

УДК 612.51:631.461:576.8

А. В. Игнатенко

Белорусский государственный технологический университет

**АНАЛИЗ ОСМОУСТОЙЧИВОСТИ ПРОТОПЛАСТОВ БАКТЕРИЙ
В СВОБОДНОМ И ИММОБИЛИЗОВАННОМ СОСТОЯНИЯХ**

В работе рассмотрена устойчивость протопластов к осмоллизу в свободном и иммобилизованном в агаре состоянии методами светорассеивания, биокалориметрии и биолюминесценции с целью определения возможности применения протопластов для биосенсорного анализа водных сред. Изучение светорассеивания протопластов бактерий *B. subtilis* в физиологическом растворе (ФР) и присутствии различных концентраций сахарозы в диапазоне 0–30% показало, что оно связано как с увеличением размеров протопластов, так и с уменьшением их концентрации. Отмечены три стадии изменения светорассеивания при протопластировании бактерий *B. subtilis* и обсуждены их возможные причины. Анализ осмоустойчивости протопластов в иммобилизованном состоянии методом биокалориметрии показал 2-стадийный характер изменения их тепловыделения при помещении в ФР. Это объяснено с позиции теории стресса Селье как стрессовое и дистрессовое состояния протопластов. Анализ осмоллиза протопластов методами биокалориметрии и биолюминесценции дал сходные результаты. Иммобилизация протопластов в агаре показала, что их осмоустойчивость возрастала, однако 0,7%-ный агар не обеспечивал их достаточную осмоустойчивость и только 2%-ный агар позволял заменить гипертоническую среду на гелевое окружение, что дало возможность использовать протопласты в составе биосенсорных устройств.

Ключевые слова: бактерии, протопласты, иммобилизация, агар, осмоустойчивость, светорассеивание, биокалориметрия, биолюминесценция, биосенсорный анализ.

Для цитирования: Игнатенко А. В. Анализ осмоустойчивости протопластов бактерий в свободном и иммобилизованном состояниях // Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. 2022. № 1 (253). С. 58–65.

A. V. Ignatenko

Belarusian State Technological University

**ANALYSIS OF OSMOTIC STABILITY OF BACTERIAL PROTOPLASTS
IN FREE AND IMMOBILIZED STATES**

The paper considers the resistance of protoplasts to osmolysis in a free and immobilized agar state by light scattering, biocalorimetry and bioluminescence methods in order to determine the possibility of using protoplasts for biosensory analysis of aqueous media. The study of changes in the light scattering of protoplasts of *B. subtilis* bacteria in physiological medium and from the sucrose concentration in the range of 0–30% showed that it is associated with both an increase in the size of protoplasts and a decrease in their concentration. Three stages of light scattering changes during protoplasts formation of *B. subtilis* bacteria were noted and discussed. The analysis of the osmotic stability of protoplasts in the immobilized state, carried out by the method of biocalorimetry, showed a 2-stage character of the change in their heat release when placed in physiological medium. This is explained from the standpoint of Selye's stress theory as the stress and distress states of protoplasts. The analysis of osmolysis of protoplasts by biocalorimetry and bioluminescence showed similar results. Immobilization of protoplasts in agar showed that their osmotic stability increases, however, 0.7% agar did not provide sufficient osmotic stability and only 2% agar allows replacing the hypertonic medium with a gel environment, which allows the use of protoplasts as part of biosensor devices.

Key words: bacteria, protoplasts, immobilization, agar, osmotic resistance, light scattering, biocalorimetry, bioluminescence, biosensor analysis.

For citation: Ignatenko A. V. Analysis of osmotic stability of bacterial protoplasts in free and immobilized states. *Proceedings of BSTU, issue 2, Chemical Engineering, Biotechnologies, Geoecology*, 2022, no. 1 (253), pp. 58–65 (In Russian).

Введение. Биоаналитика – одно из перспективных направлений развития современной биотехнологии, основанное на использовании аналитических возможностей живых организмов и

их компонент [1]. Она находит практическое применение в экологии и медицине для контроля качества и безопасности внешней среды, анализа состояния человека и животных, для характеристики

биотехнологических процессов производства в перерабатывающей и пищевой промышленности, а также используется для анализа биологически активных веществ в фармацевтике [2–5].

В экологической биотехнологии наибольшее распространение получили методы биотестирования и биосенсорного контроля, при этом в качестве биообъектов часто используются клетки и одноклеточные организмы.

Клеточная биоаналитика имеет ряд преимуществ перед химическими и физическими сенсорами.

Это связано с большей универсальностью аналитического контроля сред живыми организмами и способностью обнаруживать любое природное вещество, а также способностью синергического ответа на его присутствие в комбинации с другими веществами, что позволяет оценивать общее состояние среды с точки зрения ее безопасности для жизнедеятельности биообъектов.

Несомненным преимуществом клеточной биоаналитики является дешевизна контроля, а также такие свойства живых организмов, как саморегенерация и саморазмножение, отсутствующие у искусственно созданных химических и физических устройств. Это предопределило основное направление применения клеточных систем в экологии и биотехнологии – контроль качества и безопасности внешней среды и технологических процессов.

Наряду с клетками в биоаналитике могут быть использованы и различные клеточные формы: протопласты, сферопласты, L-формы бактерий, грибов, растительных клеток [6–8].

Несомненным преимуществом прокариот является их более интенсивный метаболизм по сравнению с эукариотическими клетками, а также месторасположение биоэнергетики бактерий на их бактоплазматической мембране, в то время как эукариотические клетки используют для производства АТФ внутреннюю мембрану митохондрий. Это превращает бактоплазматическую мембрану в первичную мишень действия многих факторов внешней среды.

Бактерии, как и другие организмы с клеточной стенкой, не имеют системы осмотической регуляции, поэтому обеспечивают свою осмотическую устойчивость путем образования клеточной стенки, способной поддерживать внешнюю форму и выдерживать осмотическое давление в 20 атм.

Клеточная стенка обеспечивает не только механическую прочность прокариот, но и является одним из барьеров, задерживающим 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.

Следствием удаления клеточной стенки бактерий является снижение их механической прочности, в результате чего форма клеток с палочковидной меняется на шаровидную и увеличиваются размеры протопластов, что влияет на их метаболизм, ограничивает способность размножаться и переводит их в стрессовое состояние. Это усиливает чувствительность клеточных форм бактерий к химическим веществам и обеспечивает им способность обнаруживать опасные вещества в меньших на 1–2 порядка концентрациях по сравнению с клетками [9].

К недостаткам использования протопластов при биотестировании относится необходимость применения гипертонических сред для поддержания жизнеспособности клеточных форм, что создает определенные неудобства в их применении.

Одним из путей устранения данного недостатка может быть применение протопластов в иммобилизованном состоянии. Среди способов иммобилизации клеток широкое распространение получили методы включения микроорганизмов в полимерные материалы [10]. Для протопластов вопросы их устойчивости и активности в связанном состоянии еще недостаточно изучены.

Основная часть. Цель работы – анализ осмоустойчивости протопластов бактерий в свободном и иммобилизованном состоянии.

Объектом исследования служили клетки Гр+ бактерий *B. subtilis* 162 из коллекции кафедры биотехнологии БГТУ и их протопласты. Протопласты бактерий в свободном и иммобилизованном состоянии получали ферментативным методом с использованием лизоцима [7]. В качестве гипертонической среды служила среда ММ9 с добавкой 20%-ного раствора сахарозы (ГС, рН 6,5).

Для анализа осмоустойчивости протопластов в свободном состоянии суточную культуру клеток *B. subtilis* (10^7 кл/мл) помещали в раствор лизоцима 1 мг/мл с содержанием сахарозы в интервале 0–30% и регистрировали их светорассеивание при 600 нм, а также тепловыделение и биолюминесценцию.

Об осмоустойчивости протопластов судили по скорости снижения их светорассеивания, тепловыделения, а также уменьшения интенсивности биолюминесценции при переводе протопластов в физиологический раствор (ФР).

Для получения протопластов в иммобилизованном состоянии использовали питательный агар-агар (ПА) бактериологический (ИнтерЛаб-Сервис, Минск). Суточную культуру клеток *B. subtilis*, содержащую 10^7 кл/мл, помещали в ПА при 50°C. После остывания агара в среду вносили лизоцим в ГС в концентрации 1 мг/мл и регистрировали процесс протопластирования клеток в агаре методом биокалориметрии по изменению мощности их тепловыделения образцов.

Выход протопластов, определенный методом посева и культивирования клеток, составил 94–95%.

Осмоустойчивость протопластов в иммобилизованном состоянии оценивали методом биокалориметрии. Для этого в кювету микрокалориметра, содержащую агаровую пленку с протопластами, помещали 1 мл ФР и записывали кинетику изменения тепловыделения протопластов в течение 2 ч.

Размеры клеток и протопластов определяли методом световой микроскопии с помощью микроскопа БИММ Р-11, окуляр-микрометра и объект-микрометра [11].

Измерение оптической плотности D_{600} образцов проводили с помощью спектрофотометра Specord M-40 (Германия). Тепловыделение образцов регистрировали на микрокалориметре МКМ-Ц (Казахстан). Биолюминесцентные измерения проводили с помощью биолюминометра System Sure II с устройством Ultraspap™ ATP (Великобритания).

Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Клеточная стенка Гр+ бактерий имеет толстый муреиновый слой и стабилизирующие его тейхоевые и липотейхоевые кислоты.

При воздействии лизоцима на клеточную стенку бактерий происходит расщепление β -1,4-гликозидных связей в муреиновых цепочках, что приводит к нарушению всего пептидогликанового каркаса, сдерживающего внутриклеточное осмотическое давление ($P_{вну}$) [8].

В этом случае целостность протопластов будет обеспечиваться бактоплазматической мембраной, возможности которой ограничены.

При $P_{вне} < P_{вну}$ (гипотоническая среда) размеры протопластов будут увеличиваться до $P_{вне} = P_{вну}$ (изотоническая среда).

При $P_{вне} > P_{вну}$ (гипертоническая среда) протопласты будут сжиматься. Эти изменения могут быть зарегистрированы с помощью метода светорассеивания.

На рис. 1 приведена зависимость изменения оптической плотности D протопластов при 600 нм от концентрации сахарозы в ФР.

Как видно из рис. 1, светорассеивание протопластов зависит от концентрации сахарозы, которая является регулятором внешнего осмотического давления среды. Она оказывает влияние как на размеры, так и на концентрацию протопластов.

В отсутствии клеточной стенки и сахарозы под действием некомпенсированного внутреннего осмотического давления в физиологическом растворе протопласты увеличиваются до максимально возможных размеров, а затем разрушаются. В результате этого концентрация протопластов снижается и их светорассеивание падает.

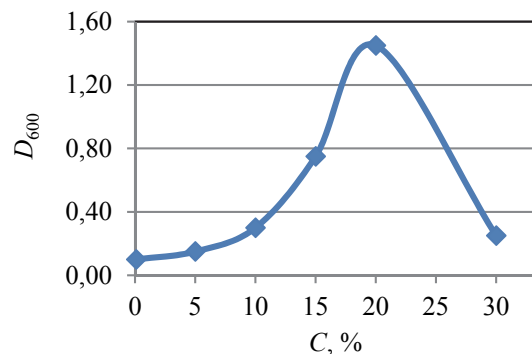


Рис. 1. Изменение светорассеивания (D_{600}) протопластов бактерий *B. subtilis* от концентрации сахарозы в ФР

Увеличение концентрации сахарозы до 20% приводит к возрастанию внешнего осмотического давления, уменьшению размеров протопластов ниже критического значения и увеличению концентрации не лопнувших клеточных форм, что приводит к росту светорассеивания среды.

Максимальное увеличение светорассеивания протопластов наблюдается при 20% дисахарида (рис. 1).

Это указывает на то, что внешнее ($P_{вне}$) и внутреннее ($P_{вну}$) осмотическое давление протопластов уравниваются при 20%-ном растворе сахарозы.

Повышение концентрации сахарозы с 20 до 30% приводит к снижению светорассеивания протопластов, что указывает на уменьшение их размеров в результате превышения $P_{вне}$ над давлением внутри протопластов.

В соответствии с Вант-Гоффом осмотическое давление (P , кПа) растворов низкомолекулярных недиссоциирующих веществ, таких как сахароза, определяется уравнением [12]

$$P = R \cdot T \cdot C, \quad (1)$$

где R – универсальная газовая постоянная, равная 8,314 Дж/(моль·К); T – температура, К; C – концентрация сахарозы, моль/л.

Клетки и протопласты микроорганизмов содержат высокомолекулярные коллоидные структуры и диссоциирующие молекулы, поэтому в целом не подчиняются уравнению Вант-Гоффа.

Известно, что давление высокомолекулярных растворов зависит от концентрации биополимеров и определяется выражением Галлера:

$$\frac{P}{C} = \frac{R \cdot T}{M} + B \cdot C, \quad (2)$$

где R – универсальная газовая постоянная, Дж/(моль·К); T – температура, К; M – относительная молекулярная масса полимеров, г/моль; C – их концентрация, г/л; B – коэффициент, характеризующий отклонение от уравнения Вант-Гоффа.

На рис. 2 приведена зависимость относительной величины D_{600}/C для протопластов от концентрации сахарозы.

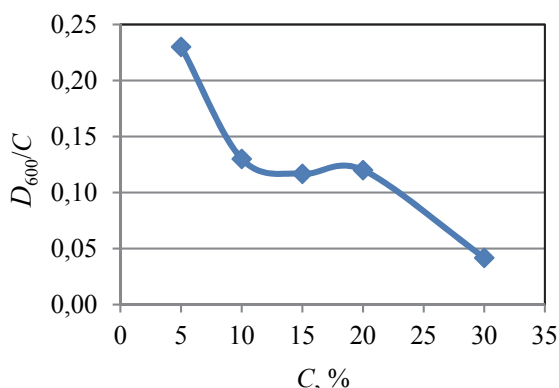


Рис. 2. Изменение величины D_{600}/C протопластов бактерий *B. subtilis* от концентрации сахарозы

Как видно из рис. 2, величина D_{600}/C в области концентрации сахарозы 10–20% не зависит от ее концентрации и светорассеивания протопластов в данном диапазоне пропорционально осмотическому давлению (концентрации сахарозы).

На рис. 3 представлена кинетика нарастания светорассеивания клеток при протопластировании Гр+ бактерий.

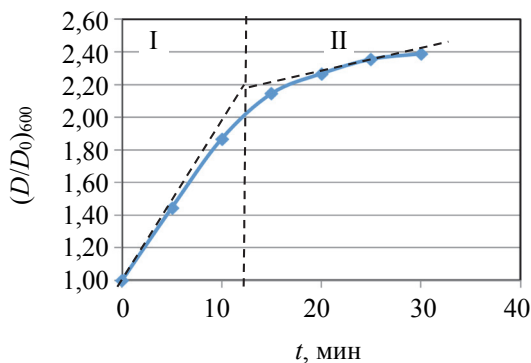


Рис. 3. Кинетика изменения $(D/D_0)_{600}$ при протопластировании клеток *B. subtilis* в ГС (20%-ная сахароза). $N = 10^7$ кл./мл; $C_{\text{лизозим}} = 1$ мг/мл

Как видно из рис. 3, при удалении клеточной стенки лизоцимом в ГС (20%-ная сахароза) наблюдаются 2 стадии изменения величины $(D/D_0)_{600}$: быстрая (I) и медленная (II).

Несбалансированность внутреннего и внешнего осмотического давления при разрушении клеточной стенки приводит к быстрому изменению формы клеток с палочковидной на сферическую, увеличению размеров протопластов и росту светорассеивания среды (рис. 3, I).

В условиях наличия полунепроницаемой бактоплазматической мембраны, которая не позволяет веществам диффундировать в клетки,

в них проникает вода под действием силы осмотического давления для уменьшения градиента концентрации веществ внутри клеток.

Движение воды в протопласты – более медленный процесс, чем выравнивание внешнего и внутреннего осмотического давления при разрушении клеточной стенки и увеличении их размеров (быстрая стадия, рис. 3, I).

Избыточное поступление воды в протопласты вызывает их гипергидратацию. Это сопровождается растяжением бактоплазматической мембраны и увеличением размера и площади поверхности протопластов по сравнению с клетками, что рассматривается как медленная стадия изменения светорассеивания среды (рис. 3, II).

На рис. 4 представлена кинетика изменения светорассеивания при протопластировании бактерий *B. subtilis* в зависимости от концентрации дисахарида в ГС.

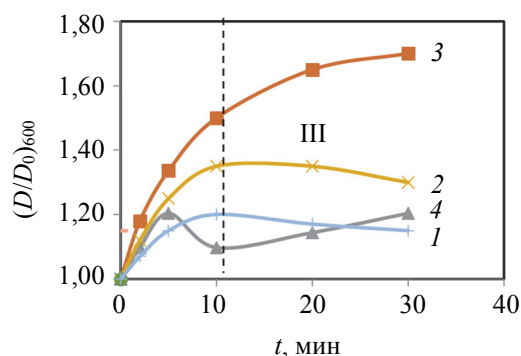


Рис. 4. Кинетика протопластирования клеток бактерий *B. subtilis* в среде с сахарозой: 1 – 5%; 2 – 10%; 3 – 15%; 4 – 30%; $N = 10^7$ кл./мл; $C_{\text{лизозим}} = 1$ мг/мл

При уменьшении концентрации сахарозы ниже 20% максимальное значение светорассеивания среды снижается. В кинетике светорассеивания появляется III стадия, указывающая на разрушение протопластов, усиливающееся с уменьшением концентрации осморегулятора.

Образующиеся при разрушении клеточной стенки бактерий протопласты покрыты бактоплазматической мембраной. Как известно, толщина мембраны 6–10 нм. Она содержит поры размерами 0,2–0,7 нм в количестве 10^7 пор/см² поверхности. Биомембраны способны растягиваться и сжиматься до критических размеров пор [13].

В соответствии с уравнением Лапласа, на искривленной границе поверхности липид – вода появляется добавочное давление:

$$\Delta P = 2\sigma/r, \tag{3}$$

где ΔP – разность между внутренним и внешним осмотическим давлением, Па; σ – межфазное натяжение внутри поры, Н/м; r – радиус пор, м.

Согласно теории устойчивости биомембран, они могут находиться в различных фазовых состояниях (жидкокристаллическом и гелевом) с разной степенью плотности упаковки молекул липидов и толщиной мембран, при этом целостность биомембраны сохраняется за счет силы ее поверхностного натяжения. Установлено, что осмоллиз биомембран наблюдается при достижении критических размеров пор в 0,2–2 нм в зависимости от природы и состава мембран [13].

В таблице приведены результаты анализа размеров клеточных форм методом микроскопии.

Средние размеры клеточных форм бактерий *B. subtilis* в ФР и растворах сахарозы

Показатели	Клетки <i>B. subtilis</i> в ФР	Протопласты		
		ФР	20%-ная сахароза	30%-ная сахароза
Размеры, мкм	1–3	6,0	4,5	3,5
Площадь (S , мкм ²)	11,0	113,0	63,6	38,5
Объем (V , мкм ³)	14,6	113,0	47,7	22,4
S/V , мкм ⁻¹	4,67	1,0	1,33	0,81

Поступление химических веществ в клетку и эффективность дыхания бактерий зависят от отношения площади поверхности (S) к объему (V). Для клеток *B. subtilis* в ГС величина $(S/V)_{\text{кл}} = 14/3$, для их протопластов $(S/V)_{\text{прот}} = 4/3$.

Это означает, что эффективность дыхания протопластов бактерий с увеличением их объема снижается в 3–4 раза по сравнению с клетками и соответственно увеличивается теплопродукция протопластов, что согласуется с наблюдаемым изменением их тепловыделения (рис. 5).

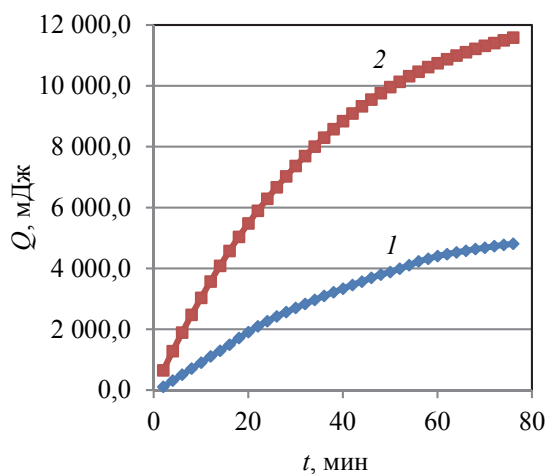


Рис. 5. Тепловыделение клеток и протопластов бактерий *B. subtilis* в ГС. $N = 10^7$ кл./мл:
1 – клетки; 2 – протопласты

Рост тепловыделения протопластов по сравнению с клетками указывает на их переход в стрессовое состояние.

Увеличение размеров протопластов может приводить к снижению выработки в них АТФ из-за растяжения мембраны и смещения переносчиков электронов относительно друг друга.

На рис. 6 приведены результаты биолюминесцентного анализа содержания АТФ в клетках и протопластах.

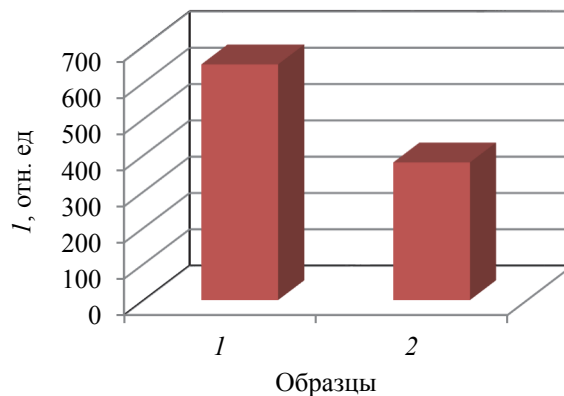


Рис. 6. Интенсивность биолюминесценции клеток *B. subtilis* (1) и их протопластов (2)

Как видно из рис. 6, интенсивность биолюминесценции клеток выше, чем протопластов в 1,7 раза. Поскольку интенсивность биолюминесценции пропорциональна содержанию АТФ, то снижение уровня АТФ в протопластах по сравнению с клетками может быть связано с разобщением дыхания и фосфорилирования в результате деформации бактоплазматической мембраны при увеличении размеров протопластов.

На рис. 7 приведены результаты анализа осмоллиза протопластов в свободном и иммобилизованном в 0,7%-ном и 2%-ном питательном агаре состоянии при помещении их в ФР.

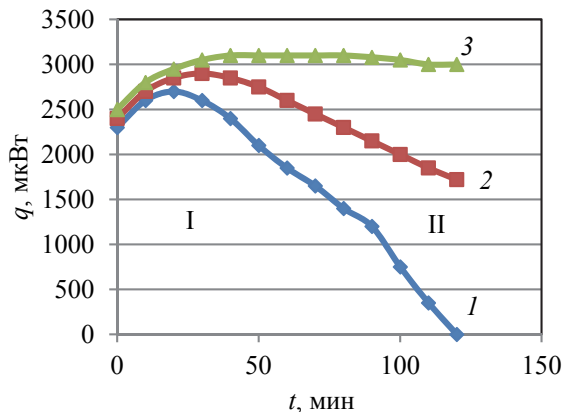


Рис. 7. Изменение мощности тепловыделения протопластов *B. subtilis*:

1 – протопласты в ФР; 2 – протопласты в 0,7%-ном агаре; 3 – протопласты в 2%-ном агаре

После осаждения протопластов центрифугированием и перевода в ФР их разрушение по данным метода микрокалориметрии наблюдается в течение 2 ч (рис. 7, 1). При этом выделяются две стадии – медленного (I) и быстрого (II) снижения тепловыделения.

С позиции учения о стрессе и его 2-стадийности [9] медленная стадия может отражать протекание репарационных процессов и противодействие протопластов внешнему воздействию, а быстрая стадия – характеризует дистрессовое состояние протопластов и их разрушение.

Анализ кинетики изменения тепловыделения протопластов, иммобилизованных в 0,7%-ном агаре, показывает (рис. 7, 2), что их устойчивость возрастает в 1,5–2 раза по сравнению с ФР, но недостаточна для сдерживания их внутреннего осмотического давления.

Агар-агар представляет собой смесь линейного полисахарида агарозы и разветвленного полисахарида амилопектина с их примерным процентным содержанием 70:30. Застывание агара при температуре ниже 45°C вызывает образование крупноячейстой, связанной водородными связями, обратимой сетки физического геля, через поры которой могут проникать вещества с молекулярной массой в несколько сотен килодальтон.

Повышение концентрации агара до 2% приводит к стабилизации тепловыделения протопластов (рис. 7, 3). Сеточная структура агара ограничивает рост размеров протопластов. Это снижает уровень стресса и уменьшает тепловыделение иммобилизованных протопластов.

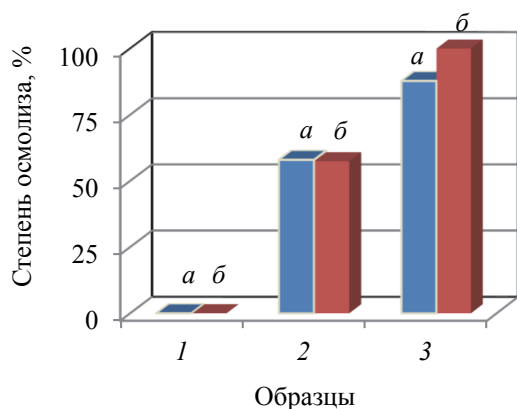


Рис. 8. Степень осмозиса протопластов бактерий *B. subtilis* в ФР от времени наблюдения по данным биолуминесценции (а) и биокалориметрии (б): 1 – 0; 2 – 60 мин; 3 – 120 мин

На рис. 8 приведены результаты определения степени осмозиса протопластов в физиологическом растворе по данным методов биолуминесценции и биокалориметрии.

Оба метода дали хорошо совпадающие результаты. По данным биокалориметрии за время

наблюдения 60 мин была достигнута степень осмозиса в ФР – 42,56%, а по данным биолуминесценции – 42,04%. После 120 мин осмозиса биокалориметрия показала 100% разрушение протопластов, биолуминесценция – 87,8%.

Несовпадение результатов анализа при длительном времени осмозиса протопластов связано с тем, что метод биолуминесценции является более чувствительным, чем метод биокалориметрии и позволяет определять минимальные концентрации бактерий на уровне 10^4 кл/мл в реальном времени, тогда как метод биокалориметрии – 10^5 кл/мл за 10–20 мин. Вместе с тем метод биолуминесценции относится к разрушающим реагентным методам контроля, тогда как метод биокалориметрии – к неразрушающим безреагентным и позволяет записывать кинетику осмозиса.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что протопласты сохраняют осмоустойчивость в иммобилизованном состоянии в 2%-ном агаре в отсутствии гипертонической среды и они могут быть использованы в биоаналитике не только для биотестирования, но и для биосенсорного анализа токсичных веществ в водных средах.

Заключение. Использование микроорганизмов в клеточной биоаналитике является перспективным направлением экологической биотехнологии, позволяющим быстро и дешево определять разнообразные опасные вещества в окружающей среде.

Протопласты, как формы Гр+ бактерий, лишенные клеточной стенки, обладают на 1–2 порядка более высокой чувствительностью к вредным веществам, чем клетки, что обеспечивает возможность их раннего обнаружения в водных средах методом биотестирования. Вместе с тем многие свойства протопластов бактерий остаются до настоящего времени слабоизученными по сравнению с клетками.

В данной работе проведен анализ осмоустойчивости протопластов бактерий *B. subtilis* в свободном и связанном состояниях с целью выяснения возможности замены гипертонической жидкой среды на гелевое окружение для использования протопластов не только при биотестировании сред, но и в составе биосенсоров.

Проведенный анализ осмоустойчивости протопластов показал, что удаление клеточной стенки бактерий приводит к изменению формы клеток с палочковидной на сферическую и росту размеров протопластов бактерий в 1,5–2 раза по сравнению с клетками в зависимости от содержания сахарозы в среде как регулятора осмотического давления. Увеличение размеров протопластов в ГС (20%-ная сахароза) уменьшает соотношение их площади поверхности к объему (S/V) в 3–4 раза по сравнению с клетками, что

снижает эффективность транспортных и энергетических процессов в протопластах.

Протопластирование клеток с низким содержанием сахарозы во внешней среде сопровождалось стадиями быстрого и медленного увеличения светорассеивания, сменявшегося его падением. Максимальный рост светорассеивания протопластов наблюдался для 20%-ных растворов сахарозы, когда их внутреннее осмотическое давление было уравновешено внешним осмотическим давлением среды и степень осмолиза протопластов была минимальна.

Уменьшение концентрации сахарозы ниже 20% вызывало падение уровня светорассеивания среды за счет роста осмолиза протопластов и снижения их концентрации.

Увеличение концентрации осморегулятора с 20 до 30% приводило к снижению светорассеивания протопластов за счет их сжатия.

Метод светорассеивания удобен для анализа состояния протопластов в жидких средах, но не способен характеризовать их поведение в иммобилизованном состоянии в составе гелей.

Для этого был использован метод биокалориметрии, который позволяет анализировать поведение протопластов в свободном и связанном состояниях.

Биокалориметрический анализ клеток и протопластов в ГС показал, что уровень тепловыделения протопластов в 3–4 раза выше, чем у клеток. Это говорит о снижении эффективности энергетических процессов протопластов, связанном с увеличением их размеров и уменьше-

нием соотношения (S/V) в 3–4 раза по сравнению с клетками. Все это указывает на то, что удаление клеточной стенки у протопластов переводит их в стрессовое состояние.

На кривой изменения мощности тепловыделения протопластов при их осмолизе в физиологическом растворе выделяется медленная и быстрая стадии, которые можно объяснить с точки зрения теории стресса Селье переходом из стрессового в дистрессовое состояние. При нахождении протопластов в стрессовом состоянии они борются за выживание, что приводит к медленному изменению тепловыделения образцов. В дистрессовом состоянии, когда ресурсы для борьбы исчерпаны, наблюдается быстрая стадия уменьшения тепловыделения протопластов.

Анализ осмолиза протопластов в ФР методами биокалориметрии и биолюминесценции показал, что они дают хорошо совпадающие результаты, что позволяет характеризовать биоэнергетику протопластов с разных сторон.

Перевод протопластов в гелевое окружение в составе 0,7% агара повышает их осмоустойчивость в 1,5–2 раза по сравнению с ФР, но не защищает их полностью от осмолиза, и уровень тепловыделения образцов снижается со временем. Повышение концентрации агара до 2% обеспечивает высокий уровень выхода протопластов в иммобилизованном состоянии и сохранение их жизнеспособности в отсутствии гипертонической среды. Это позволяет использовать протопласты в составе биосенсорных устройств для анализа безопасности окружающей среды.

Список литературы

1. Юркова И. Л. Биоаналитика. Минск: БГУ, 2017. 359 с.
2. Тернер Э., Карубе И., Уилсон Дж. Биосенсоры: основы и приложения. М.: Мир, 1992. 614 с.
3. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / под ред. О. П. Мелехова, Е. И. Сарапульцева. М.: Академия, 2010. 288 с.
4. Ферментные биосенсоры для экспресс-анализа содержания глюкозы, этанола и крахмала в ферментационных средах / А. Е. Китова [и др.] // Микробные биокатализаторы и перспективы развития ферментных технологий в перерабатывающих отраслях АПК. М.: Пищепромиздат, 2004. С. 255–262.
5. Фармацевтическая биотехнология / под ред. Д. В. Моисеева. Витебск: ВГМУ, 2019. 293 с.
6. Fedorova G. I. Properties of bacterial protoplasts and spheroplasts // Bull. Exp. Biol. Med. 1969. No. 68. P. 66–69.
7. A role of latent, difficultly cultivated or non-cultivated persistent bacteria in human pathology / I. V. Eliseeva [et al.] // Annals of Mechnikov's Institute. 2006. No. 1. P. 12–46.
8. Яковенко К. Н., Троицкий Н. А. Протопласты микроорганизмов. Минск: Наука и техника, 1985. 160 с.
9. Игнатенко А. В. Биокалориметрический анализ безопасности водных сред с помощью протопластов бактерий // Биотехнология: взгляд в будущее: материалы III Междунар. науч.-практ. конф.: Ставрополь, 28 апр. 2017 г. Ставрополь, 2017. С. 267–271.
10. Иммобилизованные клетки и ферменты. Методы / под ред. Дж. Вудворда. М.: Мир, 1988. 215 с.
11. Игнатенко А. В. Микробиологические методы контроля качества пищевых продуктов. Минск: БГТУ, 2015. Ч. 2. 202 с.
12. Фролов Ю. Г. Курс коллоидной химии. М.: Альянс, 2004. 424 с.
13. Биофизика / В. Ф. Антонов [и др.]. М.: Владос, 1999. 288 с.

References

1. Yurkova I. L. *Bioanalitika* [Bioanalytics]. Minsk, BGU Publ., 2017. 359 p. (In Russian).
2. Terner A., Karube I., Uilson Dzh. *Biosensory: osnovy i prilozheniya* [Biosensors: Fundamentals and Applications]. Moscow, Mir Publ., 1992. 614 p. (In Russian).
3. *Biologicheskiy kontrol' okruzhayushchey sredy: bioindikatsiya i biotestirovaniye* [Biological control of the environment: bioindication and biotesting]. Edit. by O. P. Melekhov, E. I. Sarapul'cev. Moscow, Akademiya Publ., 2010. 288 p. (In Russian).
4. Kitova A. E., Alferov V. A., Ponamoreva O. N., Kuzmichev A. V., Ezhkov A. A., Arsen'ev D. V., Reshetilov A. N. Enzyme biosensors for express analysis of glucose, ethanol and starch content in fermentation media. *Mikrobnyye biokatalizatory i perspektivy razvitiya fermentnykh tekhnologiy v pererabatyvayushchikh otraslyakh APK* [Microbial biocatalysts and prospects for the development of enzyme technologies in the processing industries of agriculture]. Moscow, Pishchepromizdat Publ., 2004, pp. 255–262 (In Russian).
5. *Farmatsevticheskaya biotekhnologiya* [Pharmaceutical biotechnology]. Edit. by D. V. Moiseev. Vitebsk, VGMU Publ., 2019. 293 p. (In Russian).
6. Fedorova G. I. Properties of bacterial protoplasts and spheroplasts. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 1969, no. 68, pp. 66–69.
7. Eliseeva I. V., Babich E. M., Volyanskij Yu. L., Sklyar N. I., Belozerskiy V. I. A role of latent, difficultly cultivated or non-cultivated persistent bacteria in human pathology. *Annals of Mechnikov's Institute*, 2006, no. 1, pp. 12–46.
8. Yakovenko K. N., Troickiy N. A. *Protoplasty mikroorganizmov* [Protoplasts of microorganisms]. Minsk, Nauka i tekhnika Publ., 1985. 160 p. (In Russian).
9. Ignatenko A. V. Bio-calorimetric analysis of the safety of aquatic environments using bacterial protolayers. *Biotehnologiya: vzglyad v budushchee: materialy III Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii* [Biotechnology: a look into the future: materials of the III International scientific and practical conference]. Stavropol', 2017, pp. 267–271 (In Russian).
10. *Immobilizovannyye kletki i fermenty. Metody* [Immobilized cells and enzymes. Methods]. Edit. by J. Woodward. Moscow, Mir Publ., 1988. 215 p. (In Russian).
11. Ignatenko A. V. *Mikrobiologicheskiye metody kontrolya kachestva pishchevykh produktov* [Microbiological methods of food quality control], Minsk, BSTU Publ., 2015. Part 2. 202 p. (In Russian).
12. Frolov Yu. G. *Kurs kolloidnoy khimii* [Colloidal chemistry]. Moscow, Al'yans Publ., 2004. 424 p. (In Russian).
13. Antonov V. F., Chernysh A. M., Pasechnik V. I., Voznesenskiy S. A., Kozlova E. K. *Biofizika* [Biophysics]. Moscow, Vldos Publ., 1999. 288 p. (In Russian).

Информация об авторе

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 author

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 24.11.2021