

логического мониторинга уровня загрязненности водных сред тяжелыми металлами лучше использовать тест подвижности клеток, т.к. он обладает более высокой чувствительностью и малой длительностью анализа около 15 мин, тогда как тест на выживаемость клеток требует 24 часа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жмур Н.С. Технологические и биохимические процессы очистки сточных вод на сооружениях с аэротенками. М.: АКВАРОС, 2003. – 512 с.
2. Прикладная экобиотехнология: учебное пособие: в 2 т. / А.Е. Кузнецов [и др.]. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010. Т. 1. – 629 с. Т. 2. – 485 с.
3. Игнатенко А.В. Детоксикация осадков сточных вод и методы ее контроля // Труды БГТУ, 2016. Сер. № 4. – С. 210–213.

УДК 579.6

Студ. Е. А. Сатырова

Науч. рук. доц. А. В. Игнатенко

(кафедра биотехнологии и биоэкологии, БГТУ)

АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ ПРОТОПЛАСТИРОВАНИЯ ГР(+) И ГР(-) БАКТЕРИЙ

Клеточная стенка играет важную роль в жизнедеятельности клеток. Она придает им механическую прочность, защищает содержимое от повреждений и избыточной потери воды, поддерживает форму и размер клеток, регулирует транспорт веществ. Удаление клеточной стенки приводит к формированию протопластов или сферопластов. Протопласты имеют все свойства присущие клетке, а также способность к слиянию.

Слияние протопластов – один из основных способов получения гибридных организмов в генетической инженерии [1]. Такой метод генетического обмена универсален и даёт возможность соединять клетки организмов разных видов и родов.

Методы получения протопластов можно объединить в две группы, одна из которых основана на ферментативном лизисе клеточной стенки с помощью ферментов; а другая – на применении факторов, подавляющих нормальный синтез клеточной стенки.

Клеточные стенки Гр(+) и Гр(-) бактерий сильно отличаются друг от друга количеством слоев мууреина, наличием тейхоевых кислот и наружной мембраны.

Для разрушения клеточной стенки Гр(+) бактерий используют фермент лизоцим, который атакует β -1,4-гликозидные связи в муреиновых цепочках, что приводит к нарушению всего пептидогликанового каркаса.

Гр(-) бактерии менее чувствительны к лизоциму, и для разрушения их клеточной стенки необходимо добавлять этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), являющегося хелатообразующим агентом связывающим двухвалентные катионы Ca^{+2} , которых много в наружной мембране Гр(-) бактерий.

Цель работы – анализ возможности использования спектрофотометрии и биокалориметрии для изучения процесса протопластирования и оценки выхода протопластов.

На рисунке 1 представлена кинетика изменения оптической плотности D_{600} в процессе протопластирования клеток *Clostridium spp.*

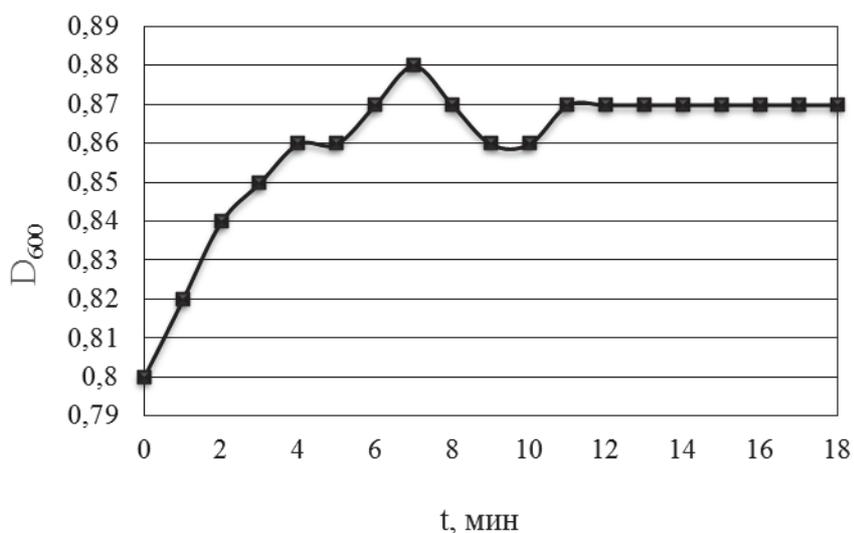


Рисунок 1 - Кинетика изменения оптической плотности D_{600} от времени протопластирования Гр(+) бактерий *Clostridium spp.* ($T = 20^\circ\text{C}$)

Метод спектрофотометрии основан на измерении светорассеивания клеток и протопластов в зависимости от числа и формы микроорганизмов. При утрачивании клетками своей клеточной стенки их форма и размер изменяются, что приводит к увеличению их светорассеивания (рисунок 1). Из полученных данных следует, что весь процесс протопластирования клеток Гр(+) бактерий *Clostridium spp.* заканчивается в течение 10 мин, тогда как по данным [2] процесс протопластирования при 30°C завершается в течение 20 – 30 минут. Наблюдаемые изменения оптической плотности не превышают 10%, что недостаточно для точного определения выхода протопластов.

Биокалориметрия основа на измерении количества теплоты, выделяющейся в процессе жизнедеятельности клеток. Чувствительность метода биокалориметрии составляет 1 мкВт, что позволяет более детально охарактеризовать состояние клеток.

На рисунке 2 приведены результаты анализа кинетики процесса протопластирования отдельных Гр(+) и Гр(-) бактерий биокалориметрическим методом. Как видно из рисунка 2, в процессе протопластирования бактерий уровень тепловыделения образцов увеличивается на 1–2 порядка. Это указывает на то, что при разрушении клеточной стенки бактерии переходят в стрессовое состояние, и удельное тепловыделение протопластов выше, чем у исходных клеток.

Биокалориметрия позволяет точно определить время окончания протопластирования. Продолжительность получения протопластов Гр(+) и Гр(-) бактерий при 30°C составила 60–80 мин. Для *Bacillus subtilis 168* и *Clostridium spp.* наблюдается несколько стадий изменения кинетики тепловыделения клеток при протопластировании.

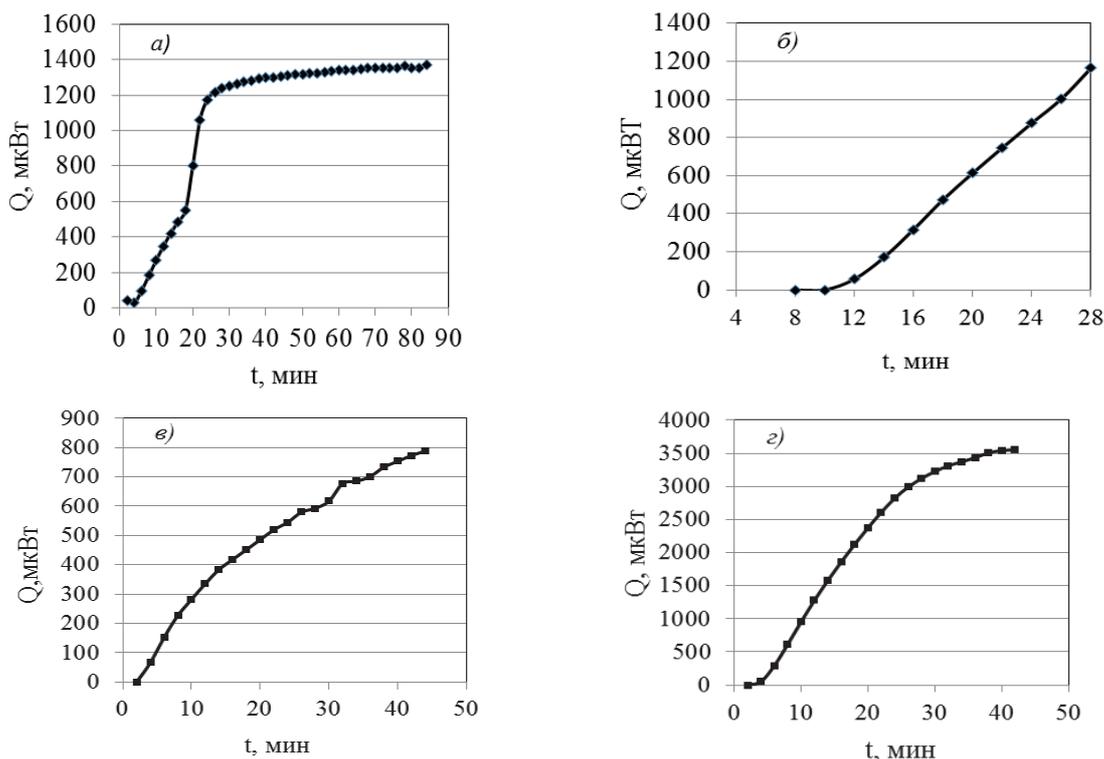


Рисунок 2 – Кинетика тепловыделения при протопластировании клеток:
 а) *Bacillus subtilis 168*; б) *E. coli*; в) *Clostridium spp*; г) *Pseudomonas fluorescens*

В таблице приведены результаты оценки выхода протопластов полученные методом спектрофотометрии и биокалориметрии в сравнении с методом посева.

Таблица – Оценка выхода образования протопластов методами посева, спектрофотометрии и биокалориметрии

Методы	D ₀	D _t	Q ₀ , мкВт	Q _t , мкВт	N ₀ , КОЕ/мл	N _t КОЕ/мл	Выход, %
Спектрофотометрия	0,80	0,87	-	-	-	-	8,7
Биокалориметрия	-	-	80,1	800,4	-	-	90,5
Метод посева	-	-	-	-	2,88×10 ⁻⁸	1,8×10 ⁻⁷	93,7

Эффективность образования протопластов можно определить по формуле

$$\text{ЭП} = \frac{K_0 - K_t}{K_0},$$

где K₀ – параметр, характеризующий концентрацию, оптическую плотность и тепловыделение клеток в исходной культуре; K_t – параметр, характеризующий конечную концентрацию клеток после осмотического разрушения протопластов, оптическую плотность и тепловыделение клеток после протопластирования.

Из таблицы видно, что метод спектрофотометрии не подходит для оценки выхода протопластов, из-за высокой погрешности по сравнению с методом посева и культивирования клеток. Метод спектрофотометрии характеризует только начальную стадию процесса протопластирования, в то время как метод биокалориметрии характеризует весь процесс полностью.

Таким образом проведенное исследование показало, что метод биокалориметрии удобен для оценки выхода протопластов, определении времени протопластирования клеток Гр(+) и Гр(-) бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковенко К.Н., Троицкий Н.А. Протопласты микроорганизмов. – Мн.: Наука и техника, 1985. – С. 3-138.
2. Белясова Н.А., Гриц М.В. Биохимия и молекулярная биотехнология. Теория и методы. 2002. – С. 26-37.