

УДК 579.2

## ПАРАМЕТРЫ РАЗРУШЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ ВИДА *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* КРИСТАЛЛИЧЕСКИМ ДИОКСИДОМ КРЕМНИЯ

*А.Г. Шестаков, кандидат биологических наук, доцент,  
тел. (884232) 55-95-47, andrewschestakov@yandex.ru;*  
*Н.И. Молофеева, кандидат биологических наук, доцент,  
тел. (884231) 55-95-47, tolo-na@mail.ru;*  
*А.И. Калдыркаев, кандидат биологических наук, доцент,  
тел. (884231) 55-95-47, usxa@yandex.ru;*  
*Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор,  
тел. (884231) 55-95-47, usxa@yandex.ru;*  
*С.В. Мерчина, кандидат биологических наук, доцент,  
тел. (884231) 55-95-47, usxa@yandex.ru*  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, г. Ульяновск

*Ключевые слова: Bifidobacterium animalis, порошок, дезинтеграция, клеточная стенка, центрифугирование.*

*В статье изложено описание дезинтеграции бактериальных клеток бактерий вида Bifidobacterium animalis кристаллическим диоксидом кремния. Установлено оптимальное время механического воздействия абразивного порошка «Орисил» на бактериальные клетки Bifidobacterium animalis для полного их разрушения (дезинтеграции). Разработана схема позволяющая повысить эффективность разрушения клеток Bifidobacterium animalis с использованием абразивного порошка «Орисил». Разработанная схема, позволяет избежать осмотического шока у бактерий на различных этапах подготовки дезинтеграта. Суть схемы заключается в том, что культуру с порошком «Орисил» замораживают в определенных пропорциях с последующим оттаиванием. Далее проводят растирание полученной смеси традиционным способом при температуре от +6°C до 25°C.*

**Введение.** Дезинтеграция – процесс измельчения различных материалов. В биотехнологии термин дезинтеграция означает процесс необратимого анатомического разрушения целостности клеток. В настоящее время дезинтеграция имеет большое значение для микробиологии. Например методы отсроченного антагонизма предполагают исследование эндобелковых структур бактериальных клеток [1, 2].

Наиболее распространенные методы дезинтеграции – механические, ультразвуковые, экстраузионные, десорбционные и т.д. Основной задачей дезинтеграции является извлечение функционально активных структур и биополимеров. Таким образом, разработка быстрых, доступных, дешевых методов качественного разрушения бактериальных клеток с сохранением компонентов цитоплазмы является актуальной задачей [3]. **В некоторых наших работах мы уже использовали дезинтеграцию бактериальных клеток [4].**

Целью нашего исследования являлась разработка параметров разрушения бактериальных клеток бактерий вида *Bifidobacterium animalis* кристаллическим диоксидом кремния.

**Материалы и методы исследований.** Штамм бактерий *Bifidobacterium animalis* ATCC 21527. Центрифуга настольная СМ-6МТ, шкаф сушильный ШСС-80, Посуда лабораторная, фарфоровые чашки с пестиками, весы лабораторные, Автоклав гк-100. Среда для бифидобактерий Бифидум-среда, NaCl, Орисил А-300 ТУ У 24.1-31695418-002 2003. Метод анаэробного культивирования бактериальных клеток, ГОСТ 5900-2014, окраска по методу Грама.

**Результаты и их обсуждение.** Бактериальные клетки *Bifidobacterium animalis* в титре  $2 \cdot 10^8$  кл/мл вносили в стерильную фарфоровую ступку в объеме 10 мл и сразу добавляли коммерческий порошок «Орисил» содержащий 98% диоксида кремния. Удельная поверхность порошка «Орисил» по паспорту качества составляла  $200-300 \text{ м}^2/\text{г}$ . Порошок добавляли до получения влажности смеси около 20%. Данная влажность подобрана таким образом, что бы обеспечивалась пороговую сыпучесть порошка без формирования слипшейся массы. Для этого, установили эталонную для эксперимента влажность путем внесения стерильной среды для бифидобактерий в порошок «Орисил» и измеряя влажность по ГОСТ 5900-2014 до получения 20%. Экспериментальную смесь (дезинтеграция) получали смешивая порошок «Орисил» и 48 часовую культуру клеток *Bifidobacterium animalis* в уже известных соотношениях. По данному способу готовили 5 ступок с порошком «Орисил» и клетками *Bifidobacterium animalis*. Первую ступку использовали в качестве контроля полученного дезинтеграта. Для этого, стеклянной палочкой в течение 15 минут плавными движениями проводили смешивание компонентов. По истечении указанного времени определяли титр бактериальных клеток. Смесь во второй фарфоровой чашке перетирала энергичными движениями фарфоровым пестиком в ступке в течение 10 минут. Смеси в третьей, четвертой и пятой фарфоровых чашках также

подвергали интенсивному механическому перемешиванию, но уже в течение 20 минут, 30 минут и 40 минут соответственно. Через указанные временные интервалы определяли титр бактериальных клеток *Bifidobacterium animalis*. Результаты представлены в таблице 1.

**Таблица 1 - Определение времени механического воздействия абразивного порошка «Орисил» на бактериальные клетки *Bifidobacterium animalis* для полного их разрушения**

№ фарфоровой чашки	Время механического воздействия, мин.				
	0	10	20	30	40
1	2*10 <sup>6</sup>	-	-	-	-
2	-	4*10 <sup>3</sup>	-	-	-
3	-	-	5	-	-
4	-	-	-	0	-
5	-	-	-	-	0

Примечание: - не исследовали; 0 – отсутствие жизнеспособных клеток *Bifidobacterium animalis*.

В результате проведенных исследований установили, что оптимальным временем механического воздействия порошка «Орисил» посредством пестика в фарфоровой ступке является 30 минут. Однако очевидно, что уже непосредственно при контакте порошка и бактериальной суспензии титр клеток начинает снижаться. Данное явление, наиболее вероятно, связано с выходом цитоплазмы сквозь поры клеточной стенки при осмотическом изменении давления внутри клеток во время контакта с частицами диоксида кремния размером 200-300 нм. Подобное обезвоживание бактериальных клеток может способствовать тому, что модуль упругости компонентов клеточной стенки снижается, что делает клеточную стенку более устойчивой к неравномерно движущейся внеклеточной среде, вызывающей разрушение «нормальных» более упругих клеточных стенок [5].

Данное явление может привести к неполному высвобождению компонентов цитоплазмы у исследуемой популяции клеток. Кроме того, очевидно, существует теоретическая возможность сохранения жизнеспособности некоторых бактериальных клеток при последующей гидратации полученной перетертой смеси (дезинтеграта). Исходя из

полученных данных, становится очевидным поиск методов сохранения упругости клеточных стенок в момент механического воздействия, для эффективного их разрушения. Существуют различные методы стабилизации клеточных стенок, повышающие их модуль упругости, такие как, например, желатиновый гель. Однако, несмотря на свою эффективность, данный метод нуждается в подборе параметров для различных клеточных культур. Мы разработали схему, позволяющую избежать осмотического шока у бактерий на различных этапах подготовки дезинтеграта. Пробирку с питательной средой объемом 10 мл и содержащейся в ней 48 часовой культурой с количеством жизнеспособных клеток бактерий *Bifidobacterium animalis* порядка  $1 \cdot 10^8$  охлаждают до 0°C с формированием отдельных кристаллов льда и параллельно 50% от объема навески используемой в дальнейшем дезинтегрировании стерильного порошка «Орисил» охлаждают до -10°C. Время охлаждения составляет ориентировочно 3 часа. Далее эти две фазы смешивают в течение одной минуты стеклянной палочкой и подвергают резкой заморозке до -10°C в течение 3-х часов. Через указанное время проводят дефростацию замороженной суспензии до 0°C с последующим внесением оставшегося стерильного порошка «Орисил» до влажности 20%. Далее проводят растирание полученной смеси как указано выше при температуре от +6°C до 25°C. Данная схема исключает изменение осмотического давления в бактериальных клетках, а потери жизнеспособности культуры при данном методе составляют порядка 10-1000 кл/мл, при этом структура и что важно модуль упругости клеточной стенки таких бактериальных клеток остаются на прежнем уровне. После того как мы получили дезинтеграт бактериальных клеток бактерий *Bifidobacterium animalis* по разработанной нами схеме, мы провели отмывку целевых компонентов от порошка «Орисил». Для этого, содержимое фарфоровой чашки вносили в 50 мл 0,9% раствора хлорида натрия, встряхивали и разливали по пробиркам. Затем пробирки центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3-х минут. Супернатант собирали в колбу. Неспецифическую адгезию компонентов клеточных стенок бактерий *Bifidobacterium animalis* с частицами «Орисила» не учитывали. Так же проводили отмывку дезинтеграта полученного нами без предварительной стабилизации клеточных стенок. Для сравнения двух способов дезинтегрирования клеток бактерий *Bifidobacterium animalis* мы разделили полученные, очищенные от порошка «Орисил» супернатанты посредством центрифугирования при 3000 об/мин в течение 15 минут. Получили осадок, содержащий оставшиеся клетки, и надосадок,

содержащий компоненты клеточных стенок. При окраске мазков осадка и надосадка с последующей микроскопией установлено, что осадок дезинтеграта полученный обычным способом содержит целые клетки. Осадок дезинтеграта полученный по разработанному нами способу с замораживанием не содержит целых клеток, что может свидетельствовать о качественном разрушении бактериальных клеток бактерий вида *Bifidobacterium animalis* кристаллическим диоксидом кремния.

**Заключение.** При перемешивании порошка «Орисил» и бактериальных клеток *Bifidobacterium animalis* происходит их неизбежное механическое повреждение с деструкцией клеточной стенки и выходом цитоплазмы и ее компонентов, напрямую зависящее от времени данного воздействия. Нами установлено оптимальное время механического воздействия абразивного порошка «Орисил» на бактериальные клетки *Bifidobacterium animalis* для полного их разрушения. Оно составляет не менее 30 минут. Для эффективного разрушения и исключения сохранения в дезинтеграте не разрушенных бактериальных клеток нами разработана схема позволяющая повысить эффективность разрушения клеток *Bifidobacterium animalis* с использованием абразивного порошка «Орисил».

*Библиографический список:*

1. Шестаков А.Г. Схема выделения и селекции перспективных штаммов бактерий для разработки консорциума стартерной закваски, ускоряющей компостирование органических отходов сельскохозяйственных предприятий /А.Г. Шестаков, Д.А.Васильев, А.С.Терешкин, А.И.Калдыркаев, Н.И.Молофеева, Н.Г. Барт Н.Г. //Научная жизнь. - 2017. - № 11. - С. 105-119.
2. Шестаков А.Г. Компостирование органических отходов сельскохозяйственных животных /А.Г.Шестаков, Д.А.Васильев, А.С.Терешкин, Н.И.Молофеева, А.И.Калдыркаев – Ульяновск - 2017.
3. Кудрявцев А.А., Гуревич Г.А., Фихте Б.А., Механические свойства микробных оболочек / А.А.Кудрявцев, Г.А.Гуревич, Б.А.Фихте. - Пушино. - 1988.
4. Шестаков А.Г. Исследование антагонизма перспективных штаммов бактерий консорциума стартерной закваски, ускоряющей компостирование органических отходов сельскохозяйственных предприятий в отношении некоторых видов бактерий и вирусов /А.Г. Шестаков, Д.А.Васильев, С.Н. Золотухин, А.С. Терешкин, А.И. Калдыркаев, Н.И.Молофеева //Естественные и технические науки. - 2017.- № 12. - С. 54-58.
5. Гузь А.Н. Устойчивость трехмерных деформируемых тел. /А.Г.Гузь. Киев: Наукова думка – 1971 - 276с.

## THE PARAMETERS FOR THE DESTRUCTION OF BACTERIAL CELLS BACTERIA OF THE SPECIES BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS CRYSTALLINE SILICA

*Shestakov A. G., Malofeeva N.I., Kuldyrkaev A. I., Vasilyev D. A., Marcina S. V.*

**Key words:** *Bifidobacterium animalis*, powder, disintegration, cell wall, centrifugation.

*The article describes the disintegration of bacterial cells of Bifidobacterium animalis bacteria by crystalline silicon dioxide. The optimal time of mechanical action of abrasive powder "Orisil" on bacterial cells of Bifidobacterium animalis for their complete destruction (disintegration) was established. The scheme allows to increase the efficiency of destruction of Bifidobacterium animalis cells using abrasive powder "Orisil". The developed scheme allows to avoid osmotic shock in bacteria at different stages of disintegration preparation. The essence of the scheme is that the culture with the powder "Orisil" is frozen in certain proportions, followed by thawing. Next, the resulting mixture is rubbed in a traditional way at a temperature of +6°C to 25°C.*