

СОХРАННОСТЬ КЛЕТОК МИКРООРГАНИЗМОВ ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ В АГАРОЗНОМ ГЕЛЕ

Е.А. Дубровина

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина

В связи с развитием современных биотехнологических производств возрос интерес к проблеме иммобилизации клеток микроорганизмов. Иммобилизованные клетки микроорганизмов-продуцентов биологически активных веществ имеют ряд преимуществ в технологических процессах перед свободными клетками – более высокую продуктивность, экономичность, биологическую безопасность, чистоту конечного продукта и др.

При формировании рецепторного элемента биосенсора используют разные методы иммобилизации. Поскольку микроорганизмы и бактерии чувствительны к изменениям окружающей среды, для их иммобилизации используют преимущественно мягкие методы, такие как включение в гель или физическую адсорбцию. Иммобилизация клеток микроорганизмов в гелях обеспечивает равномерное распределение биомассы в объеме носителя. Большинство гелевых матриц обладает высокой механической, химической, тепловой и биологической стойкостью и обеспечивает возможность многократного использования фермента, включенного в его структуру.

Целью данного исследования являлось подготовка микроорганизмов к иммобилизации в агарозе. В работе были использованы штаммы *Saccharomyces cerevisiae* ONY 422, *Pseudomonas aeruginosa* ONY 211, *Bacillus subtilis* ONY 24 из Коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии ОНУ им. И.И. Мечникова. Клетки бактерий и дрожжей выращивали на богатой питательной среде Лурия-Бертани, содержащей: пептон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 5 г/л. Клетки выращивали аэробно 18–20 часов при температуре 29°C, 120 об/мин. Затем полученную биомассу центрифугировали при комнатной температуре при 11000 об/мин в течении 10 минут. Далее центрифугат дважды промывали 20 мМ фосфатным буфером (рН 6,8). Промытую и ресуспензировавшую в буфере биомассу хранили в микропробирках при +4 °С.

Титр подготовленных таким образом клеток составил: *Saccharomyces cerevisiae* ONY 422 – $1,4 \times 10^7$ КОЕ/мл, *Pseudomonas aeruginosa* ONY 211 – $1,2 \times 10^7$ КОЕ/мл, *Bacillus subtilis* ONY 24 - 1×10^7 КОЕ/мл.

Клетки штаммов после хранения снова аэробно выращивали на богатой питательной среде при температуре 29°C, аэрации 120 об/мин, 18–20 часов. После чего также определяли титр: *Saccharomyces cerevisiae* ONY 422 – 4×10^8 КОЕ/мл, *Pseudomonas aeruginosa* ONY 211 - 6×10^8 КОЕ/мл, *Bacillus subtilis* ONY 24 - 4×10^8 КОЕ/мл.

Выращенные клетки микроорганизмов непосредственно перед иммобилизацией центрифугировали 10 мин при 11000 об/мин. Биомассу дважды промывали фосфатным буфером (20 мМ, рН 6,8). Затем полученный осадок ресуспензироваляли в 600 мкл буфера. Для иммобилизации применяли 2% агарозу. Затем клеточную суспензию смешивали с 5 мл агарозы и переносили в стерильные пенициллиновые флаконы. Гели с клетками микроорганизмов застывали при температуре +4°C, после чего дважды промывались буфером. Для проверки жизнеспособности клеток после иммобилизации снова определяли титр иммобилизованных клеток: *Saccharomyces cerevisiae* ONY 422 – $8,6 \times 10^5$ КОЕ/мл, *Pseudomonas aeruginosa* ONY 211 - 1×10^7 КОЕ/мл, *Bacillus subtilis* ONY 24 – $1,4 \times 10^5$ КОЕ/мл. Образцы помещались на хранение при +4°C и +30°C.

Способ иммобилизации является одним из факторов, который влияет на специфичность биорецепторного элемента. Было установлено, что иммобилизация в агарозном геле не

приводит к значительной гибели клеток. По итогам эксперимента было определено, что наибольшее количество жизнеспособных клеток обнаружено у *Pseudomonas aeruginosa* ONY 211 – 83%. Это говорит о высокой долговременной устойчивости рецепторных элементов на основе этой культуры. Наиболее низкая выживаемость была установлена у *Saccharomyces cerevisiae* ONY 422 – 2,15% и *Bacillus subtilis* ONY 24 – 0,035%. В рецепторных элементах цельноклеточных сенсоров применяются не только бактерии, но и дрожжи, которые также проявляют высокую стабильность и выживаемость.