

## **АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ ПРОТОПЛАСТОВ БАКТЕРИЙ В ИММОБИЛИЗОВАННОМ СОСТОЯНИИ**

Клеточная биоаналитика – одно из перспективных направлений развития современной биотехнологии. Она находит практическое применение для характеристики биотехнологических процессов производства в пищевой и перерабатывающей промышленности, а также используется для анализа биологически активных веществ в фармацевтике, оценки состояния человека и животных в медицине, применяется в экологии для контроля безопасности окружающей среды [1, 2].

В экологической биотехнологии широкое распространение получили методы биотестирования с использованием бактерий в виду их всеядности, способности обнаруживать любое природное вещество, высокой скорости метаболизма и размножения, а также низкой стоимости анализа.

Наряду с клетками в биоаналитике могут быть использованы также клеточные формы бактерий: прото-, сферопласты, обладающие повышенной чувствительностью к опасным веществам [3].

Бактерии, как и другие организмы с клеточной стенкой, не имеют системы осмотической регуляции, поэтому поддерживают свою осмотическую устойчивость путем образования клеточной стенки. Она обеспечивает не только механическую прочность, но и является одним из барьеров, задерживающих проникновение в клетку веществ с молекулярной массой, превышающей 1500 Да. Разрушение клеточной стенки, расширяет перечень химических веществ, способных проникать к поверхности клеток и воздействовать на них.

К недостаткам использования протопластов при биотестировании относится необходимость применения гипертонических сред (ГС) для поддержания их жизнеспособности, что создает определенные неудобства в их применении. Одним из путей устранения данного недостатка может быть использование протопластов в иммобилизованном состоянии.

Среди известных способов иммобилизации клеток широкое распространение получили методы включения микроорганизмов в полимерные и биополимерные носители [4]. Для протопластов вопросы их устойчивости и активности в связанном состоянии остаются слабоизученными.

Цель работы – анализ активности протопластов бактерий в свободном и иммобилизованном состояниях.

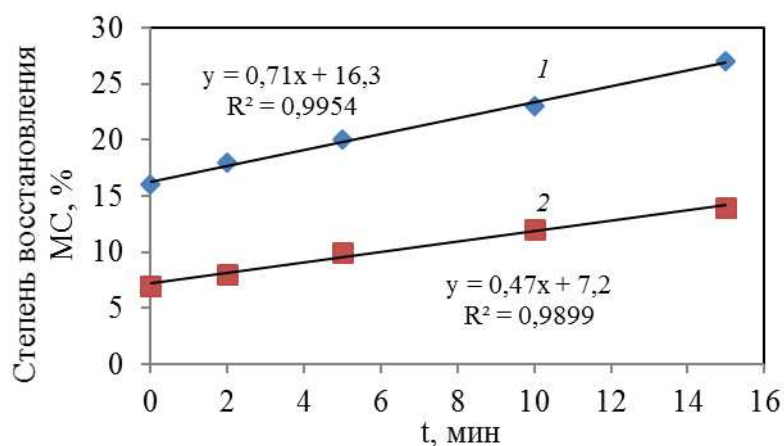
Объектом исследования служили клетки Гр+ бактерий *B. subtilis* 162 из коллекции кафедры биотехнологии БГТУ и полученные из них протопласты. Для получения протопластов бактерий в свободном состоянии использовали ферментативный метод с лизоцимом [5]. В качестве ГС служила среда ММ9, рН 6,5 с добавкой 20% раствора сахарозы. Выход протопластов, найденный методом посева и культивирования клеток до и после протопластирования, составил 95%.

Для получения протопластов в иммобилизованном состоянии использовали питательный агар (ПА). Суточную культуру клеток *B. subtilis*, содержащую  $10^7$  кл/мл, помещали в ПА при 50°C. После остывания агара в среду вносили лизоцим С = 1 мг/мл и регистрировали процесс протопластирования клеток в агаре методом биокалориметрии.

Об активности протопластов в свободном и иммобилизованном состояниях судили по мощности их тепловыделения, а также времени обесцвечивания редокс-красителя метиленового синего (МС).

Измерение оптической плотности образцов проводили с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Германия). Тепловыделение проб регистрировали на микрокалориметре МКМ-Ц (Казахстан). Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

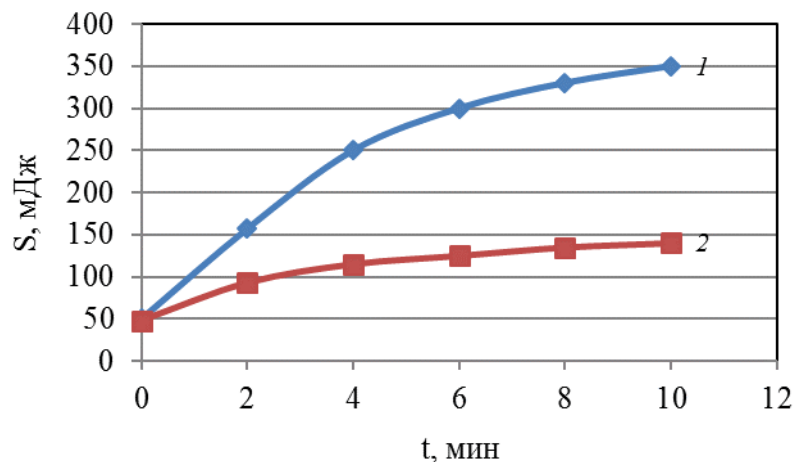
На рисунке 1 приведены результаты сравнительного анализа восстановления МС протопластами бактерий *Bacillus subtilis* в свободном и иммобилизованном состояниях.



**Рисунок 1 – Изменение степени восстановления метиленового синего протопластами *Bacillus subtilis*: 1 – протопласты в ГС; 2 - протопласты в ПА**

Как видно из рисунка 1, активность протопластов в иммобилизованном состоянии уменьшалась по сравнению с ГС в 1,5 раза. Это может указывать на снижение их стрессового состояния по сравнению с ГС.

На рисунке 2 приведены результаты анализа тепловыделения протопластов бактерий в свободном и связанном состояниях.



**Рисунок 2 – Кинетика тепловыделения клеток и протопластов бактерий *B. subtilis*: 1 – протопласты в ГС, 2 – протопласты в ПА**

Как следует из рисунка 2, мощность тепловыделения протопластов при включении их в ПА уменьшается в 2,5 раза по сравнению со свободными протопластами в ГС.

Таким образом, проведенный анализ активности протопластов в иммобилизованном состоянии показал, что их редуктазная и теплопродуцирующая активность падает в 1,5–2,5 раза по сравнению с протопластами в ГС. Это может быть связано со снижением их стрессового состояния при иммобилизации. Оба метода позволяют охарактеризовать биоэнергетическую активность протопластов в иммобилизованном состоянии с разных сторон.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Юркова И.Л. Биоаналитика. – Минск: БГУ, 2017. – 359 с.
2. Биологический контроль окружающей среды. Биоиндикация и биотестирование / под ред. О. П. Мелеховой и Е. И. Сарапульцевой. – 3-е изд. – М.: Академия, 2010. – 288 с.
3. Игнатенко А.В., Бутарева Д.А. Флуоресцентно-редуктазный метод анализа активности протопластов и клеток бактерий // V международная научно-практическая конференция «Биотехнология: взгляд в будущее». – Ставрополь: Изд-во: СтГМУ, 2019. – С. 189–191.
4. Синецын А.П. Иммобилизованные клетки микроорганизмов / Синецын А. П., Райнина Е. И., Лозинский В. И., Спасов С. Д. – М.: Изд-во МГУ, 1994. – 288 с.
5. Яковенко К.Н., Троицкий Н.А. Протопласты микроорганизмов. – Минск: Наука и техника, 1985. – 160 с.