

обрабатываемых водных растворов - 5 мл. О степени деструкции азотистых оснований и их производных судили по электронным спектрам поглощения, полученным на спектрофотометре SPECORD M-40 в диапазоне 50000 см^{-1} - 33000 см^{-1} .

Для удобства сравнения степени деструкции озонем четырех оснований между собой оптические плотности обработанных растворов, полученные в области максимального поглощения, были нормированы по отношению к оптическим плотностям контрольных (необработанных) образцов. В результате получены кривые, позволяющие сравнивать основания по чувствительности к обработке озонем в одинаковых условиях озонлиза.

Установлено, что оптическая плотность растворов всех 4-х оснований (аденина, гуанина, урацила и цитозина) снижается в линейной зависимости от дозы воздействия (для гуанина, имеющего 2 максимума поглощения, отдельно рассчитывали показатели для двух длин волн). На основании углов наклона кривых, отражающих снижение поглощения по мере увеличения дозы воздействия, можно заключить, что азотистые основания по-разному чувствительны к озону, и их чувствительность возрастает в ряду аденин→урацил→цитозин→гуанин.

Ранее показано, что у разных производных азотистых оснований по мере усложнения химической организации (наличие остатка дезоксирибозы, фосфорилирования нуклеозидов) деструктивный процесс происходит неодинаковым образом [2]. В условиях наших экспериментов наибольшую чувствительность к озону проявляли нуклеозидмоно-фосфаты, несколько менее подвержены деструкции нуклеозид-трифосфаты и наиболее устойчивы полинуклеотиды. Существенной разницы в деструкции оснований и нуклеозидов при озонлизе их водных растворов не обнаружено.

Литература

1. Сьонг Ч., Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Мутагенный эффект озона в системе *Escherichia coli* K-12. // Вестн. Белорусского ун-та. Серия II. -1982. -№ 3. -С. 32-36.
2. Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Действие озона на бактериофаги в системе фаг - клетка хозяин. // Микробиология. -Т 59. -С. 832-836.
3. Coslow S., Oishi M. Genetic transformation in *Escherichia coli* K-12 // Proc. Nat. Acad. Sci, USA. -1973. -V. 70. N1. -P. 84-87.
4. Дебабов В.Г., Лившиц В.А. Современные методы создания промышленных штаммов микроорганизмов. - 1988. -М.: Высшая школа.
5. Бреслер С.Е. Молекулярная биология. -1973. -Л.: Наука.
6. Shinriki N. et al. Degradation of yeast RNA, yeast phenylalanin tRNA and tobacco mosaic virus RNA // Biochem. Biophys. Acta. -1981.-V. 655.-P. 323-328.
7. Герасимова Л.К. и др. Действие озона на нуклеиновые кислоты // Вестник Белорусского ун-та. Серия 2. Химия. Биология. География. -1984. -№ 1. -С. 32-35.

УДК 579.253:575.224

ПОВРЕЖДАЕМОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН У *E. COLI* И *B. SUBTILIS* ПРИ ОБРАБОТКЕ ОЗОНОМ В РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ

Гриц Н.В., Фомичев А.Ю.

Белорусский государственный технологический университет (кафедра биотехнологии и биоэкологии), Минск, РБ

Белорусский государственный университет (кафедра биофизики), Минск, РБ

Широкое использование озона для обеззараживания питьевой и сточных вод, для сохранения качества и увеличения сроков хранения сельскохозяйственной продукции определяет необходимость детального изучения механизмов его действия на биологические объекты, наиболее удобными среди которых являются микроорганизмы. К настоящему времени доказана ДНК-тропность озона [1-3], идентифицированы клеточные структуры и отдельные процессы метаболизма, повреждающиеся под действием O_3 [4,5], определены генетические детерминанты, ответственные за чувствительность клеток микроорганизмов к действию данного агента [6,7]. Вместе с тем, недостаточная полнота и известная противоречивость накопленных экспериментальных данных диктуют необходимость в проведении дополнительных исследований последствий озонирования микробиологических объектов.

В данной работе стояла цель изучить на модели грамотрицательных (*E. coli*) и грамположительных (*B. subtilis*) бактерий повреждаемость их ригидной клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, подвергающихся воздействию молекул O_3 раньше других структур клетки, при разных условиях проведения озонлиза.

Обработку озонем осуществляли путем барботаж образцов в объеме 5 мл озонированным воздухом в течение разных промежутков времени. Концентрация O_3 составляла 5 мг/л воздуха, режим барботирования - 0,1 л/мин.

Одним из традиционных критериев оценки степени повреждающего действия внешнего фактора на бактерии является выживаемость обработанных клеток, регистрируемая по колониеобразующей способности по-

сле высева на агаризованную питательную среду. С другой стороны, выживаемость микроорганизмов, подвергнутых обработке некоторыми агентами, зависит от состава среды, в которой производится обработка. Исходя из этого, для оценки степени чувствительности бактерий *E.coli* и *B.subtilis* к озону первоначально было проведено определение жизнеспособности (по колониеобразованию) после обработки в средах различного химического состава: 1) в жидкой питательной среде, богатой органическими и неорганическими компонентами; 2) в фосфатном буфере, содержащем только неорганические компоненты и 3) в дистиллированной воде, лишенной как органических, так и неорганических примесей. Принимая во внимание экспериментально установленную зависимость степени инактивации озонем микробиологических объектов от их исходной концентрации в реакционной среде, с целью стандартизации условий эксперимента все исследования проводили с бактериями в логарифмической фазе роста, нормируя концентрацию клеток до практически одинаковой величины (примерно 1×10^8 кл/мл) по оптической плотности суспензии.

В результате проведенных исследований установлено, что снижающее жизнеспособность клеток действие озона проявляется в максимальной степени в условиях обработки в дистиллированной воде и в минимальной степени - в условиях обработки в жидкой питательной среде. Независимо от среды, в которой в момент воздействия O_3 находились микроорганизмы, жизнеспособность бактерий *B.subtilis* W23 была значительно выше жизнеспособности бактерий *E.coli* K12 AB1157.

Известно, что одной из причин снижения выживаемости обработанных O_3 бактериальных культур является разрушение (лизис) клеток, что экспериментально может регистрироваться по уменьшению оптической плотности суспензий (как, например, в случае фаголизиса).

Проводимое нами параллельно с определением выживаемости клеток измерение оптической плотности обрабатываемых суспензий показало, что разрушение бактерий происходит наиболее эффективно при обработке озонем в фосфатном буфере, причем, клетки *E.coli* подвержены лизису в значительно большей степени, чем клетки *B.subtilis* (прямое подтверждение лизиса бактерий было получено микроскопированием препаратов интактных и обработанных O_3 клеток). В дистиллированной воде обработанные бактерии обоих штаммов характеризовались неизменной величиной оптической плотности суспензий, т.е. практически не разрушались на протяжении всего времени наблюдения, хотя, как уже было отмечено, у них резко падала колониеобразующая способность. При обработке в жидкой питательной среде как число способных формировать колонии бактерий, так и число неразрушенных клеток всегда намного больше, чем в случае обработки в фосфатном буфере. Повидимому, органические компоненты аминокислотной среды защищают бактериальные клетки от губительного действия озона, вступая с последним в химические реакции и тем самым, нейтрализуя значительное количество молекул O_3 и индуцированных ими радикалов.

С целью выяснения причин интенсивного разрушения обработанных озонем в фосфатном буфере бактерий, были проведены эксперименты, в которых перед обработкой O_3 вслед за центрифугированием клетки ресуспендировали соответственно дистиллированной водой, фосфатным буфером и физиологическим раствором с разными значениями pH (5, 7, 9). В результате было установлено, что подкисление до pH 5 и подщелачивание до pH 9 дистиллированной воды не приводит к изменению оптической плотности обработанных разное время суспензий бактерий. Интенсивность разрушения в солевых средах оказалась примерно одинаковой как в многокомпонентном фосфатном буфере, так и в однокомпонентном физиологическом растворе.

На основании полученных результатов было сделано предположение, что основной причиной, способствующей разрушению клеточной стенки у обработанных O_3 бактерий, являются не сами по себе используемые реактивы солей, а, возможно, присутствующие в них в виде примесей двухвалентные металлы (в частности, железо), которые, как известно, оказывают существенное влияние на окислительные процессы [8]. С целью проверки высказанного предположения были проведены эксперименты в двух вариантах. Во-первых, к ресуспендированным дистиллированной водой бактериям *E.coli* добавляли в разных концентрациях ионы Fe^{2+} (в виде раствора $FeSO_4$) и после обработки озонем измеряли оптическую плотность суспензии. Во-вторых, к бактериям, ресуспендированным фосфатным буфером, перед обработкой добавляли ЭДТА, который, как известно, эффективно связывает в растворе катионы двухвалентных металлов.

Если высказанное предположение справедливо, то в первом варианте должно при внесении катионов железа должно было стимулироваться разрушение бактерий, а во втором варианте (в фосфатном буфере) внесение ЭДТА должно было либо предотвращать полностью, либо в значительной степени уменьшить лизис клеток. При экспериментальной проверке и в первом и во втором вариантах были получены ожидаемые результаты (табл.). Причем, в дистиллированной воде лизис подвергнутых обработке бактерий осуществляется при добавлении Fe^{2+} в тех микроколичествах, в которых железо присутствует в качестве примесей солей в фосфатном буфере, или в физиологическом растворе (10^{-5} - 10^{-6} М).

Табл. Оптическая плотность суспензий бактерий при обработке O_3 в концентрации 5 мг/л в присутствии катионов Fe^{2+} и ЭДТА

Вариант	Условия эксперимента	Оптическая плотность
I	1. Интактная культура в дистиллированной воде	0,30
	2. Обработка озонем в дистиллированной воде	0,30

Вариант	Условия эксперимента	Оптическая плотность
I	3. Обработка озоном в дистиллированной воде после добавления 10^{-7} М Fe ²⁺	0,27
	4. Обработка озоном в дистиллированной воде после добавления 10^{-5} М Fe ²⁺	0,10
	5. Обработка озоном в дистиллированной воде после добавления 10^{-5} М Fe ²⁺ и 0,1 М ЭДТА	0,30
II	1. Интактная культура в фосфатном буфере	0,41
	2. Обработка озоном в буфере	0,15
	3. Обработка озоном в буфере после добавления 0,01 М ЭДТА	0,18
	4. Обработка озоном в буфере после добавления 0,1 М ЭДТА	0,38

Как уже отмечалось, при обработке озоном ресуспендированных дистиллированной водой бактерий не наблюдается разрушения их клеточных стенок, приводящего к осветлению суспензии, однако происходит интенсивная инактивация обработанных особей, регистрируемая по утрате ими колониеобразующей способности. По-видимому, в данных условиях воздействия в основе инактивирующего механизма озона лежат повреждения иного плана, в том числе возможно и структурно-функциональные нарушения цитоплазматической мембраны. Одним из подходов к ответу на данный вопрос могут быть эксперименты по регистрации образования обработанными разными дозами озона бактериями одного из конечных продуктов перекисного окисления липидов - малонового диальдегида (МДА). Факт резкого увеличения концентрации МДА после воздействия O₃ на бактерии дает основания говорить об окислении мембранных фосфолипидов и, следовательно, о структурно-функциональных нарушениях клеточных мембран. В эксперименте установлено, что концентрация МДА действительно возрастает при увеличении дозы озона, однако наблюдаются различия в количестве образующего МДА при обработке равными дозами O₃ грамотрицательных (*E.coli*) и грамположительных (*B.subtilis*) бактерий, особенно при обработке озоном в дистиллированной воде.

Таким образом, к числу основных причин, обуславливающих гибель бактерий *E.coli* и *B.subtilis* под воздействием озона относятся такие, как разрушение ригидной клеточной стенки и нарушение структурно-функционального состояния цитоплазматической мембраны.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hamelin C., Chung Y.S. Optimal conditions for mutagenesis by ozone in *E.coli* K12 // *Mutat. Res.* - 1974. - V. 24. N 3. - P. 271-279.
2. L'Herauld P., Chung Y.S. Mutageni of ozone in different repair-deficient strains of *E.coli* // *Mol. Gen. Genet.* - 1984. - V.197. N 3. -P. 472-477.
3. Гриц Н.В., Фомичев А.Ю. Действие озона на бактериофаги и системе фаг - клетка-хозяин // *Микробиология.* - 1990. - Т. 59. №5. - С. 831-836.
4. Hamelin C., Sarhan F., Chung Y.S. Ozone-induced DNA degradation in different DNA polymerase I mutants of *E.coli* K12 // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1977. - V.77. N 1. - P. 220-224.
5. Конев С.В., Матус В.К., Мельникова А.М., Руденок А.Н. Действие озона на мембранозависимые функции дрожжевых клеток *Candida utilis* // *Микробиология.* - 1982. - Т. 51. № 2. - С. 220-223.
6. Hamelin C., Chung Y.S. Role of the pol, rec and dna gene products in the repair of lesions produced in *E.coli* DNA by ozone // *Studia Biophys.* - 1978. - V.68. N 3. - P. 229-235.
7. Poliquin L., Hamelin C., Chung Y.S. Isolation and characterisation of mutants sensibles ou resistants a l'ozone chez *Escherichia coli* B // *Can. J. Genet. Cytol.* - 1982. - V.24. N 5. - P. 593-600.
8. Эмануэль Н.М., Кнорре Д.Т. Курс химической кинетики. М.: Высшая школа. - 1984.