

АНАЛИЗ АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ МИКРООРГАНИЗМОВ К КСЕНОБИОТИКАМ

А.В. Игнатенко

Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь
leontiev@bstu.unibel.by

Использование ксенобиотиков, обладающих бактериостатическим и бактерицидным действием, является одним из основных способов химической борьбы с нежелательными микроорганизмами. Однако способность клеток быстро адаптироваться к неблагоприятным факторам внешней среды порождает проблему повышения их устойчивости и приводит к усилению повреждающего действия микроорганизмов. Это вызывает необходимость постоянного поиска новых антисептических препаратов и лекарственных средств для сохранения здоровья человека и животных, предотвращения порчи сырья и продукции, защиты материалов и конструкций от разрушений.

Как известно адаптация характеризует процесс приспособления организмов к неблагоприятным факторам внешней среды с целью сохранения их жизнеспособности и оптимального развития в данных условиях, и рассматривается как универсальное общебиологическое явление.

Изучение закономерностей адаптации микроорганизмов к ксенобиотикам является одним из основных направлений повышения эффективности борьбы с биоповреждениями, а также лежит в основе усиления деструктирующей активности микроорганизмов при очистке окружающей среды от опасных загрязнителей.

Процессы адаптации микроорганизмов проявляются на различных уровнях организации биосистем биохимическом, физиологическом, популяционном. Они характеризуются изменением уровня активности микроорганизмов и содержанием резистентных форм.

Популяционная адаптация микроорганизмов является одним из широко распространенных видов коллективной защиты клеток в неблагоприятных условиях. Анализ состава популяций микроорганизмов показывает, что в них присутствуют различные формы клеток: активно растущие, не растущие, но метаболизирующие, а также покоящиеся [1].

Для анализа растущих микроорганизмов широко используются методы культивирования клеток в питательном агаре. Помимо длительности и трудоемкости анализа, данные методы не позволяют охарактеризовать активность микроорганизмов, а также анализировать не растущие и не культивируемые формы клеток.

Микрокалориметрия – один из немногих универсальных методов анализа, позволяющих определять физиологическую и биохимическую активность метаболизирующих и растущих клеток.

Целью данной работы было исследование влияния антимикробных веществ на тепловыделение микроорганизмов, а также изучение адаптационных свойств клеток в присутствии ксенобиотиков.

В работе использовали чистые культуры микроорганизмов *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *B. subtilis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Суточные культуры исследуемых бактерий разводили свежим питательным бульоном в 4 раза и выращивали при 30 °С с аэрацией в течение 2 ч, после чего методом посева разведений на чашки с агаризованной питательной средой (ПА) подсчитывали начальную концентрацию клеток.

Измерение теплопродукции клеток проводили на микрокалориметре МКМ-Ц в соответствии с [2]. В 1 см³ питательного бульона (ПБ) с микроорганизмами (2×10^7 кл/см³) в логарифмической стадии роста вносили 1 см³ биоцидного вещества с конечной концентрацией 0,0001–0,3 % (рабочая проба). В ячейку сравнения помещали аналогичную пробу с максимальной концентрацией биоцида, подавляющей метаболизм клеток и регистрировали кине-

тику тепловыделения микроорганизмов. В качестве контрольной пробы использовали образец, в который вместо антисептика вносили 1 см³ физиологического раствора.

Для получения адаптированных клеток применяли методы культивирования микроорганизмов в ПБ в присутствии умеренных концентраций антисептиков. В суспензию клеток ($C=10^6$ кл/мл) микроорганизмов в ПБ вносили антимикробные вещества в диапазоне концентраций 0,0001–0,1 %, помещали в термостат при 30 °С и культивировали в течение 3-х суток. Каждые сутки отбирали образцы и высевали их на ПА для определения количества выживших клеток и параллельно измеряли уровень тепловыделения образцов.

В качестве антисептиков использовали производные полигексаметиленгуанидин гидрохлорида (ПГМГ) в концентрации (0,001–0,01 %), хлоргексидин биглюконат (ХГ) (0,01–0,05 %), гефал (0,05–0,1 %), септамирин (0,01–0,05 %).

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

О влиянии ксенобиотиков на микроорганизмы судили по изменению относительного уровня тепловыделения клеток (q/q_0), времени задержки роста тепловыделения (t_0), удельной скорости тепловыделения ($\mu = (1/q) \cdot dq/dt$), где q и q_0 – мощности теплопродукции микроорганизмов в рабочей и контрольной пробах, соответственно. Критерием антимикробной активности биоцидов служил уровень подавления тепловыделения клеток: $(q_0 - q)/q_0 \times 100$ %.

В работе предложен микрокалориметрический метод изучения адаптационных свойств микроорганизмов, основанный на повышении теплопродукции клеток при их адаптации. Метод позволяет наблюдать как растущие (рис. 1 а), так и метаболизирующие клетки (рис. 1 б).

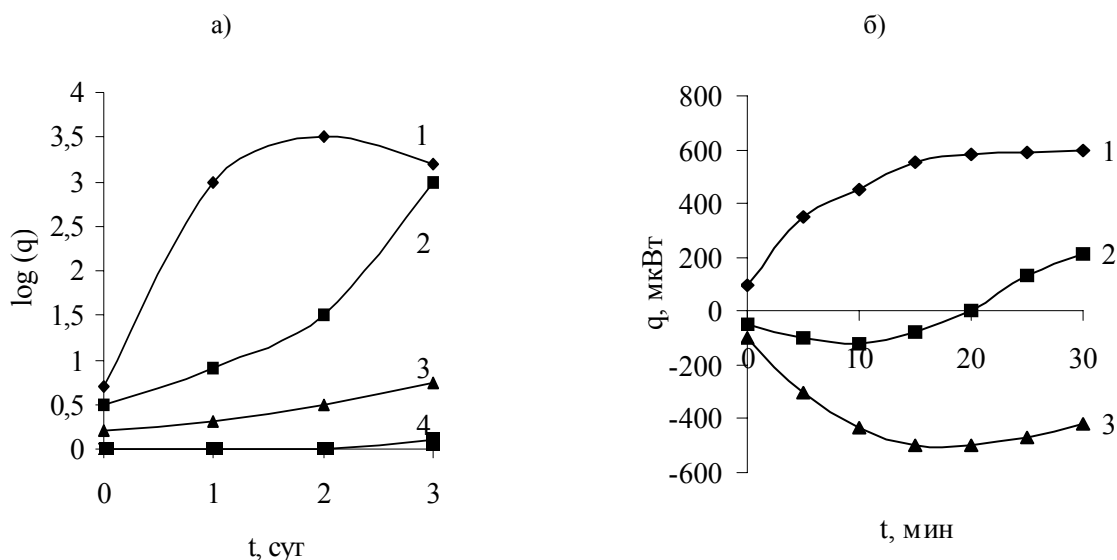


Рис.1 Изменение мощности тепловыделения клеток *E. coli* в присутствии биоцидов: $N_0=10^6$ кл/мл:

а) ПГМГ: 1 – контроль, 2 – 0,001 %; 3 – 0,003 %; 4 – 0,009 %;

б) 1 – контроль, 2 – гефал ($C = 0,05$ %), 3 – хлоргексидин ($C = 0,05$ %)

Как видно из рис. 1, уровень тепловыделения *E. coli* снижается по сравнению с контрольным образцом и зависит от природы и концентрации ксенобиотика, что согласуется с [3]. С увеличением времени культивирования клеток отмечается возрастание тепловыделения образцов, связанное с ростом численности резистентных микроорганизмов. Существует максимальная концентрация антисептика, выше которой физиологическая адаптация микроорганизмов невозможна, ввиду превышения их адаптационных возможностей. Данная концентрация характеризует границу физиологической устойчивости микроорганизмов к био-

циду. Для бактерий *B. subtilis* и биоцида ПГМГ эта величина составила 0,010 %, для *E. coli* и ХГ – 0,015 %.

Как показывают данные таблицы после адаптации микроорганизмов в присутствии антисептиков уровень подавления тепловыделения клеток снижается, что указывает на образование резистентных форм клеток.

Таблица

Характеристика подавления тепловыделения *Pseudomonas aeruginosa* до и после 3-х суточной адаптации клеток в присутствии антимикробных веществ

Антимикробный препарат	Концентрация микроорганизма, кл/мл	Концентрация препарата, %	Уровень подавления тепловыделения, %	
			до адаптации	после адаптации
Хлоргексидин	10 ⁷	0,05	100	60
Гефал	10 ⁷	0,09	60	10
Септомирин	10 ⁸	0,01	100	45

Метод микрокалориметрии позволяет быстро оценить активность антимикробных препаратов, определить бактериостатический и биоцидный эффекты их действия на микроорганизмы и провести анализ адаптационных свойств микроорганизмов.

Литература

1. Имшенецкий, А.А. Адаптация у микроорганизмов. – М.: Изд-во ин. лит., 1956. – 519 с.
2. Игнатенко А.В., Гриц Н.В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия. Лабораторный практикум. – Минск.: БГТУ, 2003. – 114 с.
3. Феофилова, Е.П. Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т.39, № 1. – С.5–24.

МЕХАНИЗМЫ БИОТРАНСФОРМАЦИИ СИМ-ТРИАЗИНОВЫХ ГЕРБИЦИДОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS*

О.С. Игнатовец, В.Н. Леонтьев, Т.И. Ахрамович

Белорусский государственный технологический университет, г. Минск, Беларусь
leontiev@bstu.unibel.by

Сим-триазиновые гербициды применяются, в основном, для борьбы с сорными растениями на посевах ряда полевых и овощных культур. По масштабам производства и потребления сим-триазины – одна из ведущих групп гербицидов [1]. В результате их многолетнего повсеместного применения и высокой персистентности весьма реальна опасность стойкого загрязнения почвы и водоемов, как сим-триазинами, так и токсичными продуктами их трансформации. В настоящее время в основе технологий биоремедиации окружающей среды лежит интродукция микроорганизмов деструкторов. Незначительные перестройки молекул химических соединений под действием ферментных систем микроорганизмов часто полностью снимают токсичность ксенобиотиков для живых организмов, но в некоторых случаях образующиеся интермедиаты обладают еще большей токсичностью, чем исходные сим-триазины. С этой точки зрения становится очевидной необходимость в получении информации о механизмах биотрансформации ксенобиотиков триазинового ряда. Целью настоящей работы явилось изучение путей биodeградации сим-триазиновых гербицидов почвенными бактериями рода *Pseudomonas*.