

МЕТОДЫ АНАЛИЗА АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ

The article is devoted to the analysis of adaptation properties of microorganisms influenced by antimicrobial substances. The aim of work is searching for comfortable methods of adaptation study and estimation of adaptive properties of microorganisms in population. In the result of fulfilled research it was shown that the classical methods of microorganisms cultivating in agar media are useful for estimation of time, velocity adaptation, appearing of stable forms, but these methods can't analyze uncultivable cells. It is necessary to develop instrumental express methods for studying of microorganisms adaptation to biocides.

Введение. Проблема биодеструкции микроорганизмами материалов, оборудования, конструкций и других технических изделий является одной из актуальных в настоящее время. Только учтенные потери от биоповреждений составляют 5–7% стоимости мировой промышленной продукции, и они имеют тенденцию к росту.

Одним из способов борьбы с микроорганизмами является использование антимикробных веществ, обладающих бактериостатическим и бактерицидным действием. В настоящее время выпускается большой ассортимент различных антисептических веществ, перечень которых постоянно увеличивается.

Химический способ защиты объектов от биодеструкции сталкивается с проблемой быстрой адаптации микроорганизмов к биоцидным веществам.

Как известно, адаптация является процессом приспособления организмов к неблагоприятным факторам окружающей среды с целью сохранения жизнеспособности и оптимального развития в данных условиях и рассматривается как универсальное общебиологическое явление, присущее и макро-, и микроорганизмам.

В основе адаптации организмов лежат процессы регуляции гомеостаза, характеризующие способность поддерживать постоянство своей внутренней среды для оптимальной жизнедеятельности. Адаптация проявляется на разных уровнях организации живых организмов: генетическом, биохимическом, физиологическом, популяционном, биоценозном.

Разнообразие и совершенство адаптационных механизмов позволило организмам заселить различные экологические ниши с мало-пригодными для существования природными условиями [1].

Благодаря адаптации микроорганизмов к различным загрязнителям в природе осуществляются процессы самоочистки окружающей среды от вредных отходов деятельности человека.

С другой стороны, адаптация микроорганизмов к антимикробным веществам, используемым человеком для борьбы с нежелательной микрофлорой, наносит большой вред в промышленности, медицине и других сферах. По-

вышение резистентности микроорганизмов делает неэффективными используемые лекарственные препараты и защитные антимикробные средства. Это приводит к ускорению процессов биодеструкции материалов, изделий, нарушению здоровья человека и вызывает необходимость постоянного поиска новых антисептических средств и повышения их эффективности.

Основная часть. Цель данной работы – оценка методов культивирования клеток в агаре для изучения адаптационных свойств микроорганизмов.

В работе использовали чистые культуры клеток микроорганизмов *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Суточные культуры исследуемых бактерий разводили свежим питательным бульоном в 4 раза и выращивали при 30°C с аэрацией в течение 2 ч, после чего методом посева разведений на чашки с агаризованной питательной средой подсчитывали начальную концентрацию клеток [2].

Для получения адаптированных клеток применяли методы культивирования микроорганизмов в жидких и агаризованных средах в присутствии антисептиков. В суспензию клеток ($C = 10^6$ кл./мл) микроорганизмов в питательном бульоне вносили антимикробные вещества в диапазоне концентраций 0,0001–0,1%, помещали в термостат при 30°C и культивировали в течение 3 сут. Каждые сутки отбирали образцы и высевали их на ПА для определения количества выживших клеток.

При выращивании микроорганизмов на агаризованных средах с антисептиками проводили последовательный пересев колоний клеток, появившихся на питательном агаре (ПА) с биоцидными веществами умеренной концентрации, на среды с возрастающей концентрацией антисептика. Для этого готовили чашки Петри с плотной агаризованной средой с содержанием биоцидов 0,0001–0,1% и контрольные чашки без биоцидов. В каждую чашку вносили по 0,1 мл суспензии микроорганизмов с содержанием клеток 10^2 – 10^3 кл./мл и культивировали в термостате при 30°C в течение 3 сут, а затем подсчитывали количество выросших колоний клеток, устойчивых к биоцидам.

Для получения вторичной и последующих культур клеток из чашек Петри, на которых был отмечен рост микроорганизмов, отбирали отдельные колонии клеток, вносили их в физиологический раствор, выравнивали концентрации по оптической плотности и высевали разведения на чашки с ПА, содержащими такие же и возрастающие концентрации биоцидов.

Полученные на разных стадиях пересевов клетки использовали для оценки чувствительности и устойчивости микроорганизмов к биоцидным веществам. Эти измерения проводили с помощью метода диффузии веществ в агар [3]. На поверхность застывшего ПА наносили по 0,1 мл суспензии тест-культуры микроорганизмов в концентрации 10^7 кл./мл и равномерно распределяли с помощью стерильного шпателя по поверхности агара. Затем укладывали стерильные диски фильтровальной бумаги (диаметром 8 мм), пропитанные в растворах биоцидов в диапазоне концентраций 0,01–1%. Чашки помещали в термостат при температуре $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ на 24 ч. После инкубирования измеряли диаметры зон задержки роста клеток вокруг дисков.

При оценке чувствительности и устойчивости клеток микроорганизмов к биоцидам использовали также метод реплик [2]. Выросшие колонии клеток переносили с чашек без биоцидов на питательный агар с возрастающим содержанием антисептика. Определяли предельные концентрации, при которых не наблюдалось образование видимых колоний клеток.

В качестве антисептиков применяли препараты полигексаметиленгуанидин гидрохлорид (ПГМГ), хлоргексидин биглюконат (ХГ).

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

На рис. 1 приведена гистограмма изменения количества выживших клеток бактерий *B. subtilis* от длительности культивирования в жидкой питательной среде с биоцидом ПГМГ. Как видно из рис. 1, с увеличением времени культивирования клеток отмечается возрастание численности выживших форм микроорганизмов, что указывает на их адаптацию к антисептику.

Скорость адаптации клеток на популяционном уровне можно оценить по тангенсу угла наклона полученных зависимостей (рис. 1) по формуле

$$v = d(\log N) / dt,$$

где N – численность культивируемых микроорганизмов, устойчивых к биоциду.

В случае клеток *B. subtilis* скорость адаптации микроорганизмов составила в жидкой питательной среде $0,15 \text{ ч}^{-1}$, в агаре – $0,02 \text{ ч}^{-1}$ при концентрации ПГМГ 0,001%.

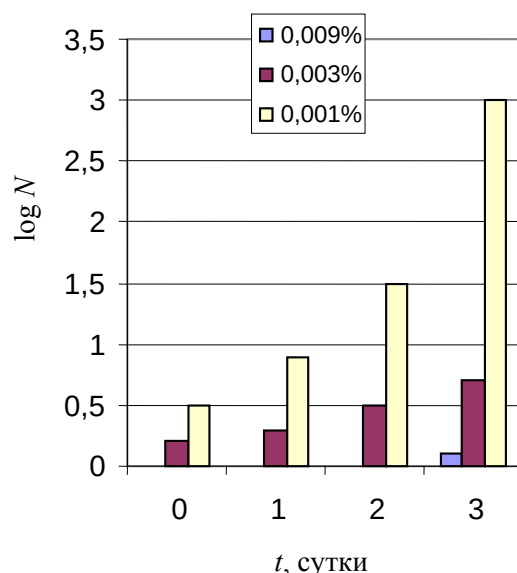


Рис. 1. Изменение логарифма численности клеток *B. subtilis* в питательном бульоне с различными концентрациями ПГМГ в зависимости от времени культивирования клеток

Как видно из рис. 1, длительность периода адаптации клеток к биоциду ПГМГ зависит от его содержания в среде. При увеличении концентрации биоцида ПГМГ до 0,009% наблюдается задержка роста численности популяции клеток (лаг-фаза) более чем на 2 сут до появления культивируемой формы микроорганизмов. Этот период задержки роста характеризует физиологический уровень адаптации клеток.

Как известно, жизнеспособность микроорганизмов при воздействии неблагоприятных факторов среды характеризуется чувствительностью и устойчивостью клеток к этим факторам. О чувствительности микроорганизмов к антимикробным веществам можно судить по минимальной концентрации вещества, вызывающей задержку роста клеток. Торможение жизненной активности клеток рассматривается как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов [4].

Полученные на разных стадиях адаптации клетки были использованы для оценки их чувствительности и устойчивости к биоцидам.

На рис. 2 приведена гистограмма изменения диаметра зоны подавления роста микроорганизмов *E. coli* вокруг диска с антисептиком ХГ в зависимости от числа пересевов и концентрации биоцида. Величина данного диаметра может характеризовать чувствительность клеток к антимикробному веществу. Как видно из рис. 2, чем дольше контактируют клетки *E. coli* с низкими концентрациями биоцида, тем меньше диаметр зоны подавления их роста. Это указывает на то, что в процессе адаптации микроор-

ганизмов их чувствительность к биоциду уменьшается, а устойчивость возрастает.

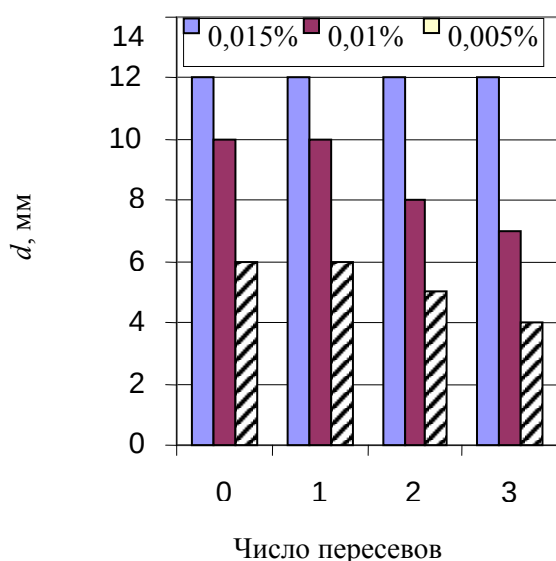


Рис. 2. Изменение диаметра зоны подавления роста клеток *E. coli* от числа пересевов в присутствии различных концентраций ХГ

Существует максимальная концентрация антисептика, выше которой физиологическая адаптация микроорганизмов к нему невозможна ввиду превышения адаптационных возможностей клеток. Данная концентрация характеризует границу физиологической устойчивости микроорганизмов к биоциду. Для бактерий *B. subtilis* и биоцида ПГМГ эта величина составила 0,010%, для *E. coli* и ХГ – 0,015%.

Вместе с тем для микроорганизмов возможна генетическая адаптация, связанная со случайной комбинацией полезных мутаций, приводящая к повышению устойчивости к биоциду. Этот процесс требует значительно более длительных периодов времени и может растягиваться на десятки лет [5].

Заключение. В результате проведенной работы установлено, что адаптация микроорганизмов к биоцидам сопровождается увеличением численности выживших форм клеток, снижением их чувствительности и повышением устойчиво-

сти. Показано, что чем ниже концентрация антисептика, тем выше скорость адаптации микроорганизмов к неблагоприятному фактору. Существуют максимальные концентрации антимикробных веществ, выше которых клетки физиологически не адаптируются. Основными параметрами, характеризующими адаптационные свойства микроорганизмов, являются: скорость адаптации, период времени адаптации, уровень чувствительности микроорганизмов к антисептикам, содержание устойчивых форм клеток.

Использование методов выращивания микроорганизмов в агаре позволяет выделять культивируемые формы клеток и следить за изменением их уровня чувствительности и устойчивости к антимикробным веществам, а также определять содержание устойчивых форм клеток. Однако эти методы длительны, трудоемки и не позволяют анализировать некультивируемые формы клеток, содержание которых может достигать в природных условиях 90% всей численности популяции микроорганизмов.

Это вызывает необходимость разработки более эффективных инструментальных методов анализа адаптационных свойств микроорганизмов и определения содержания некультивируемых форм клеток.

Литература

1. Имшенецкий, А. А. Адаптация у микроорганизмов / А. А. Имшенецкий. – М.: Изд-во ин. лит., 1956. – 519 с.
2. Белясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум / Н. А. Белясова. – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.
3. Совершенствование метода биотестирования ксенобиотиков / Н. А. Белясова [и др.] // Материалы, технологии, инструменты. – 2005. – Т. 10, № 4. – С. 90–93.
4. Феофилова, Е. П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям / Е. П. Феофилова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39, № 1. – С. 5–24.
5. Гриц, М. А. Основы токсикологии: учеб. пособие / М. А. Гриц, Н. В. Гриц. – Минск: БГТУ, 1999. – 173 с.