

УДК 577.151+577.152.18

**Д. А. Бутарева, Ю. С. Дивина, А. В. Игнатенко**  
Белорусский государственный технологический университет

### **ВОССТАНОВЛЕНИЕ МЕТИЛЕНОВОГО СИНЕГО ПРОТОПЛАСТАМИ И КЛЕТКАМИ БАКТЕРИЙ**

В работе изучена редуктазная активность Gr<sup>+</sup> бактерий *B. subtilis.*, *Clostridium spp.* и их протопластов оптико-редуктазным методом. В качестве редокс красителя использован метиленовый синий (МС). Протопласты бактерий получали с помощью лизоцима в гипертонической среде.

Изучение кинетики обесцвечивания МС клетками бактерий показало, что она носит двухстадийный характер и включает стадии быстрого и медленного восстановления красителя. Обсуждены возможные механизмы данных процессов, связанные с объемным и поверхностным восстановлением МС снаружи и внутри клеток.

При анализе редуктазной активности протопластов бактерий установлено, что восстановление МС в отличие от клеток включало начальную стадию задержки обесцвечивания красителя. Наблюдаемые изменения объяснены взаимодействием окисленной формы МС(+) с (–) заряженными группами липотейхоевых кислот.

Сделан вывод о возможности применения оптико-редуктазного метода с МС для определения жизнеспособности, биологической активности протопластов и клеток бактерий, определения величины (–) заряда на поверхности протопластов. Отмечено также, что наличие латентной фазы обесцвечивания МС протопластами в отличие от клеток бактерий затрудняет использование данного красителя для быстрого обнаружения токсичных веществ оптико-редуктазным методом.

**Ключевые слова:** Gr<sup>+</sup> бактерии, протопласты, редуктазная активность, оптико-редуктазный метод, метиленовый синий краситель, кинетика восстановления.

**D. A. Butareva, Yu. S. Divina, A. V. Ignatenko**  
Belarusian State Technological University

### **REDUCTION OF METHYLENE BLUE BY PROTOPLASTS AND BACTERIAL CELLS**

It was studied a reductase activity of Gr<sup>+</sup> bacteria *B. subtilis.*, *Clostridium spp.* by optical reductase method with methylene blue (MB). Protoplasts were received with the aid of lyzosome enzyme in hypertonic media.

It was shown that kinetics of MB discolouring included stages of its fast and slow reduction. It was discussed possible mechanisms of such processes, connected with reduction of dye in volume outside and inside of cells and at membrane surface.

Under study of reductase activity of bacterial protoplasts it was founded that reduction of MB in the difference with cells included a lag stage of MB discolouring. Attached changes were explained by interaction of charged oxidized form MB<sup>+</sup> with (–) charged groups of lipoteichoic acids.

It was concluded about the opportunity of application of optical reductase method for the determination of lifeability, biological activity of protoplasts and bacterial cells, detection of (–) charge and its value at protoplast's surface. It was also pointed that presence of lag phase of MB discolouring makes it difficult to use protoplasts for fast determination of dangerous substances by optical reductase method in comparison with cells.

**Key words:** Gr<sup>+</sup> bacteria, protoplasts, reductase activity, optical reductase method, methylene blue dye, kinetics of reduction.

**Введение.** Биоаналитический контроль загрязнения окружающей среды является простым и эффективным способом оценки ее безопасности для живых организмов.

Бактерии служат удобными тест-объектами, позволяющими быстро анализировать токсичность сред ввиду высокой скорости их размножения и смены поколений. Вместе с тем бактерии способны защищаться от действия токсичных веществ. Одним из способов защиты слу-

жат защитные оболочки – капсула, клеточная стенка, не пропускающие высокомолекулярные опасные вещества к поверхности клеток.

Удаление клеточной стенки у Gr<sup>+</sup> бактерий приводит к формированию протопластов и повышает их чувствительность к токсичным веществам [1].

Энергетический метаболизм бактерий наиболее подвержен действию ксенобиотиков, поскольку расположен на мембране клеток.

Среди доступных и эффективных способов характеристики биоэнергетических свойств клеток можно выделить редуктазный метод, основанный на анализе окислительно-восстановительных процессов с помощью редокс-красителей. Одним из них является метиленовый синий (МС), спектральные и электрохимические свойства которого хорошо изучены. Переход окрашенной формы МС в бесцветную восстановленную форму легко обнаруживается визуально (редуктазная проба) или оптико-редуктазным методом по уменьшению оптической плотности раствора МС при 660 нм [2, 3].

Поскольку оптико-редуктазный метод еще не использовался широко для анализа активности протопластов, представляло интерес сравнить восстановление редокс красителя МС протопластами и клетками Гр+ бактерий.

**Основная часть.** Целью данной работы был сравнительный анализ кинетики восстановления МС клетками и протопластами бактерий.

В работе использовали клетки Гр+ бактерий из коллекции кафедры биотехнологии БГТУ. Чистые культуры бактерий *B. subtilis* 162, *Clostridium spp.* выращивали в 2%-м питательном агаре (ПА) при 30°C в аэробных и анаэробных условиях в течение суток. Клетки переносили в свежий питательный бульон на 2 ч, а затем осаждали, отмывали центрифугированием при 6000 об/мин, 10 мин и оставляли в гипертонической среде (ГС).

Содержание микроорганизмов в среде определяли методом светорассеивания при 600 нм, предварительно построив калибровочные зависимости.

Измерение рН и величины потенциалов Eh растворов и суспензий клеток проводили на универсальном иономере ЭВ-74 с помощью электродов ЭСЛ-63-07, ЭВЛ-1М3.1, ЭПВ-1. Величину рН среды поддерживали равной 6,5 с помощью 0,1 н HCl и 0,1 н NaOH.

Протопласты бактерий получали ферментативным методом с использованием лизоцима ( $C = 1,0$  мг/мл) в ГС [4]. За процессами протопластирования наблюдали по изменению светорассеивания клеток методом спектротурбидиметрии при 600 нм. Измерение оптической плотности образцов проводили с помощью Спекорд М-40 (Германия). В качестве редокс-красителя использовали метиленовый синий (Реахим, РБ) в концентрации 0,001%.

Для определения доли окисленной формы МС ( $y$ ) оптико-редуктазным методом кюветы закрывали пробками и регистрировали кинетику изменения оптической плотности красителя при 20°C:

$$y = (D_t / D_0), \quad (1)$$

где  $D_0$ ,  $D_t$  – оптическая плотность окисленной формы МС в начальный и текущий момент времени в максимуме полосы поглощения красителя при 660 нм.

Редуктазную активность протопластов и клеток определяли по изменению величины скорости обесцвечивания красителя:

$$V = dy / dt. \quad (2)$$

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

На рис. 1 приведена кинетика обесцвечивания МС изученными Гр+ бактериями.

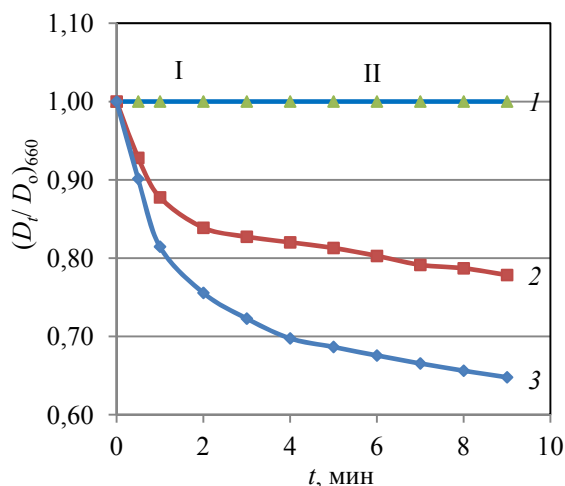


Рис. 1. Кинетика обесцвечивания МС клетками Гр+ бактерий:

1 – МС; 2 – *B. subtilis*; 3 – *Clostridium spp.*

В отсутствие клеток внесение МС в среду не приводило к изменению показателя  $(D_t / D_0)_{660}$  (рис. 1, 1).

В соответствии с уравнением Нернста при  $Eh = 0,200$  В около 95% красителя МС находится в окисленной, заряженной форме МС<sup>+</sup>.

Как известно, МС<sup>+</sup> не проникает в живые клетки, но окрашивает неживые микроорганизмы, что используется для оценки жизнеспособности клеток витальными красителями [5].

В присутствии микроорганизмов, обладающих редуктазной активностью, МС<sup>+</sup> может восстанавливаться в бесцветную лейкоформу:



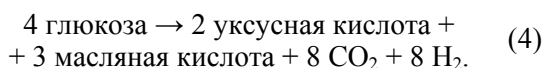
При условии постоянства концентрации бактерий, наблюдаемое обесцвечивание МС характеризует редуктазную активность клеток.

На кинетической зависимости восстановления МС<sup>+</sup> клетками Гр+ бактерий (рис. 1, 2, 3) можно выделить две стадии: I – быструю, II – медленную.

Быстрое обесцвечивание МС<sup>+</sup> клетками (стадия I, рис. 1) возможно за счет объемных

процессов потребления растворенного  $O_2$  в процессе дыхания клеток или при выделении  $H_2$  и других продуктов анаэробного метаболизма, а также путем восстановления красителя на поверхности мембраны клеток за счет работы ее электрон-транспортной цепи (ЕТЦ) [6].

Клостридии являются строгими анаэробами, поэтому не используют окислительное фосфорилирование для получения энергии. Вместе с тем они могут метаболизировать при пониженном парциальном давлении  $O_2$ , получая энергию, например, путем маслянокислого брожения [7]:



Освобождающийся  $H_2$  может присоединяться к молекулярным продуктам распада, либо выделяться наружу в газообразном состоянии, изменяя  $Eh$  среды и быстро обесцвечивая МС+ снаружи клеток.

Известно также, что восстановленная форма МСН не заряжена и способна проникать в клетки путем диффузии [8]. В этой связи медленная стадия II (рис. 1) может отражать суммарные процессы проникновения МСН внутрь клеток и его участия во внутриклеточных окислительно-восстановительных реакциях.

В случае клеток *B. subtilis*, относящихся к факультативным анаэробам и имеющим ЕТЦ, медленное восстановление МС+ может быть связано со снижением активности ЕТЦ в результате удаления растворенного  $O_2$  и переключения с аэробного на анаэробное дыхание.

На следующем этапе работы были получены протопласты Гр+ бактерий и изучена их редуцтазная активность.

На рис. 2 приведены результаты анализа светорассеивания при протопластировании *Clostridium spp.* методом спектроурбидиметрии в ГС.

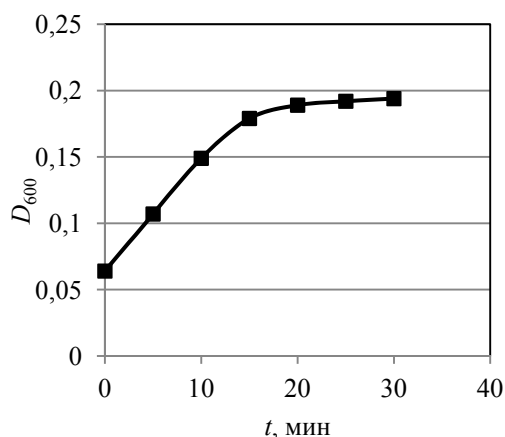


Рис. 2. Кинетика изменения оптической плотности при протопластировании Гр+ бактерий *Clostridium spp.* в ГС

Как видно из рис. 2, при протопластировании бактерий их светорассеивание возрастает в результате увеличения размеров протопластов под действием сил внутриосмотического давления, сдерживаемого клеточной стенкой.

Выход протопластов, определенный методом высева клеток на питательный агар, составил 95%.

Полученные протопласты были использованы для анализа их редуцтазной активности опτικο-редуцтазным методом.

На кинетической зависимости восстановления МС+ протопластами клостридий можно также выделить две стадии (рис. 3): I – медленного и II – быстрого обесцвечивания красителя.

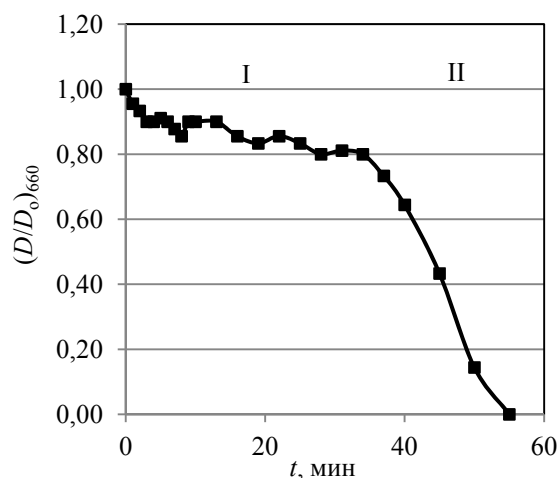


Рис. 3. Кинетика обесцвечивания МС+ протопластами *Clostridium spp.* в ГС

Наблюдаемые изменения кинетики восстановления МС+ протопластами могут быть связаны с особенностями химического строения и состава клеточных стенок Гр+ бактерий (рис. 4).

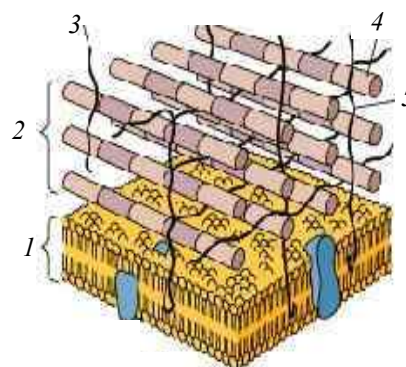


Рис. 4. Строение клеточной стенки Гр+ бактерий:  
1 – бактоплазматическая мембрана;  
2 – клеточная стенка; 3 – тейхоевые кислоты;  
4 – муреин; 5 – липотейхоевые кислоты

Из литературы известно, что поверхность протопластов Гр+ бактерий заряжена отрица-

тельно [4]. Это связано с тейхоевыми и липо-тейхоевыми кислотами, которые являются полианионами, несущими фосфатные группы.

Присутствие фазы задержки обесцвечивания МС<sup>+</sup> бактериальными протопластами (рис. 3, стадия I) может быть связано с электростатическим взаимодействием (–) заряженных групп на их поверхности с МС<sup>+</sup>.

Для клеток бактерий данная стадия не наблюдается (рис. 1), что указывает на то, что в их клеточных стенках заряженные группы нейтрализованы. Это позволяет использовать данное свойство для определения величины (–) заряда протопластов оптико-редуктазным методом.

Наблюдаемое медленное восстановление МС<sup>+</sup> на стадии I (рис. 3) может быть связано с уменьшением концентрации свободного красителя, способного восстанавливаться.

Стадия быстрого обесцвечивания МС<sup>+</sup> протопластами (рис. 3, стадия II) может быть обусловлена высвобождением красителя из связанного состояния под действием выбрасываемых из клеток продуктов метаболизма, либо удалением растворенного O<sub>2</sub> и увеличением выброса H<sub>2</sub>.

В таблице приведены константы скорости восстановления МС<sup>+</sup> для изученных протопластов и клеток Гр<sup>+</sup> бактерий.

#### Показатели скорости обесцвечивания МС<sup>+</sup> протопластами и клетками Гр<sup>+</sup> бактерий

Гр <sup>+</sup> бактерии	Стадии	Скорость восстановления МС <sup>+</sup> , мин <sup>-1</sup>	
		клетки	протопласты
<i>B. subtilis</i> 162	I	0,08	0,003
	II	0,01	0,05
<i>Clostridium spp.</i>	I	0,12	0,005
	II	0,03	0,06

Как следует из таблицы, клетки обладали в 20–30 раз более высокой начальной скоростью восстановления МС, чем протопласты, но в 2–

3 раза меньшей редуктазной активностью на стадии II. Это связано как с электростатическим взаимодействием МС<sup>+</sup> и (–) заряженных групп поверхности протопластов, так и увеличением их метаболической активности в результате перехода протопластов в стрессовое состояние после удаления клеточной стенки.

**Заключение.** Сравнительный анализ редуктазной активности Гр<sup>+</sup> бактерий и их протопластов оптико-редуктазным методом показал сложный характер восстановления редокс-красителя МС<sup>+</sup>, связанный как с его способностью проникать внутрь клеток, так и участвовать в процессах объемного и поверхностного восстановления. Это дает полезную информацию для изучения механизмов работы биоэнергетической системы протопластов и клеток Гр<sup>+</sup> бактерий.

Изучение кинетики обесцвечивания МС<sup>+</sup> позволило установить присутствие быстрой и медленной стадий его восстановления. Наличие быстрой стадии обесцвечивания красителя клетками и протопластами указывает на участие ЕТЦ плазматической мембраны бактерий, а также продуктов их метаболизма.

Оптико-редуктазный метод с МС позволяет характеризовать скорость роста и гибели микроорганизмов, оценивать жизнеспособность протопластов и клеток бактерий, изучать механизмы процессов дыхания, брожения, определять величину (–) заряда протопластов.

Вместе с тем, наличие медленной начальной стадии на кинетической кривой обесцвечивания красителя МС<sup>+</sup> протопластами бактерий удлинняет процесс наблюдения за их редуктазной активностью по сравнению с клетками и затрудняет их использование для экспресс-контроля присутствия токсичных веществ.

Это вызывает необходимость подбора других редокс-красителей, позволяющих быстро определять редуктазную активность протопластов бактерий оптико-редуктазным методом.

#### Литература

- Игнатенко А. В. Биокалориметрический анализ безопасности водных сред с помощью протопластов бактерий // Биотехнология: взгляд в будущее: материалы III международной научно-практической конференции, г. Ставрополь, 28 апр. 2017. Ставрополь, 2017. С. 267–271.
- Игнатенко А. В. Биотестирование токсичности водных сред методом редуктазной пробы // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2018. № 2. С. 155–160.
- Nandy S. K., Venkatesh K. V. Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms // African j. of Microbiol. Research. 2010. Vol. 4, no 1. pp. 61–70.
- Яковенко К. Н., Троицкий Н. А. Протопласты микроорганизмов. Минск: Наука и техника, 1985. 160 с.
- Луста К. А., Фихте Б. А. Методы определения общей жизнеспособности микроорганизмов. Пушкино: ОНТИ НЦБИ. 1990. 186 с.
- Richardson D. J. Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment // Microbiology. 2000. Vol. 146. P. 551–571.

7. Жизнь растений. В 6 т. Т. 1. Введение. Бактерии и актиномицеты / под ред. Н. А. Красильникова, А. А. Уранова. М.: Просвещение. 1974. 487 с.
8. May J. M, Qu Z., Whitesell R. R. Generation stress in cultured endothelial cells by methylene blue: effects of glucose and ascorbic acid // *Biochem. Pharmacol.* 2003. Vol . 66, no. 5. P. 777–784.

### References

1. Ignatenko A. V. [Biocalorimetric analyses of water safety with the aid of bacteria protoplasts]. *Materialy III mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Biotekhnologiya: vzglyad v budushcheye"* [Materials of the III international scientific and practical conference "Biotechnology: insight in future"]. Stavropol, 2017, pp. 267–271 (In Russian).
2. Ignatenko A. V. Biotesting of water media toxicity by method of reductase probe. *Trudy BGTU* [Proceedings of BSTU], series II, Chemical Technologies, Biotechnology, Geoecology, 2018, no. 2, pp. 155–160 (In Russian).
3. Nandy S. K., Venkatesh K. V. Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms. *African j. of Microbiol. Research*, 2010, vol. 4, no. 1, pp. 61–70.
4. Yakovenko K. N., Troitskiy N. A. *Protoplasty mikroorganizmov* [Protoplasts of microorganisms]. Minsk, Nauka i Tekhnika Publ., 1985. 160 p.
5. Lusta K. A., Fichte B. A. *Metody opredeleniya obshchey zhiznesposobnosti mikroorganizmov* [Methods of determination a total lifeability of microorganisms]. Pushino, ONTI NCLI Publ., 1990. 186 p.
6. Richardson D. J. Bacterial respiration: A flexible process for a changing environment. *Microbiology*, 2000, vol. 146, pp. 551–571.
7. *Zhizn' rasteniy. V 6 t. T. 1. Vvedeniye. Bakterii i aktinomitsety* [Life of Plants. In 6th volumes. Vol. 1. Introduction. Bacteria and Actinomycetese]. Ed. by N. A. Krasilnikov, A. A. Uranov. Moscow, Prosveshenie Publ., 1974. 487 p.
8. May J. M, Qu Z., Whitesell R. R. Generation stress in cultured endothelial cells by methylene blue: effects of glucose and ascorbic acid. *Biochem. Pharmacol.* 2003, vol. 66, no. 5, pp. 777–784.

### Информация об авторах

**Бутарева Дарья Александровна** – магистрант кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь).

**Дивина Юлия Сергеевна** – студентка. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь).

**Игнатенко Аркадий Васильевич** – кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры биотехнологии. Белорусский государственный технологический университет (220006, г. Минск, ул. Свердлова, 13а, Республика Беларусь). E-mail: ignatenko\_av@tut.by

### Information about the authors

**Butareva Dar'ya Aleksandrovna** – undergraduate student, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus).

**Divina Yulia Sergeevna** – student. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus).

**Ignatenko Arkadiy Vasil'yevich** – PhD (Biology), Associate Professor, Assistant Professor, the Department of Biotechnology. Belarusian State Technological University (13a, Sverdlova str., 220006, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: ignatenko\_av@tut.by

Поступила 05.04.2019