

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ НА ПРОТОПЛАСТЫ И КЛЕТКИ МИКРООРГАНИЗМОВ

It has been shown by biocalorimetric method that protoplasts are more sensitive to phenol than cells of micro-organisms. Bio-calorimetry is well suited to monitoring of bacterial and protoplast's activity and is a comfortable indicator of activation, inhibition and toxic effects of xenobiotics.

В связи с ухудшением экологической обстановки и расширяющимся использованием различных химических веществ проблема своевременного обнаружения ксенобиотиков в окружающей среде и продуктах питания в настоящее время становится одной из наиболее актуальных. Попадая внутрь живых организмов, ксенобиотики нередко оказывают общетоксичное, мутагенное или канцерогенное действие, представляя опасность как для самого биообъекта, так и его потомства.

Для тестирования состояния окружающей среды необходимы дешевые, надежные и чувствительные методы контроля за содержанием опасных веществ в различных средах. Наиболее перспективным для этих целей может быть использование методов биотестирования. Для разработки биотестов необходимо выбрать чувствительный, легкодоступный биообъект и подобрать удобный и информативный метод биотестирования. Среди биологических объектов для этих целей предложено использовать живые организмы различных уровней сложности: животные, рыбы, растения, дафнии, простейшие, микроскопические водоросли, дрожжи, светящиеся бактерии, ферментные системы организмов, белки [1]. Наибольшее внимание привлекают биологические методы тестирования на основе использования микроорганизмов благодаря простоте получения биообъектов, экономичности и оперативности анализа.

Протопласты клеток микроорганизмов – новый биообъект, который пока не используется для задач аналитического контроля, а применяется в основном в генетических исследованиях и клеточной инженерии, вместе с тем протопласты обладают рядом ценных свойств, которые могут быть использованы для биотестирования вредных факторов среды [2].

Наряду с выбором биообъектов одной из проблем биотестирования является также поиск маркерных функций и экспресс-методов регистрации влияния на них ксенобиотиков. Биокалориметрия, как биофизический метод анализа, изучает энергетические процессы, протекающие в живых организмах. Тепловыделение биообъектов характеризует интегральную функцию жизнедеятельности клеток, отражает изменение их ростовой активности, сдвиги в метаболизме и характеризует как энергетику метаболических процессов, так и их кинетику.

Целью данной работы было выяснение возможности использования протопластов клеток для задачи биотестирования ксенобиотиков в окружающей среде.

В качестве ксенобиотика служил водный раствор фенола в диапазоне концентраций 10^{-6} – 10^{-1} М. В работе использовали штаммы бактерий *Bacillus subtilis* IP 5832, *Lactococcus lactis* ssp *lactis* L 57/2 из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Культуры клеток выращивали на жидкой полноценной пептонно-дрожжевой среде (Tetr). Средой для получения и культивирования протопластов являлась среда Tetr с добавлением осмотического стабилизатора (10 М сахара) и гипертоническая среда (ГС). Протопласты получали из клеток микроорганизмов, находящихся в логарифмической стадии роста. Клеточную стенку микроорганизмов разрушали лизоцимом [3] путем добавления к осадку клеток 1–2 мг/мл фермента и выдерживания в течение 60 мин при 30°C. Удаление лизоцима проводили разведением суспензии в ГС в соотношении 1:10 и 15-минутным центрифугированием при 3000 мин^{-1} .

Оценку эффективности образования протопластов осуществляли путем посева в плотную среду Tetr 0,1 мл разведений клеток в физиологическом растворе без осмотического стабилизатора и подсчета общего количества клеток до и после обработки лизоцимом по формуле

$$\Xi_1 = [(N_0 - N_1)/N_0] \cdot 100 (\%), \quad (1)$$

где N_0 – концентрация клеток и протопластов после действия лизоцима; N_1 – число клеток, не измененных лизоцимом.

Выход протопластов оценивали также микрокалориметрическим методом по формуле

$$\Xi_2 = [(q_0 - q_1)/q_0] \cdot 100 (\%), \quad (2)$$

где q_0 , q_1 – тепловая мощность суспензии до и после разрушения протопластов.

Осмотический лизис протопластов изучали на бактериях *Lactococcus lactis*. Осадок протопластов разводили дистиллированной водой до концентрации 10^6 – 10^7 ед/мл, помещали в микрокалориметр и регистрировали кинетику изменения их теплопродукции при 30°C .

Биокалориметрические измерения выполняли на микрокалориметре МКМ-Ц. Подготовку прибора и образцов к измерениям осуществляли в соответствии с [4]. Показания микрокалориметра регистрировали после его выхода в стационарный режим измерений.

Статистическую обработку результатов измерений проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

В таблице приведены результаты оценки эффективности получения протопластов бактерий *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis* методами посева в агаризованную среду и биокалориметрии.

Таблица

Параметры протопластирования бактерий *Bacillus subtilis* и *Lactococcus lactis*

Микроорганизмы	Показатели протопластирования					
	Концентрация клеток, кл/мл			Тепловыделение, мкВт/мл		
	N_0	N	$\Xi_1, \%$	q_0	q	$\Xi_2, \%$
<i>Bacillus subtilis</i> IP 5832	$5 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^6$	98,8	4370	126	97,1
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> L 57/2	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^6$	98,0	3542	85	97,6

Выход протопластов приближался к 100%, однако часть клеток оказывалась устойчивой к действию лизоцима и не подвергалась протопластированию. Для их учета высевали разведения протопластов в воде на твердую среду без осмотического стабилизатора. В этом случае колонии образуют устойчивые к лизоциму клетки микроорганизмов.

Другой подход был основан на определении теплопродукции протопластов до и после осмотического лизиса. На рис. 1 представлены результаты анализа осмотической устойчивости протопластов *Lactococcus lactis* в водной среде. Уменьшение теплопродукции протопластов в процессе осмотического лизиса свидетельствует об их гибели. Весь процесс разрушения протопластов длится около 2 ч, но может быть ускорен за счет повышения температуры.

Кинетика разрушения протопластов *Lactococcus lactis* носит нелинейный характер и указывает на присутствие по крайней мере двух форм с различной осмоустойчивостью. Остаточное тепловыделение суспензии после термообработки составляло 3% от первоначальной величины и связано с теплопродукцией клеток, устойчивых к лизоциму.

Оценка эффективности протопластирования двумя способами показала (таблица), что они дают близкие результаты. Поскольку длительность микрокалориметрических из-

мерений составляет 20 мин, метод можно использовать для быстрого определения жизнеспособности протопластов и оптимизации условий их получения.

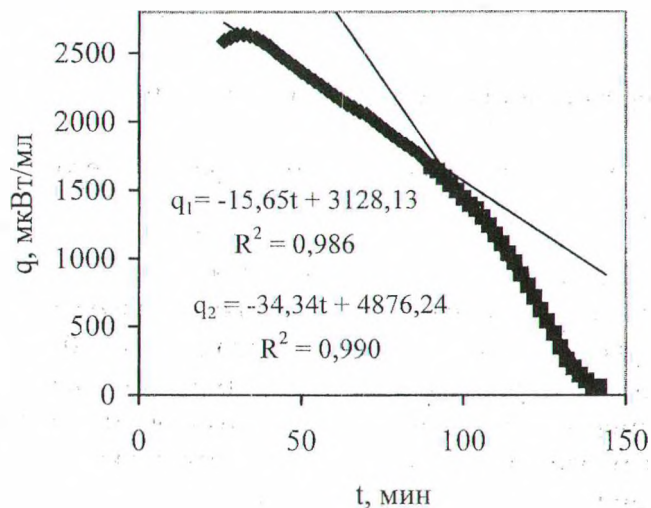


Рис. 1. Кинетика изменения теплопродукции протопластов *Lactococcus lactis* sv дистиллированной воде. $T=30^{\circ}\text{C}$

Оценку влияния ксенобиотиков на клетки и протопласты микроорганизмов проводили на примере действия фенола, который является, с одной стороны, одним из широко распространенных загрязнителей окружающей среды, а с другой стороны, наиболее часто используется при проведении модельных исследований.

На рис. 2 представлена кинетика тепловыделения протопластов и клеток *Bacillus subtilis*, взятых в одинаковых количествах, в присутствии и отсутствие фенола. Количество выделяемого протопластами тепла в отсутствие фенола значительно выше, чем для исходных клеток. Это указывает на то, что протопласты находятся в стрессовом состоянии после их получения. В присутствии фенола тепловыделение протопластов снижалось значительно сильнее по сравнению с исходными клетками, что свидетельствует о том, что протопласты проявляют большую чувствительность к ксенобиотику.

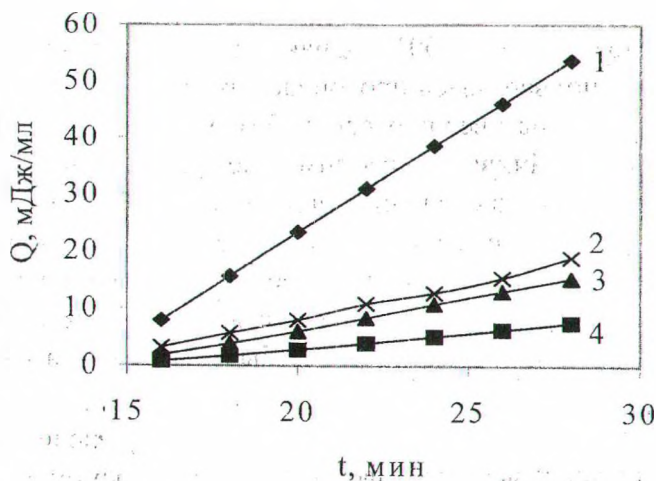


Рис. 2. Кинетика выделения тепла протопластами (1, 2) и клетками (3, 4) *Bacillus subtilis* (10^7 ед/мл) в присутствии 0,6% фенола. Среда Tetg с осмостабилизатором. $T=30^{\circ}\text{C}$. 1, 3 – контрольные образцы; 2, 4 – образцы с фенолом

На рис. 3 приведены графики изменения скорости тепловыделения (V_q) протопластов и клеток *Bacillus subtilis* от логарифма концентрации фенола. Как видно из рис. 3, наблюдаемые зависимости носят нелинейный характер.

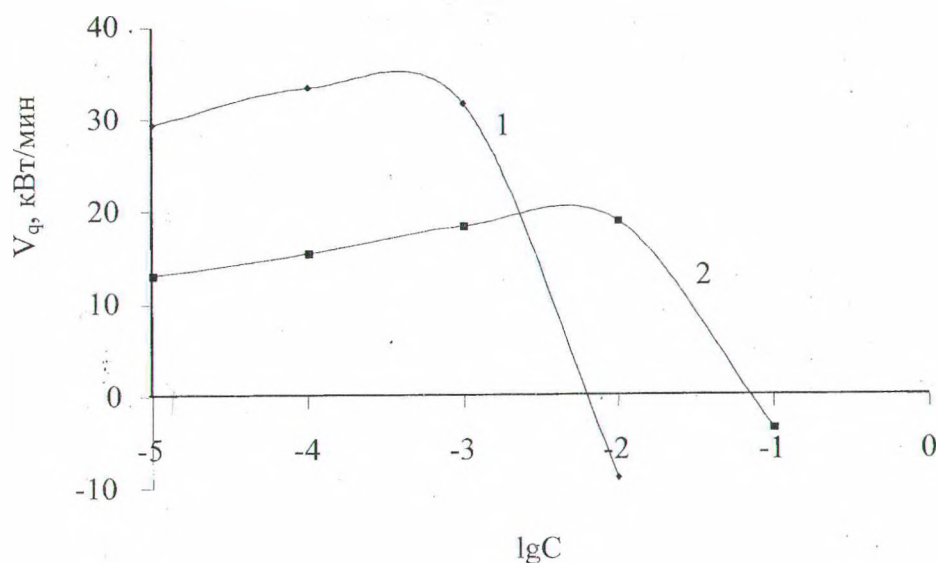


Рис. 3. Изменение скорости теплопродукции протопластов (1) и клеток (2) *Bacillus subtilis* (10^7 ед/мл) от логарифма концентрации фенола. Tetr-среда. $T=30^\circ\text{C}$

При низких концентрациях фенола отмечается активация тепловыделения протопластов и клеток. Это, видимо, связано с тем, что фенол может использоваться данными микроорганизмами для ростовых процессов в качестве субстрата. Большие концентрации фенола оказывают ингибирующее и токсичное действие на протопласты и клетки *Bacillus subtilis*. Как следует из рис. 3, чувствительность протопластов к токсичному действию фенола на порядок выше, чем у исходных клеток.

Таким образом, протопласты микроорганизмов проявляют более высокую чувствительность к ксенобиотикам по сравнению с исходными клетками и могут быть, в принципе, использованы в качестве тест-объекта для обнаружения присутствия токсичных и ингибирующих веществ. Скорость метаболических процессов и скорость репродукции клеток — два чувствительных к присутствию ксенобиотиков показателя, связанных с биоэнергетикой клеток, которые быстро регистрируются методом биокалориметрии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кудрин А.Н. и др. Система экспресс-методов интегральной оценки биологической активности индивидуальных веществ и комплексных препаратов на биологических объектах // Российский химический журнал. — 1997. — Т. XXI. — № 5. — С. 114.
2. Яковенко К.Н., Троицкий Н.А. Протопласты микроорганизмов. — Мн.: Наука и техника, 1985. — 160 с.
3. Белясова Н.А., Чаевская Т.В., Гриц Н.В. Оптимизация условий получения и регенерации протопластов молочнокислых стрептококков // Труды БГТУ: Сер. IV. Химия и химическая технология. — Мн., 1997. Вып. 5. — С. 102.
4. Игнатенко А.В., Гриц Н.В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия: Лабораторный практикум. — Мн.: БГТУ, 2003. — 114 с.