

Н. М. Михейчик, инженер; А. В. Игнатенко, доцент

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ КСЕНОБИОТИКОВ НА РОСТОВУЮ И БИОХИМИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК БАКТЕРИЙ

The purpose of work was the analysis of growth and biochemical activity of cells at presence of xenobiotic as which of inorganic substances salts of heavy metals were used, from organic – guanidine derivatives. The growth estimation and biochemical activity of cells was carried out by spectrophotometry method on two lengths of waves of supervision. It was shown that application of light absorption and scattering may be used for simultaneous studying of physiological and biochemical activities of microorganisms under influence of xenobiotics. Biochemical activity eventually changes more quickly, than growth, therefore its use will allow to reduce time of the analysis in 2–3 times.

Введение. В настоящее время для подавления роста нежелательной микрофлоры используются различные биоцидные вещества. Они применяются в сельском хозяйстве для предупреждения порчи сырья, в пищевой промышленности для защиты продуктов питания от негативного влияния микроорганизмов в процессе производства, в различных защитных покрытиях. Они играют важную роль в обеспечении экологической безопасности окружающей среды и подавлении потенциально патогенных и эпидемиологически опасных микроорганизмов, содержащихся в сточных водах медицинских учреждений [1–3].

Одним из перспективных классов биоцидных препаратов являются полигуанидины. Они проявляют бактерицидное, фунгицидное, вируцидное действие по отношению ко многим патогенным микроорганизмам и их спорам. В отличие от хлорсодержащих дезинфектантов, полигуанидины малотоксичны для человека и животных, не агрессивны ко всем видам материалов и длительное время сохраняют антисептические свойства [3, 4].

Практическое применение антимикробных веществ требует проведения большого количества анализов для проверки их эффективности. Для этого должны использоваться простые и эффективные экспресс-методы контроля действия данных веществ на ростовую и биохимическую активность клеток микроорганизмов. Метод оценки мутности является одним из удобных, быстрых и доступных способов контроля численности микроорганизмов в водных средах и оценки их морфологических характеристик [5]. Изучение изменения мутности водных сред использовалось также для характеристики внешних воздействий на микроорганизмы [6].

Основным показателем жизнеспособности и состояния микроорганизмов является способность клеток к размножению. Но в ряде случаев клетки могут терять свойство размножаться, сохраняя биохимическую активность и жизнеспособность. В этом

случае наряду с ростовой активностью микроорганизмов требуется оценивать и их биохимическую активность.

Целью работы являлся анализ ростовой и биохимической активности клеток микроорганизмов в присутствии ксенобиотиков.

Основная часть. В качестве неорганических ксенобиотиков служили соли тяжелых металлов (х. ч.): $\text{Cd}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, CuSO_4 , $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, из органических ксенобиотиков использовали производные гуанидинов: полигексаметиленгуанидин гидрохлорид, фосфит, цитрат, синтезированные в институте химии новых материалов НАН Беларуси.

В работе использовали чистые культуры клеток бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Clostridium*, *Bacillus micoides*, *Bacillus subtilis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ.

Суточные культуры анализируемых бактерий разводили в физиологическом растворе (ФР) и высевали последние разведения на чашки с агаризованной питательной средой. Бактерии культивировали в течение 3 сут при температуре 30°C и затем подсчитывали концентрации клеток [7].

Для приготовления рабочей суспензии клеток суточную культуру разводили в 100 раз и оставляли в термостате при 30°C на 2 ч, для перевода микроорганизмов в логарифмическую фазу роста. Затем суспензию клеток использовали для изучения влияния на них ксенобиотиков.

Оценку ростовой и биохимической активности клеток бактерий проводили спектрофотометрическим методом на двух длинах волн наблюдения. Измерения проводили в образцах объемом 3 мл, содержащих по 1 мл суспензии клеток, раствора ксенобиотика и раствора красителя метиленового синего (МС). Спектры поглощения и мутности измеряли на спектрофотометре СФ-16 в диапазоне длин волн от 370 до 750 нм.

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

На рис. 1 представлены спектры поглощения и мутности красителя МС и суспензии клеток бактерий *Bacillus subtilis*.

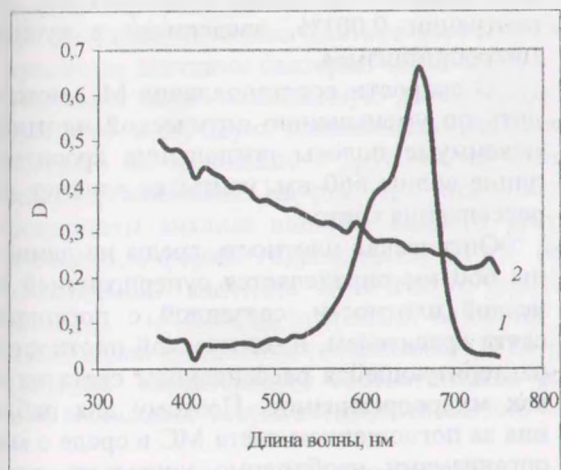


Рис. 1. Спектры поглощения: 1 – красителя метиленового синего; 2 – суспензии клеток бактерий *Bacillus subtilis*

Как видно из рис. 1, в области длин волн 400–750 нм отсутствуют видимые полосы поглощения и регистрируемое изменение оптической плотности клеточных суспензий от длины волны характеризуется светорассеиванием клеток.

В спектре поглощения красителя наблюдается полоса с максимумом 660 нм, обусловленная поглощением мономерной формы МС, и плечо с максимумом 540 нм, которое относится, по-видимому, к димерной форме красителя. В области длин волн 400–500 нм наблюдается минимум полосы поглощения красителя.

На длинах волн от 730 нм и выше поглощение красителя не влияет на светорассеяние клеток, и эта область может быть использована для наблюдения за изменением численности микроорганизмов.

Для установления связи между численностью микроорганизмов и оптической плотностью суспензии клеток на длине волны 730 нм (D_{730}) проводили культивирование бактерий рода *Clostridium* в ПБ при температуре 30°C. Периодически через каждые 30 мин измеряли D_{730} и параллельно отбирали по 0,1 мл суспензии клеток, из которых делали разведения и высевали на плотную агаризованную среду с последующим подсчетом количества выросших колоний клеток.

На рис. 2, 3 приведены кинетические зависимости изменения численности клеток бактерий рода *Clostridium* и оптической плотности среды D_{730} при культивировании микроорганизмов в ПБ.

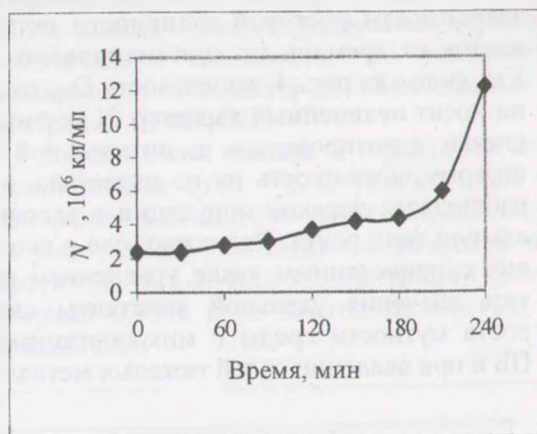


Рис. 2. Кинетика изменения численности микроорганизмов *Clostridium* при культивировании клеток в ПБ при $T = 30^\circ\text{C}$ (по данным метода отбора и посева клеток на поверхность питательного агара)

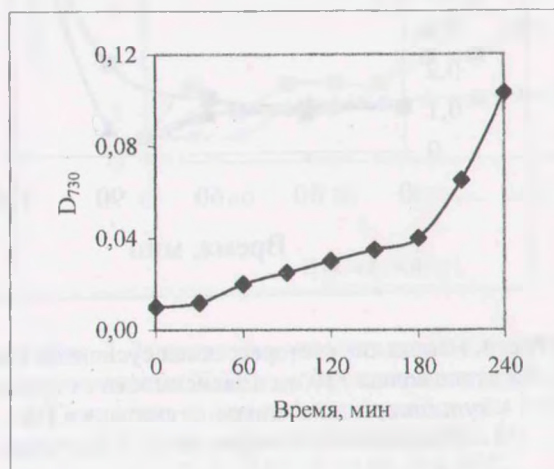


Рис. 3. Кинетика изменения оптической плотности D_{730} суспензии клеток *Clostridium* при культивировании микроорганизмов в ПБ при $T = 30^\circ\text{C}$

Как видно из приведенных на рис. 2, 3 данных, изменение количества клеток, полученное методом посева микроорганизмов на агаризованную питательную среду, хорошо коррелирует с данными по изменению светорассеивания клеток. Это позволяет использовать рассмотренный показатель для наблюдения за ростовой активностью микроорганизмов. При этом длительность измерений ростовой активности клеток уменьшается с нескольких суток до нескольких часов и значительно снижается трудоемкость анализов.

Скорость размножения клеток характеризовали удельной константой скорости изменения мутности среды (k):

$$k = dr / (r \cdot dt),$$

где r – мутность среды.

На рис. 4 приведены результаты изучения зависимости ростовой активности популяции клеток от времени их культивирования в ПБ. Как видно из рис. 4, зависимость D_{730} от времени носит нелинейный характер. В течение 1,0 ч клетки адаптировались к питательной среде, поэтому численность их не нарастала, а затем наблюдался переход популяции в экспоненциальную фазу роста. Это позволило в соответствии с приведенным выше уравнением рассчитать значения удельной константы скорости роста мутности среды с микроорганизмами в ПБ и при введении солей тяжелых металлов.

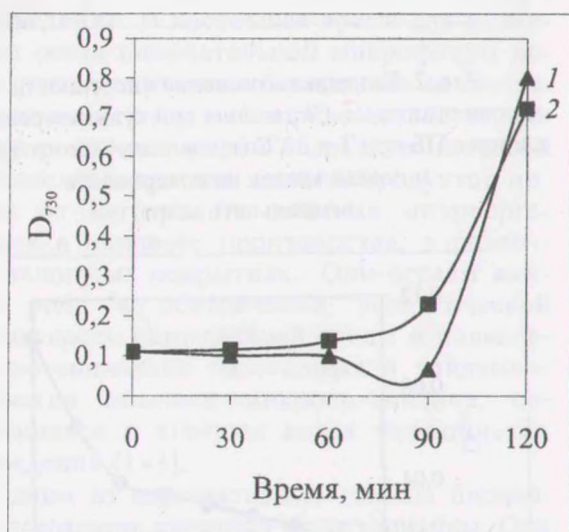


Рис. 4. Изменение светорассеяния суспензии клеток на длине волны 730 нм в зависимости от времени культивирования микроорганизмов в ПБ: 1 – *Pseudomonas aeruginosa*; 2 – *Clostridium*

В табл. 1 приведены значения, полученные в опытах без ксенобиотиков и при добавлении в исследуемые суспензии ионов кадмия в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М. В присутствии тяжелых металлов удельная ростовая активность клеток снизилась в 2–5 раз по сравнению с контрольными образцами.

Как видно из табл. 1, спорообразующие бактерии рода *Clostridium* обладали наибольшей ростовой активностью и высокой чувствительностью к ионам кадмия.

Таблица 1

Изменение удельной константы скорости роста мутности среды с микроорганизмами в присутствии ионов Cd^{2+}

Микроорганизмы	$k, ч^{-1}$	
	0	$2 \cdot 10^{-6}$ М
<i>Bacillus micoides</i>	$0,32 \pm 0,15$	$0,06 \pm 0,02$
<i>Clostridium</i>	$0,43 \pm 0,10$	$0,09 \pm 0,02$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$0,23 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,03$

Для изучения влияния ксенобиотиков на биохимическую активность микроорганизмов использовали способность клеток восстанавливать окисленную форму красителя МС в концентрации 0,001%, введенного в суспензию микроорганизмов.

О скорости восстановления МС можно судить по уменьшению оптической плотности в максимуме полосы поглощения красителя на длине волны 660 нм, учитывая влияние светорассеивания клеток.

Оптическая плотность среды на длине волны 660 нм определяется суперпозицией оптической плотности, связанной с поглощением света красителем, и оптической плотности, характеризующейся рассеиванием света на клетках микроорганизмов. Поэтому для наблюдения за поглощением света МС в среде с микроорганизмами необходимо учитывать влияние эффекта светорассеивания клеток на спектр поглощения красителя.

В данной работе использовали один из способов устранения влияния мутности среды на спектры поглощения хромофоров, предложенный в [5].

На рис. 5 приведены результаты анализа биохимической активности изученных микроорганизмов с учетом поправок на светорассеивание клеток.

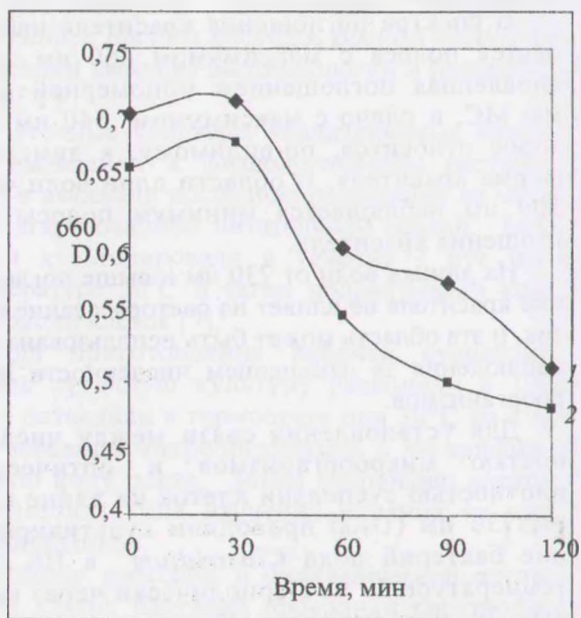


Рис. 5. Изменение оптической плотности суспензии клеток ($N = 10^6$ кл./мл) с красителем МС на длине волны 660 нм для клеток: 1 – *Pseudomonas aeruginosa*; 2 – *Clostridium*

Как видно из полученных данных (рис. 5), обесцвечивание красителя отмечается после 30 мин адаптации клеток к новым условиям среды, в то время как ростовая активность микроорганизмов еще не регистрируется (см. рис. 4).

Наибольшую скорость обесцвечивания красителя проявляли клетки бактерий рода *Clostridium*.

Так как редуцтанная активность микроорганизмов отражает состояние их энергетического метаболизма, то более быстрое восстановление красителя клетками бактерий *Clostridium* может указывать на их повышенную дыхательную активность и лучшую способность накапливать энергию по сравнению с другими изученными микроорганизмами. На рис. 6, 7 представлены результаты анализа влияния водного раствора очищенной формы гидрохлорида ПГМГ на относительные значения оптической плотности $(D/D_0)_{730}$ и $(D/D_0)_{660}$ суспензии бактерий рода *Clostridium*. Изменение показателей $(D/D_0)_{730}$ и $(D/D_0)_{660}$ характеризует соответственно ростовую и биохимическую активности клеток.

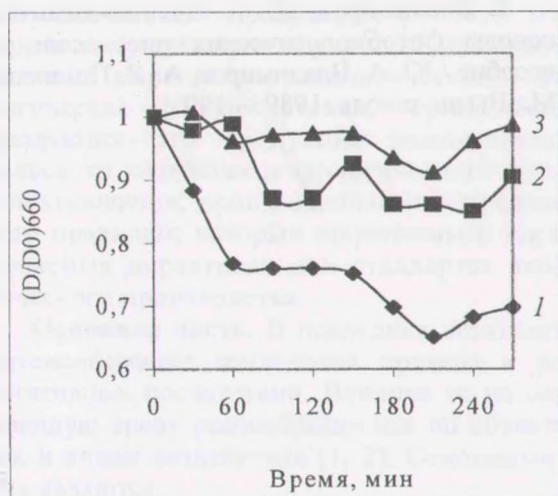


Рис. 6. Зависимость относительной оптической плотности $(D/D_0)_{660}$ суспензии бактерий рода *Clostridium* от времени культивирования клеток при концентрациях ПГМГ-НС1, %: 1 – 0; 2 – 0,01; 3 – 0,03. $T = 30^\circ\text{C}$

Как видно из рис. 6, в контрольном образце значение оптической плотности $(D/D_0)_{660}$ падает, что указывает на обесцвечивание красителя МС ферментами биохимически активных клеток. При добавлении в среду очищенной формы гидрохлорида ПГМГ в концентрации 0,01% оптическая плотность падает значительно медленнее, т. е. биохимическая активность клеток

подавляется. При концентрации ПГМГ-НС1 0,03% клетки бактерий полностью теряют метаболическую активность, что указывает на бактерицидный характер действия данных концентраций ПГМГ-НС1.

То же можно сказать и о ростовой активности клеток (рис. 7). С увеличением концентрации биоцидного вещества наблюдается уменьшение изменения оптической плотности $(D/D_0)_{730}$. При концентрации биоцида в среде 0,03% рост клеток полностью прекращается.

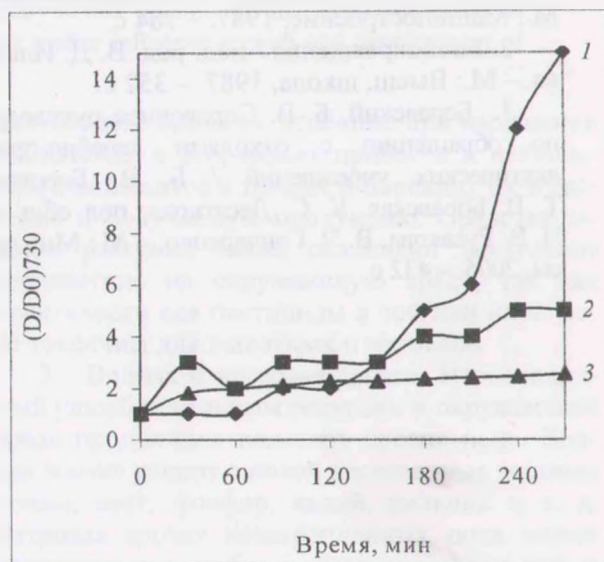


Рис. 7. Зависимость относительной оптической плотности $(D/D_0)_{730}$ суспензии бактерий рода *Clostridium* от времени культивирования клеток при концентрациях ПГМГ-НС1, %: 1 – 0; 2 – 0,01; 3 – 0,03. $T = 30^\circ\text{C}$

В табл. 2 представлена характеристика относительной скорости обесцвечивания красителя в среде при добавлении биоцидов в концентрации 0,03%. Численные значения относительной скорости обесцвечивания находили как тангенс угла наклона логарифмических кривых зависимости $(D/D_0)_{660}$ от времени. Как видно из полученных данных, при добавлении полигуанидинов биохимическая активность клеток бактерий значительно снижается по сравнению с опытом без биоцидов.

Таблица 2

Характеристика относительной скорости обесцвечивания красителя МС микроорганизмами в присутствии ксенобиотиков

Биоциды	Относительная скорость обесцвечивания красителя МС $v, \text{ч}^{-1}$		
	<i>E. coli</i> j53	<i>Clostridium</i>	<i>B. subtilis</i>
Контроль	-0,18	-0,11	-0,06
Cd^{2+}	-	-0,0002	-0,0001
Цитрат ПГМГ	-0,0003	-0,006	-0,0005
Гидрохлорид ПГМГ	-	-0,0025	-

Заключение. При сравнительном анализе ростовой и биохимической активности микроорганизмов (рис. 6, 7) видно, что редуцтанная активность клеток изменяется быстрее, чем их ростовая активность. В случае оценки действия ксенобиотиков на микроорганизмы это позволяет сократить длительность анализа в 2–3 раза, а также выявлять жизнеспособные клетки, потерявшие способность размножаться.

Литература

1. Защита от коррозии, старения и биоповреждений машин, оборудования и сооружений: справочник / под ред. А. А. Герасименко. – М.: Машиностроение, 1987. – 784 с.

2. Биоповреждения / под ред. В. Д. Ильичева. – М.: Высш. школа, 1987. – 352 с.

3. Боравский, Б. В. Справочное руководство по обращению с отходами лечебно-профилактических учреждений / Б. В. Боравский, Т. В. Боравская, К. С. Десяткова; под общ. ред. Н. В. Русакова, В. Л. Гончаренко. – М.: Мир прессы, 2006. – 432 с.

4. Химические средства дезинфекции и деcontаминации, применяемые и разрабатываемые для ликвидации последствий биологического заражения / В. П. Никольская [и др.] // Вестник Рос. акад. мед. наук. – 2004. – № 1. – С. 15–20.

5. Кленин, В. И. Характеристические функции светорассеивания дисперсных систем / В. И. Кленин, С. Ю. Щеголев, В. И. Лаврушин. – Саратов: Саратов. ун-т, 1977. – 177 с.

6. Осташевский, И. Я. Рассеяние света суспензиями клеток в норме и при внешних воздействиях / И. Я. Осташевский, А. Ю. Сунгуров, В. А. Волчков // Биофизика. – 1975. – Т. 20, № 5. – С. 853–858.

7. Бялясава, Н. А. Мікрабіялогія: вучэб.-метад. дапаможнік / Н. А. Бялясава, М. В. Грыц. – Мінск: БДТУ, 1999. – 114 с.

8. Владимиров, Ю. А. Физико-химические основы фотобиологических процессов: учеб. пособие / Ю. А. Владимиров, А. Я. Поталенко. – М.: Высш. школа, 1989. – 199 с.