

УДК 579.253:575.224

Н.В. Гриц, доцент;
А.Ю. Фомичев, научн. сотр.

ДЕЙСТВИЕ ОЗОНА НА КЛЕТКИ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ РАЗНЫХ УСЛОВИЯХ ОБРАБОТКИ

It was shown, that cell-wall lysis and disorder of structure-functional state of cytoplasmic membrain are the main reasons for inactivation of bacterial cells by ozone.

Использование озона для обеззараживания питьевой и сточных вод, для сохранения качества и увеличения сроков хранения сельскохозяйственной продукции, для получения лекарственных препаратов и гормонов определяет необходимость детального изучения механизмов его действия на биологические объекты, наиболее удобными среди которых являются микроорганизмы. В последнее десятилетие исследования молекулярных механизмов реакций озона с бактериальными клетками и фаговыми частицами заметно интенсифицировались, в результате чего 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 анатомически различающихся 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.

Обработку озоном осуществляли путем барботажа 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. Концентрацию измеряли на фотоэлектроколориметре KSF-2 по окраске 1% раствора KI, через который барботировался озонированный воздух.

Одним из традиционных критериев оценки степени повреждающего действия внешнего фактора на бактерии является выживаемость обработанных клеток, регистрируемая обычно по сохранению ими колониеобразующей способности после 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 в данной работе 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 при прочих равных условиях 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 intactных 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. По-видимому, органические компоненты

аминопептидной 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 радикалов.

С целью выяснения причин интенсивного разрушения обработанных озоном 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 рН (5, 7, 9). В результате было установлено, что подкисление до рН 5 и подщелачивание до рН 9 дистиллированной воды не приводит к изменению оптической плотности обработанных в разное время суспензий бактерий.

Интенсивность разрушения в солевых средах обусловлена дозой повреждающего агента и осуществляется примерно одинаково 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 озоном 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 выше предположение справедливо, то в первом случае (в дистиллированной воде) должно было стимулироваться разрушение бактерий, а во втором случае (в фосфатном буфере) разрушение должно было либо предотвращаться полностью, либо в значительной степени уменьшиться. 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 озоном 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 озоном в дистиллированной воде	0,30
	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 O_3 на бактерии дает основания говорить об окислении мембранных фосфолипи-

дов и, следовательно, о структурно-функциональных нарушениях клеточных мембран. В эксперименте установлено, что концентрация МДА действительно возрастает в зависимости от дозы озона (рис.), однако наблюдаются различия в количестве образующего МДА при обработке равными дозами O_3 грамотрицательных (*E.coli*) и грамположительных (*B.subtilis*) бактерий, особенно после обработки озоном в дистиллированной воде, когда клетки не разрушаются.

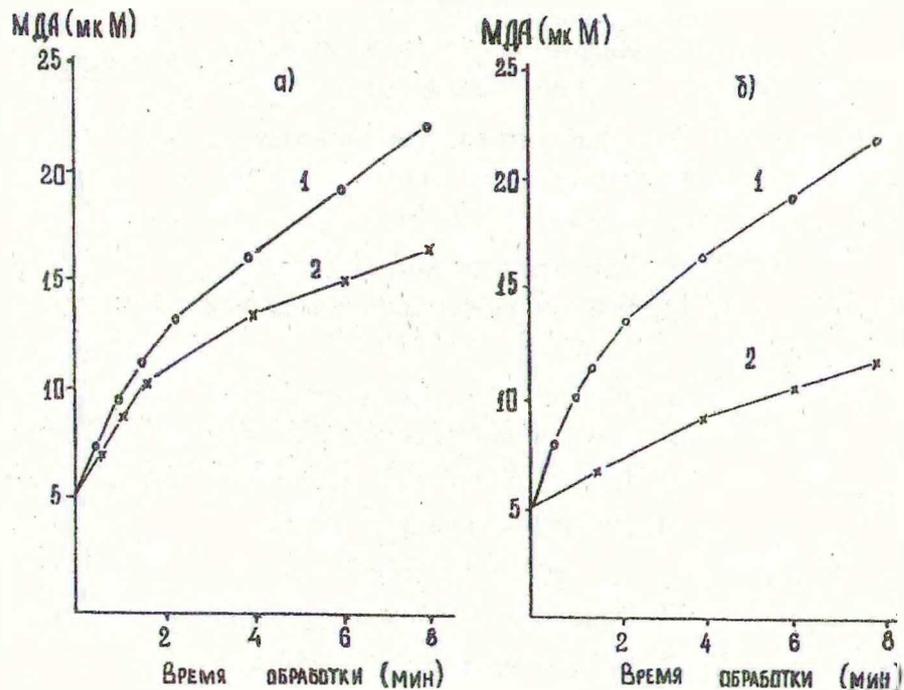


Рис. Образование малонового диальдегида при обработке озоном бактерий *E.coli* (а) и *B.subtilis* (б) в фосфатном буфере (1) и в дистиллированной воде (2)

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'Herault P., Chung Y.S. Mutageni of ozone in different repair-defisient 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 в 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 polimerase 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. Isolment of characterisation du mutants sensibles ou resistans a l'ozone cher *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.

УДК 537.37

Н.В.Гриц, доцент;
В.К.Ющенко, зав. лаб.;
А.Ю.Фомичев, научн.сотр.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ БАКТЕРИЙ E.COLI K-12 ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТОЙ, ОБРАБОТАННОЙ ОЗОНОМ

Influence ozonation of bacteria E.coli on efficiency of genetic transformation, influence ozonation of isolated DNA on frequency transformation.

Как было показано в предыдущей статье [1], озонирование бактерий приводит к повреждениям ригидной клеточной стенки и цитоплазматической мембраны. На этом основании правомочно предположение, что при определенных дозах воздействия озон может повышать состояние компетентности клеток, выражающееся в увеличении частоты генетической трансформации бактерий изолированной дезоксирибонуклеиновой кислотой.

Действительно, обработка бактерий E.coli K-12 AB1157 озонем в высоких дозах (40 с и 60 с воздействия при концентрации O₃ 0,4 мг/л воздуха и скорости продувки 0,1 л/мин) увеличивала эффективность формирования трансформантов к прототрофности по пролину, гистидину, лейцину и аргинину (рис.1). При обработке в более высоких дозах эффективность трансформации снижалась, вероятно, за счет инактивации бактерий вследствие глубоких и необратимых повреждений клеточной стенки.