

УДК 579.22]: 534 - 8 + 616 - 004.8

А. Л. Я. Шестаковский

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВОЛОКНИСТОГО НАПОЛНИТЕЛЯ

В этой статье представлены результаты исследования процесса дезинтеграции микроорганизмов с использованием волокнистого наполнителя в объеме дезинтеграционной камеры. Ультразвуковая дезинтеграция клеток *Esherihia coli* и *Methilocystis echinoides* в проточной камере ультразвукового дезинтегратора, заполненной стеклянным волокном с силированной поверхностью и объемом волокна 0.1–0.7 от объема камеры, обеспечила более высокую степень дезинтеграции, выход белка, активность ферментов по сравнению с дезинтеграцией без волокнистого наполнителя при одинаковых значениях остальных условий и режимов дезинтеграции. Снижается электрическая мощность, затрачиваемая на дезинтеграцию.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из задач дезинтеграции микроорганизмов на ультразвуковом дезинтеграторе с использованием волокнистого наполнителя камеры дезинтегратора является полное исключение кавитации, которая приводит к дополнительному химическому воздействию на биологические структуры, вероятно, механической природы (микрорекинг макромолекул, образование свободных радикалов и др.), включая намол материала сосудов, в которых проводят дезинтеграцию микроорганизмов.

Исследования показали, что при определенных отношениях суммарной поверхности волокнистого наполнителя к объему озвучиваемой суспензии микроорганизмов кавитация полностью подавляется даже при сравнительно высоких интенсивностях ультразвука. Одновременно возрастает интенсивность акустических течений [1]. Возрастает эффективность дезинтеграции микроорганизмов (увеличивается процент разрушенных клеток) и выход белка.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки *Esherihia coli* были выращены в минеральной среде. В логарифмической фазе роста клетки были отделены центрифугированием на 5000 об/мин в течение 10 мин, дважды промыты раствором 0.14 моль NaCl в 0.01 моль трис-HCl буфере, pH 7.5, содержащем 0.01 моль MgCl₂ при температуре 4 °С. Для дезинтеграции клеток использовалась их суспензия в 0.01 моль трис-HCl буфере, pH 7.5, содержащая 0.01 моль MgCl₂.

Клетки *Methilocystis echinoides* выращены на минеральной среде в атмосфере метан—воздух (1:1) до середины экспоненциальной фазы при температуре 30 °С.

Состав среды, г/л:

KNO₃ — 1; KH₂PO₄ — 0.7; Na₂HPO₄ · 12H₂O — 1.3; MgSO₄ — 0.2; CaCl₂ — 0.02.

Микроэлементы — 1 мл/л.

Состав микроэлементов, г/л:

трилон Б — 5.0;

FeSO₄ · 7H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O, MgCl₂ · 4H₂O — 0.03;

CaCl₂ · 6H₂O — 0.2; CuCl₂ · 6H₂O — 0.01;

NiCl₂ · 6H₂O — 0.02; NaMnO₄ — 0.03.

Вода дистиллированная — 1 л.

Клетки центрифугировались на частоте вращения 5000 об/мин и отмывались калий-фосфатным буфером 0.05 моль, pH 7.5.

Дальнейшие условия одинаковы для обеих культур.

§ Концентрация суспензии — 15 · 10⁹ клт./мл.

§ Объем дезинтегрируемой суспензии — 60 мл.

§ Режим протока — циркуляция.

§ Объемный расход суспензии — 60 мл/мин.

§ Время дезинтеграции — 10 мин.

§ Температура суспензии поддерживалась в пределах от 2 до 8 °С.

§ Частота колебаний наконечника — 22 кГц, амплитуда — 14 ± 16 мкм, мощность дезинтеграции — 100 Вт.

Дезинтеграция проводилась в специальной камере, конструкция которой описана ниже. Камера была заполнена волокнистым наполнителем (рис. 1). Волокнистый наполнитель представляет собой стеклянные волокна диаметром 8–12 мкм с силированной поверхностью, 0.1–0.7 от объема камеры.

Для сравнения проводилась дезинтеграция суспензий этих же культур при аналогичных условиях, но без наполнителя. Определялась оптическая плотность исходных суспензий и дезинтеграта. Концентрация клеток рассчитывалась по калибровочным кривым.

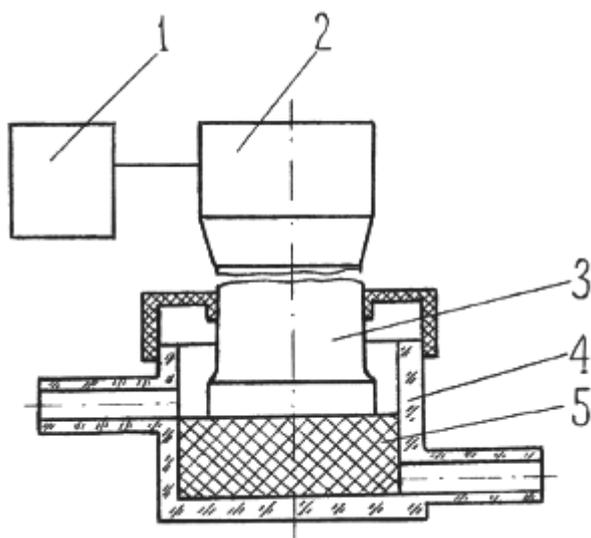


Рис. 1. Схема установки для ультразвуковой дезинтеграции в камере с волокнистым наполнителем.

1 — ультразвуковой генератор; 2 — концентратор; 3 — наконечник; 4 — камера; 5 — волокнистый наполнитель

Процент разрушения клеток определялся фотометрическим способом. Определения концен-

трации белка в дезинтеграте и активности ферментов в супернатанте производились после центрифугирования дезинтеграта в течение 10 мин. Белок определялся по методу Лоури [2].

Активность NH_4 -зависимых дегидрогеназ метанола и формальдегида, NH_4 -независимых дегидрогеназ формальдегида и формиата определялась по восстановлению 2,6-дихлорфенолиндофенола на 600 нм [3].

Активность NAD-зависимой формиатдегидрогеназы определялась по восстановлению NAD на 300 нм [4].

Активность NADH-оксидазы определялась по окислению NADH на 340 нм [3].

Активность сукцинатдегидрогеназы определялась по восстановлению дихлорфенолиндофенола на 600 нм [5].

Активность АТФ определялась по скорости восстановления АТФ до АДФ и ортофосфата. Ортофосфат определялся по методу Беренблюма и Чейна [6] в модификации Грина [7].

Проверка влияния волокнистого наполнителя на потребляемую при дезинтеграции мощность проводилась в камере вместимостью 50 мл. Проток воды, имитирующей суспензию микроорганизмов, — 70 мл/мин; температура воды — 4 °С.

Для сравнения проводилось озвучивание воды при указанных выше условиях, но без наполнителя (контрольный опыт).

Табл. 1. Результаты дезинтеграции клеток *Methylocystis echinoides*

Характеристика		Способ дезинтеграции	
		Без наполнителя	С волокнистым наполнителем
Выход белка (по Лоури), мг/мл		0.1	0.36
Эффективность дезинтеграции, %		6	19
Активность ферментов, МЕ/мг белка/мин	Метанолдегидрогеназа	0	15
	Формальдегиддегидрогеназа	0	14
	Формиатдегидрогеназа (NAD)	0	143
	Формиатдегидрогеназа (ФМС)	23	183
	Сукцинатдегидрогеназа	0	9

Табл. 2. Результаты дезинтеграции клеток *Escherichia coli*

Способ дезинтеграции	Эффективность дезинтеграции, %	Белок (по Лоури)	Активность АТФ, МЕ/мг белка/ мл
Без наполнителя	47	0.34	77.8
С волокнистым наполнителем	56	0.55	86.6

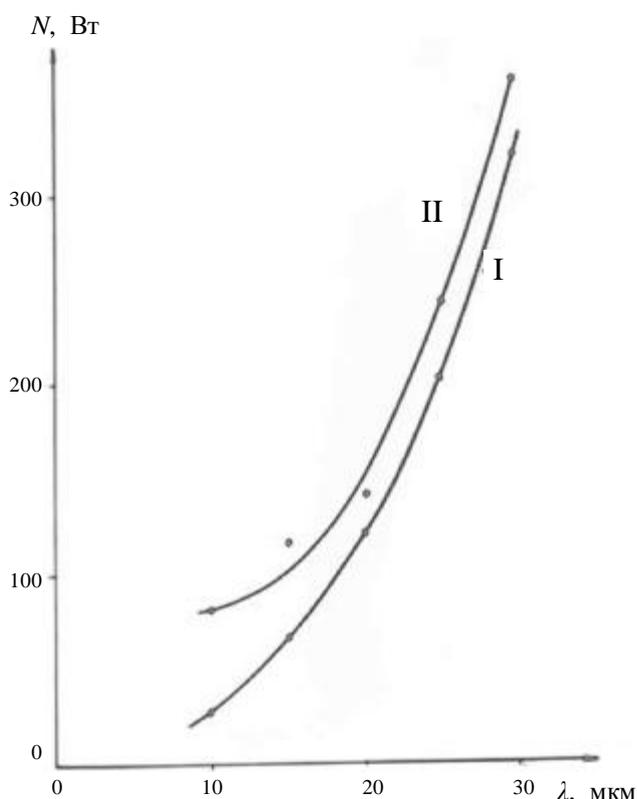


Рис. 2. График зависимости мощности от амплитуды колебаний наконечника.

I — камера с волокнистым наполнителем; II — камера без наполнителя

ОБОРУДОВАНИЕ И ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

Используемые приборы: спектрофотометры ФЭК-60П, СФ-16 (изготовитель СССР), Spekord UV VIS (изготовитель ГДР); исследовательский биологический микроскоп Биолам И-1 (ЛОМО).

Исследования были проведены на ультразвуковом дезинтеграторе микроорганизмов UDM-10, разработанном приборостроительной фирмой Техран (Польша). Дезинтегратор оснащен устройством термостатирования и протока жидкости

УТП, поддерживающим заданный предел температур в камере дезинтегратора и время дезинтеграции, разработанным в ИБП РАН (НПО "Био-прибор" АН СССР).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты дезинтеграции приведены в табл. 1 и 2. Влияние волокнистого наполнителя на потребляемую мощность показано на графике рис. 2).

Проведение ультразвуковой дезинтеграции в камере с волокнистым наполнителем показывает, что при уменьшенной в 2 раза амплитуде колебаний вибратора (8 мкм), эффективность дезинтеграции возрастала в 1.2–3 раза. При этом мощность оставалась на одном уровне с контрольными опытами (без наполнителя), а выход белка увеличился в 1.5 раза. Для клеток с более прочными оболочками эффективность использования волокнистого наполнителя еще выше.

Использование при дезинтеграции волокнистого наполнителя приводит к снижению мощности в 1.2–3.5 раза по сравнению с контролем. И чем меньше амплитуда колебаний вибратора, тем больше снижается мощность за счет использования волокнистого наполнителя.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ратнер Е.Н., Фихте Б.А. // Материалы всесоюзной конференции "Дезинтеграция микроорганизмов". Пушино, 1972. 223 с.
2. Lowry O.H., Rozebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent // Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265–275.
3. Weaver T.L., Dugan P.R. Methyltrophic Enzyme Distribution in Methylosinus Trichosporium // J. Bacteriol. 1975. V. 122, N 2. P. 433–436.
4. Johnson P.A., Quayle J.R. Microbial Growth on C₁ Compounds. 6. Oxidation of Methanol, Formaldehyde and Formate by Methanol-Grown Pseudomonas AM1 // Biochem. J. 1964. V. 93,

- N 2. P. 281–290.
5. Chopra I., Howe G.B., Ball P.R. Lysozyme-promoted Association of Protein I Molecules in the outer Membrane of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1977. V. 132, N 2. P. 411–418.
6. Berenblum I., Chain E. An Improved Method for the Colorimetric Determination of Phosphate // Biochem. J. 1938. V. 32, N 2. P. 295–298.
7. Weil-Malcherbe H., Green R.H. // J. Biochem. 1951. V. 49. P. 286.

*Институт биологического приборостроения РАН,
г. Пушкино*

Материал поступил в редакцию 20.07.2007.

ULTRASONIC DISINTEGRATION OF MICROORGANISMS WITH FIBROUS FILLING AGENT

L. Ya. Shestakovsky

Institute for Biological Instrumentation of the Russian Academy of Sciences, Pushchino

The paper presents the results of investigating the processes of ultrasonic disintegration of microorganisms by using fibrous filling agent in the disintegration chamber. Ultrasonic disintegration of *Escherichia coli* and *Methilocystis echinoides* cells, which was carried out in the ultrasonic disintegrator flow-through chamber filled with siliconized fibrous glass with volume of 0.1–0.7 of the chamber volume, provided higher degree of disintegration, yield of dissolved protein, and enzyme activity as compared to disintegration without fibrous filling agent with the same parameters of other conditions and disintegration modes. In addition, electric power consumption for disintegration is lower in this case.