

**Е.П. Ливинская, Н.К. Коваленко, И.Л. Гармашева**

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев МСП, Д03680, Украина*

## **ДЕЗИНТЕГРАЦИЯ ЛАКТОБАЦИЛЛ И ЭНТЕРОКОККОВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК**

*Описаны способы дезинтеграции грамположительных бактерий с целью получения фрагментов клеточных стенок. Применение ультразвукового дезинтегратора УЗД-500 при частоте 22 кГц непрерывно в течение 30 мин является оптимальным для дезинтеграции клеток лактобацилл и энтерококков. Получение фрагментов клеточных стенок достигается также при шестикратном растирании клеток в жидком азоте до его полного испарения.*

*Ключевые слова:* клеточные стенки, молочнокислые бактерии, ультразвуковая дезинтеграция.

Методы дезинтеграции клеток играют важную роль как при проведении фундаментальных исследований, так и касающихся важных прикладных, в том числе технологических, аспектов современной биотехнологии. В литературе описаны различные способы разрушения бактериальных клеток: химические, биологические и физико-механические. Химические методы предусматривают применение нейтральных солей, хелатных агентов, детергентов, литических ферментов, повреждающих целостность клеточных оболочек. Биологическая дезинтеграция клеток базируется на действии бактериоцинов, фагов, внутриклеточных паразитов. Дезинтеграцию, осуществляемую физическими и механическими методами, можно рассматривать как «сверхтонкий помол твердых тел» [4].

В последние десятилетия особое внимание исследователей разных стран привлекают компоненты клеточных стенок молочнокислых бактерий, среди которых особое место занимают тейхоевые кислоты. Из литературных данных известно, что данные биополимеры могут оказывать влияние на клеточные ткани, иммунную систему теплокровных животных и человека, а также принимать участие во многих биологических процессах, в частности адгезии, патогенезе некоторых заболеваний [3, 14]. Особый интерес представляют собой тейхоевые кислоты пробиотических бактерий, их функциональная роль и способность взаимодействовать с рецепторами эукариотических клеток.

Изучение компонентов клеточных стенок предусматривает получение их в нативной форме для осуществления биохимического анализа и исследования биологической активности. Поэтому методы дезинтеграции клеток не должны влиять на исследуемые биомолекулы. Согласно многочисленным методикам по изучению тейхоевых кислот, первым этапом в процессе их выделения является получение фрагментов клеточных стенок бактерий. С этой целью применяют физико-механические методы, поскольку использование других методов имеет недостатки. Биологическая дезинтеграция представляет собой довольно специфический и затратный процесс, кроме того, существует проблема неполного отделения внутриклеточных компонентов в процессе получения клеточных стенок [4]. Проблема применения химических методов связана с тем, что под действием ферментов или других разрушающих агентов пептидогликан теряет свою плотность, что усложняет получение нужной фракции в процессе дифференциального центрифугирования [7].

Физико-механические методы дезинтеграции клеток включают баллистические, гидроэкструзионные, ультразвуковые и декомпрессионные. Чаще всего авторы используют баллистические и ультразвуковые дезинтеграторы. В первом случае способ передачи энергии от рабочих частей прибора к клеткам происходит непосредственно при механическом контакте или через «мельющие тела» [5, 12].

В основе принципа действия ультразвуковых дезинтеграторов лежит явление кавитации. Прохождение акустической волны через водную суспензию приводит к образованию чередующихся локальных очагов с низким и высоким давлением, в результате чего образуются кавитационные пузырьки. Они образуются в участках с низким давлением, растут в размере, принимая энергию внешнего воздействия, а затем, при переходе в область с высоким давлением, сжимаются и разрываются с высоким кинетическим потенциалом. При этом происходит повреждение и разрушение структур в пределах их действия [8].

© Е.П. Ливинская, Н.К. Коваленко, И.Л. Гармашева, 2011

Следует отметить, что микроорганизмы различных таксономических групп, в силу особенностей их строения, не в равной степени подвергаются физико-механическому разрушению. Согласно литературным данным, клеточные стенки грамположительных бактерий гораздо труднее разрушаются, чем стенки грамотрицательных бактерий [10]. Это объясняется разницей в мощности слоя пептидогликана. У грамположительных бактерий пептидогликан с большим количеством поперечных связей образует слой, толщина которого достигает 10 нм. У грамотрицательных бактерий пептидогликан образует тонкую сетчатую структуру толщиной 2 нм [1]. Следовательно, клеточные стенки грамположительных микроорганизмов отличаются высокой механической прочностью. Предел прочности клеточной стенки составляет  $10^9$  дин/см<sup>2</sup> (1 дин = г×см/с<sup>2</sup>), что соответствует пределу прочности некоторых сортов стали [4]. Поэтому для разрушения таких прочных субмикроскопических структур необходимо сильное механическое воздействие, вызывающее гидродинамический градиент порядка  $10^8$  с<sup>-1</sup> и более [4]. Итак, процесс дезинтеграции, с одной стороны, требует высоких затрат энергии, а с другой – точности и стандартизации действия на микроуровне.

Разрушение клеток молочнокислых бактерий, которые относятся к грамположительным микроорганизмам, представляет собой существенную проблему, о чем свидетельствуют многочисленные публикации [4, 6, 10]. По данным литературы, эффективность разрушения клеток зависит от стадии роста культуры, времени и мощности физико-механического воздействия. При этом авторами применялись различные модификации для усиления разрушительного эффекта [8, 11].

Целью данной работы было подбор метода и оптимизация режимов дезинтеграции клеток молочнокислых бактерий для получения фрагментов клеточных стенок.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были штаммы Украинской коллекции микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАНУ *Lactobacillus plantarum* 195Д (изолированный из кишечного тракта долгожителей Абхазии), *L. plantarum* 11/16 УКМ В-2694 (источник выделения – поверхность листьев дикорастущих растений), *Enterococcus faecium* К-50 УКМ В-2535 (источник выделения – пищеварительный тракт цыплят). В качестве контроля использовали штамм *Escherichia coli* УКМ В-926 (референтный штамм), относящийся к грамотрицательным бактериям.

Молочнокислые бактерии выращивали на жидкой питательной среде МРС [9] в течение суток при 37 °С, *E. coli* – на мясоептонном бульоне (МПБ).

Концентрацию бактериальных клеток определяли высевом десятикратных разведений на поверхность агаризованной среды МРС и выражали в колониеобразующих единицах в 1 мл (КОЕ/мл). С целью получения суспензий клеток на разных стадиях роста строили кривую роста бактериальной культуры в течение 32 часов. Для этого высевали культуры по методу Коха с интервалом в один час.

В исследованиях использовали бактериальные суспензии с концентрацией  $5 \times 10^9$  КОЕ/мл. Суспензии получали на разных стадиях роста путем центрифугирования в течение 15 минут при 3000 оборотов в минуту (700 g). Осадок клеток отмывали дистиллированной водой дважды и ресуспендировали в дистиллированной воде.

В процессе работы мы применяли ультразвуковые дезинтеграторы следующих моделей – УЗДН-2Т, УЗДН-1, УЗДН-А, УЗД-500, MSE-150 и экспериментальную ультразвуковую установку (ЭУУ), предоставленную сотрудниками Национального технического университета Украины «КПИ». Дезинтеграцию проводили при частоте 22 кГц при охлаждении бактериальной суспензии до + 4 °С. Исходя из технических возможностей самих приборов и рекомендаций различных авторов, мы использовали временные режимы – 9, 12, 15, 20 и 30 мин [10, 11]. Суспензию бактерий подвергали воздействию ультразвука в течение 1-5 мин несколько раз с перерывами в 1-2 мин. Учитывали суммарное время действия ультразвука на бактерии. На приборе УЗД-500 дезинтеграцию проводили в течение 30 мин без перерывов. Степень разрушения клеток оценивали по результатам световой и электронной микроскопии.

Была проведена модификация метода ультразвуковой дезинтеграции в соответствии с рекомендациями различных авторов [7, 8]. Модификации дезинтеграции включали: добавление к бактериальной суспензии 4 % додецилсульфата натрия (SDS), абразива оксида алюминия (10 г/л), выдерживание суспензии в течение 48 часов в дистиллированной воде при 4 °С, де-

зинтегрирование при pH 8, а также исследование на разных стадиях роста бактериальной культуры (середина логарифмической и начало стационарной фазы). Кроме того, клетки подвергали воздействию ультразвука с добавлением микродисперсного молибденового порошка, размеры частиц которого составляли 2-3 мкм. Для этого частицы молибдена ресуспендировали в дистиллированной воде (концентрация 10 г/л) с добавлением SDS в количестве 0,01 % и с целью стабилизации действовали ультразвуком в течение 10 мин при 22 кГц.

Кроме того, нами были применены альтернативные методики разрушения клеток молочнокислых бактерий, а именно – замораживание–размораживание, дезинтеграция с помощью гомогенизатора Поттера, растирание клеток с измельченным стеклом, растирание клеток в жидком азоте.

Замораживание–размораживание клеток проводили путем пятикратного цикла заморозки до –20°C, а размораживание – при комнатной температуре (+20°C). Дезинтеграцию с использованием гомогенизатора Поттера и растирание с измельченным стеклом осуществляли в течение 10 минут.

При растирании клеток в жидком азоте сначала охлаждали емкость, затем наполняли ее жидким азотом (10 мл), вносили бактериальную биомассу, полученную из 10 мл культуральной жидкости, и растирали до полного испарения азота. Процедуру повторяли 5-6 раз.

**Результаты и их обсуждение.** Ультразвуковые дезинтеграторы разных производителей и поколений показали разные результаты при разрушении бактерий различных таксономических групп (табл. 1).

**Т а б л и ц а 1**

**Дезинтеграция клеток с использованием УЗ-дезинтеграторов**

Модель дезинтегратора	Суммарная продолжительность действия УЗ на клетки, мин	Результат действия ультразвука на клетки		
		<i>Lactobacillus plantarum</i> (гр +)	<i>Enterococcus faecium</i> (гр +)	<i>Escherichia coli</i> (гр -)
УЗДН-1	12	-	-	+ (6 мин)
УЗДН-2Г	9	-	-	+ (4 мин)
УЗДН-А	20	-	исследования не проводили	
ЭУУ	20	-	-	+ (6мин)
УЗД 500	30	<b>+(30мин)</b>	исследования не проводили	
MSE 150	15	-	-	+ (1 мин)

**Примечание:** «+» - клетки разрушились, «-» - клетки не разрушились;

() - Время экспозиции, при котором был достигнут эффект

подавляющее большинство отечественных приборов разрушало грамтрицательные клетки за 4-6 мин, а дезинтегратор MSE 150 (Великобритания) приводил к полной дезинтеграции клеток *E. coli* в течение одной мин. Лактобациллы и энтерококки в большинстве случаев не удалось разрушить. В то же время была достигнута удовлетворительная дезинтеграция клеток при работе на приборе УЗД 500. Данный прибор представляет собой отечественный дезинтегратор нового поколения с рабочей мощностью в 500 ватт, что оказалось достаточным для получения фрагментов клеточных стенок при непрерывной экспозиции в течение 30 мин воздействия ультразвука. Результаты световой микроскопии представлены на рис. 1.

Как уже упоминалось выше, клеточная стенка грамположительных бактерий представляет собой довольно прочную структуру и препятствует дезинтеграции клеток методами, достаточными для разрушения грамтрицательных клеток. Это подтверждается и данными литературы [4, 10]. Как свидетельствуют результаты некоторых авторов, стенки грамположительных бактерий достаточно трудно поддаются разрушению, по сравнению с клетками дрожжей и кишечной палочки, даже при воздействии ультразвуковых излучений мощностью до 750 ватт [7].

Нами были проведены модификации ультразвуковой дезинтеграции с целью ослабить прочность клеточной стенки путем двухсуточного выдерживания клеток в дистиллированной воде при 4 °С, при pH 8, с добавлением 4 % додецилсульфата натрия. Данные модификации

не способствовали эффективности дезинтеграции клеток. Также была построена кривая роста штамма *L. plantarum* 195D. Дезинтеграцию проводили на 6-й и 14-й час культивирования, что соответствует середине логарифмической фазы и стационарной фазе (рис. 2). Результаты световой и электронной микроскопии дезинтеграта существенно не отличались. В образце, полученном из культуры в логарифмической фазе роста, имелись единичные разрушенные клетки. Это может являться следствием того, что клеточные стенки в данной фазе роста менее прочные.

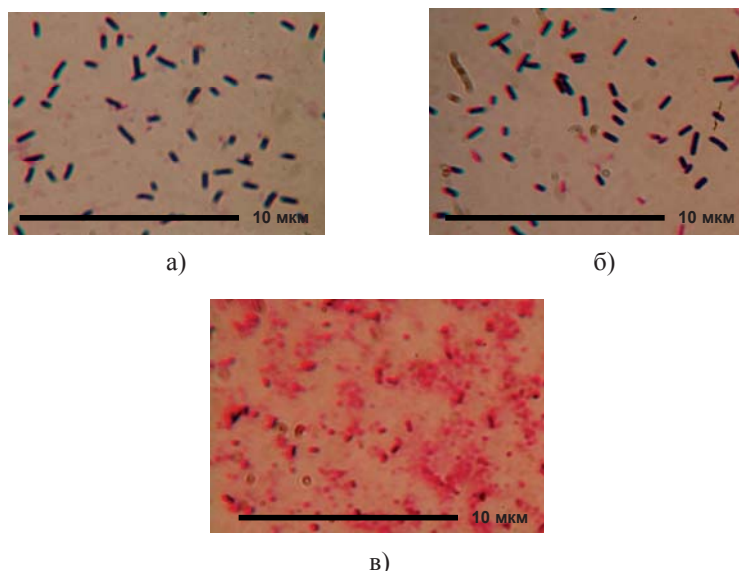


Рис. 1. Результаты разрушения клеток с помощью действия ультразвука (световая микроскопия)

- а) контроль, суспензия клеток *Lactobacillus plantarum* 195D до обработки ультразвуком,
- б) клетки *Lactobacillus plantarum* 195D после дезинтеграции на MSE 150 (15 мин),
- в) клетки *Lactobacillus plantarum* 195D после дезинтеграции на УЗД 500 (30 мин).

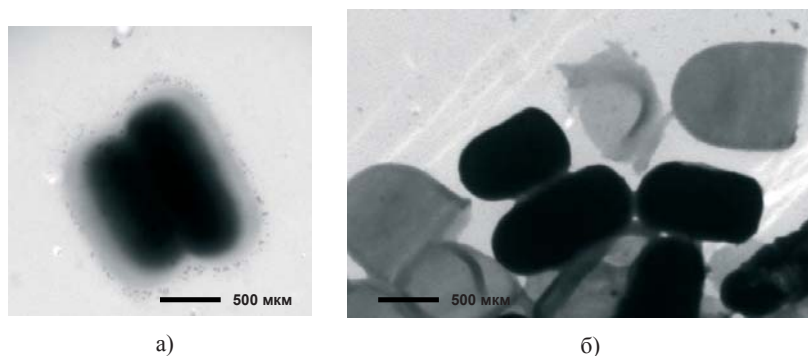


Рис. 2. Кривая роста *Lactobacillus plantarum* 195D

- 1 - середина логарифмической фазы роста бактериальной культуры;
- 2 - стационарная фаза роста бактериальной культуры.

С целью усиления разрушительного эффекта мы дополнили ультразвуковую дезинтеграцию баллистической путем добавления в бактериальную суспензию ( $5 \times 10^9$  КОЕ/мл) абразива оксида алюминия в одном случае, а в другом – микродисперсного порошка молибдена (в обоих случаях 10 г/л). Добавление оксида алюминия и действие ультразвука в течение

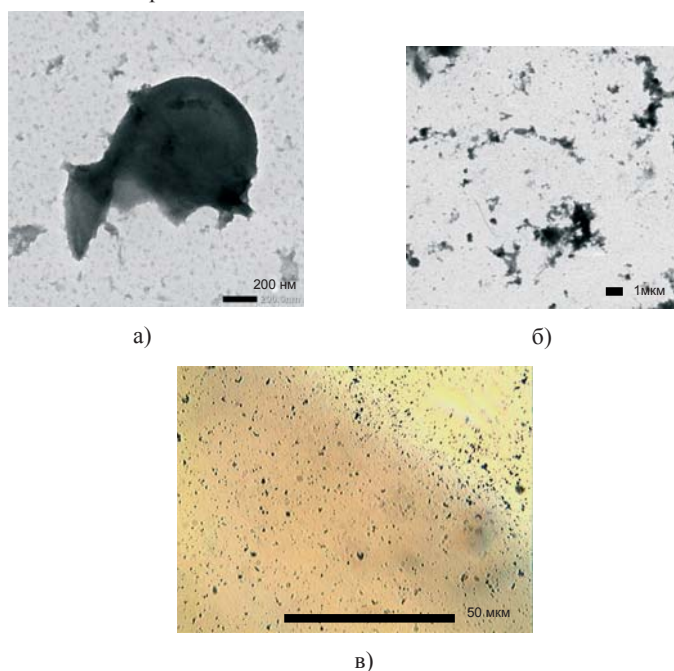
20 мин не принесло желаемого результата. Применение молибденовых частиц в течение того же времени тоже не привело к разрушению клеточных стенок, однако вызвало отделение бактериальных капсул (рис. 3).



**Рис. 3. Клетки *Lactobacillus plantarum* 11/16 УКМ В-2694**

а) контроль, б) после воздействия ультразвука на приборе УЗДН-А в течение 20 мин в присутствии микродисперсного порошка молибдена (электронная микроскопия).

Альтернативные способы применяемой нами дезинтеграции – замораживание – размораживание (5 циклов), растирание с измельченным стеклом, использование гомогенизатора Поттера не дали эффекта для получения фрагментов клеточных стенок. Однако шестикратное растирание в фарфоровой ступке бактериальной взвеси в жидком азоте позволило получить фрагменты клеток молочнокислых бактерий. Результаты электронной и световой микроскопии представлены на рис. 4.



**Рис. 4. Клетки *Lactobacillus plantarum* 195D, разрушенные путем растирания в жидком азоте: а), б) электронная микроскопия, в) световая микроскопия**

Жидкий азот с целью дезинтеграции биологических объектов используется в ботанике, биохимии, молекулярной биологии и других областях [13, 15]. Тем не менее, нами было найдено лишь несколько публикаций, где авторами применялся жидкий азот для получения дезинтеграта микробного происхождения. В одной из них авторы описывают сконструированный прибор для автоматизированного растирания клеток в жидком азоте [13]. Проблема

автоматизации процесса является одной из важнейших в вопросе дезинтеграции клеток. От данного аспекта во многом зависит стандартизация и воспроизводимость полученных в дальнейшем результатов. При отсутствии автоматизированного процесса невозможно говорить о получении количественных характеристик. С другой стороны, методика растирания в жидком азоте является технически простой и позволяет проводить изучение качественных характеристик. Кроме того, в данном случае жидкий азот ведет себя инертно по отношению к биохимической составляющей биологических объектов, вызывая лишь образование кристаллов внутриклеточной воды. Далее хладагент просто испаряется.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что наиболее приемлемыми методами для разрушения клеток молочнокислых бактерий с целью получения клеточных стенок, является использование жидкого азота и непрерывной ультразвуковой дезинтеграции в течение 30 мин на приборе УЗД-500.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Войчуку С.И. за помощь в проведении электронно-микроскопических исследований.

**О.П. Лівінська, Н.К. Коваленко, І.Л. Гармашева**

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ*

### **ДЕЗИНТЕГРАЦІЯ ЛАКТОБАЦИЛ І ЕНТЕРОКОКІВ З МЕТОЮ ОТРИМАННЯ ФРАГМЕНТІВ КЛІТИННИХ СТІНОК**

#### **Резюме**

Описано способи дезинтеграції грам-позитивних клітин молочнокислих бактерій з метою отримання фрагментів клітинних стінок для подальшого виділення тейхоевих кислот. Показано, що застосування ультразвукового дезинтегратора із частотою 22 кГц безперервно протягом 30 хв на дезинтеграторі УЗД-500 є оптимальним для дезинтеграції клітин лактобацил і ентерококів. Отримання фрагментів клітинних стінок досягається також при шестиразовому розтиранні клітин у рідкому азоті до повного його випаровування.

**Ключові слова:** клітинні стінки, молочнокислі бактерії, ультразвукова дезинтеграція.

**O.P.Livinska, N.K.Kovalenko, I.L.Garmasheva**

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

### **DISINTEGRATION OF LACTOBACILLI AND ENTEROCOCCI FOR OBTAINING CELL WALL FRAGMENTS**

#### **S u m m a r y**

The methods of Gram-positive cells disintegration to obtain cell wall fragments have been described. It has been shown that the use of ultrasonic disintegrator UZD-500 at the frequency 22 kHz during 30 min is optimal for disintegration of lactic acid bacteria cells. Also the ability to use grinding of cells in liquid nitrogen (6 times to the complete evaporation) for obtaining the cell wall fragments has been demonstrated.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** cell walls, lactic acid bacteria, ultrasonic disruption

**The author's address:** O.P.Livinska, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Езенчук Ю.В. Патогенность как функция биомолекул. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
2. Наумова И.Б., Шашков А.С., Строганова М.П. Тейхоевая кислота из клеточной стенки *Streptomyces capatyceticus* RIA 690 и применение спектроскопии С-ЯМР для локализации фосфодиэфирной связи в цепи // Биоорг. хим. – 1978. – 4, № 11. – С. 1529–1537.
3. Позур В.К., Сенчило Н.В., Пасічник І.П. Тейхоеві кислоти бактерій та їхні біологічні властивості // Біополімери и клетка. – 2000. – 16, № 4. – С. 260–269.
4. Шапхаев Э.Г., Цыранов В.Ж., Чибунина Е.И. Дезинтеграция микробных клеток: Учебное пособие. – Улан-Удэ: ВГСТУ, 2001. – 96 с.

5. *Ambrosini V., Gonzalez S., Perdigon G., Holgado A.* Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species // *Chem. Pharm. Bull.* – 1996. – **44**(12). – P. 2263-2267.
6. *Ananta E., Voigt D., Zenker M. et al.* Cellular injuries upon exposure of *Escherichia coli* and *Lactobacillus rhamnosus* to high-intensity ultrasound // *J. of Appl. Microbiol.* – 2005. – **99**. – P. 271–278.
7. *Cameron M., McMaster L. D., Britz T. J.* Electron microscopic analysis of dairy microbes inactivated by ultrasound // *Ultrason. Sonochem.* – 2008. – **15**. – P. 960–964.
8. *Clarke P. R., Hill C. R.* Physical and chemical aspects of ultrasonic disruption of cells // *J. Acoust. Soc. Am.* – 1970. – **47** – P. 649-653.
9. *De Man J.D., Rogosa M., Sharpe M.E.* A medium for the cultivation of lactobacilli // *J. Appl. Bact.* – 1960. – **23**. – P. 130-135
10. *Kelemen M. V.* Controlled cell disruption: a comparison of the forced required to disrupt different microorganisms // *J. Cell Sci.* – 1979. – **35** – P. 431-441.
11. *Mukai T. Y., Onose Y., Toba T., Itoh T.* Presence of glycerol teichoic acid in the cell wall of *Lactobacillus* // *Letters in Appl. Microbiol.* – 1992. – **15**. – P. 29-31.
12. *Schleifer K. H., Kandler O.* Zur chemischen Zusammensetzung der zellwand der streptokokken // *Arch. für Mikrobiol.* – 1968. – **61**. – S. 292-301.
13. *Smucker R. A., Pfister R. M.* Liquid nitrogen crio-impacting: a new concept of cell disruption // *J. Appl. Microbiol.* – 1975. – Sept. – P. 445-449.
14. *Swoboda J., Campbell J., Timothy J.* Wall teichoic acid function, biosynthesis and inhibition // *ChemBioChem.* – 2010. – **11**. – P. 35–45.
15. *Volosiouk T, Robb J, Ross N.* Direct DNA extraction for direct PCR-mediated assays of soil organisms // *J. Applied and Environmental Microbiology.* – 1995. – Nov. – P. 3972-3976.

Отримано 14.04.2010