M. Jaremchuk, V.M. Ogenko –Bjul. #8 [in Ukrainian]
4. Mironjuk I.F. (2001) Himichni aspekti pirogenного синтезу кремнезему [Chemical aspects of pyrogenic synthesis of silica]. *Himija, fizika i tehnologija poverhnosti – Chemistry, physics and surface technology*. 3, 15– 20 [in Ukrainian]
5. Mironjuk I.F., Lobanov V.V., Ogenko V.M., Chujko A.A. (2001) Stroenie, svojstva i struktura gidrofobizirovanyh poverhnostej kremnezema [Structure, properties and structure of hydrophobic silica surfaces]. *Himija poverhnosti kremnezema v 2 ch [Chemistry of silica surface in 2 ch]*. A.A. Chujko. – K.Ch.1.- s. 113-147 [in Russian]
6. Mironyuk I. F., Gun'ko V.M., Turov V.V., Zarko V.I., Leboda R. (2001) And Skudiszewska-Zieba J. Characterization of unmodified Silicas and their Interaction with Water and Dissolved Proteins. *Colloid. Surf. A*. 180 – r. 87-101 [in English]