

Дудчик Н.В., Филонов В.П., Щербинская И.П.

Кинетические и культурально-морфологические особенности чувствительных культур микроорганизмов при токсическом воздействии

Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр гигиены», Минск

Реферат. Экспериментально обоснован постулат о применимости кинетических параметров развития популяции микроорганизмов в периодической системе для оценки токсических воздействий. Выявлены закономерные зависимости между направленностью морфологических изменений, показателями популяционного развития клеток прокариотических микроорганизмов и токсическим воздействием.

Ключевые слова: микробиотесты, токсическое воздействие

В связи с усиливающейся антропогенной нагрузкой на экосистемы все большую актуальность приобретает разработка высокочувствительных методов, характеризующих потенциальные токсические свойства природных объектов. За последние десятилетия внимание специалистов в области гигиены окружающей среды все в большей степени привлекают биологические тесты – исследования на модельных живых организмах, или методы альтернативного тестирования потенциальных токсических эффектов. Сформировались и уже достаточно широко используются в литературе термины «микробиотестирование» и «микробиотесты» («микротесты»), а методы достаточно значимо применяются в токсикологической практике. Преимуществами таких методов являются: низкая стоимость, получение быстрого ответа, возможность оценки большого числа проб, простое лабораторное оборудование, работа с небольшими объемами проб, портативность, воспроизводимость результатов, а также возможность большого выбора тест-организмов. [1-6].

В ГУ РНПЦ гигиены проводятся научно-исследовательские работы по изучению популяционных, субпопуляционных и морфологических особенностей токсического действия с целью отбора маркеров индикации на воздействие ксенобиотиков. В процессе выполнения работы проведены: изучение развития популяции микроорганизмов, отобраны информативные критерии оценки для выявления реакции клеток про- и эукариот на воздействие ксенобиотиков для токсиколого-гигиенической оценки опасности загрязнения объектов среды обитания человека. Предложенный подход был использован для оценки токсических воздействий образцов почвы, контаминированной солями тяжелых металлов (свинца и кадмия).

В процессе развития культур определяли: длительность лаг-фазы, рассчитывали (час-1), время удвоения биомассы интегральное значение удельной скорости роста (td , час). В качестве тест-культур использовали чувствительные почвенные микроорганизмы *Azotobacter* sp. БИМ-74, *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6.

Удельную скорость роста рассчитывали по формуле:

$$= (\ln X_1 - \ln X_0) / \mu (t - t_0), \quad (1)$$

где X_1 и X_0 – плотности клеточной суспензии в моменты времени соответственно t и t_0 .

Время удвоения биомассы (t_d) определяли как $t_d = \ln 2 /$

μ (2)

Величину лаг-периода (длительность начальной фазы роста) определяли с использованием показателя ДТ микробиологического анализатора.

Как видно из таблицы 1, токсическое воздействие тяжелых металлов приводит к увеличению продолжительности лаг-фазы с 4,9 часов до 145,1 час для *Azotobacter* sp.БИМ-74 и с 6,3 час до 113,7 час для *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6. При токсическом воздействии солями кадмия продолжительности лаг-фазы увеличилась с 5,9 часов до 150,0 час для *Azotobacter* sp.БИМ-74 и с 6,3 час до 120,0 час для *Arthrobacter ureafaciens* БИМ В-6. Изменялись и удельная (час⁻¹), время удвоения биомассы (t_d , час) (Таблица 1).

Кроме того, кривая роста имеет двухфазный характер с лаг-периодом, который разделяется на две части экспоненциального роста. Известно, что двухфазный рост обычно отражает изменение метаболизма культуры микроорганизмов. На среде предложенного состава у микроорганизмов в контроле культуры имеют типичную кинетику роста. Под влиянием токсиканта возникает псевдолаг-фаза и ее причиной, так же как и причиной удлинения лаг-фазы, является действие токсиканта. У культуры четко прослеживается зависимость увеличения удельной скорости роста и прироста биомассы от концентрации токсиканта в среде. Параллельно с определением кинетических параметров проводили микроскопический контроль культуры. Показано, что воздействие солей свинца выражалось в замедлении роста колоний, уменьшении их диаметра, изменении формы, цвета колоний, способности к окрашиванию фиксированных и прижизненных препаратов для обеих тест-культур.

Таким образом, полученные нами результаты, коррелирующие с работами [2-6], подтверждают, что использование микробиотестов, основанных на параметрах периодического культивирования микроорганизмов, является эффективным инструментом при проведении токсикологических исследований. В качестве маркеров токсического воздействия

Таблица 1 - Влияние тяжелых металлов на параметры роста популяции микроорганизмов

Вид микроорганизма	ПДК токсиканта	Кинетические параметры		
		Длительность лаг-фазы, час	Удельная скорость роста, $\mu, \text{ч}^{-1}$	Td, час
Соли свинца				
Azotobacter sp.БИМ-74	0 (контроль)	4,9	0,734	3,2
	1	6,5	0,472	4,5
	10	75,1	0,125	9,3
	50	150	0,091	12,0
	100	Полное ингибирование		-
Arthrobacter ureafaciens БИМ В-6	0 (контроль)	6,3		4,7
	1	7,9		5,4
	10	56,0		10,2
	50	120		15,3
	100	Полное ингибирование		-
Соли кадмия				
Azotobacter sp.БИМ-74	0 (контроль)	5,9	0,749	0,84
	1	7,5	0,498	1,52
	10	90,1	0,173	4,49
	50	120	0,097	7,22
	100	Полное ингибирование		-
Arthrobacter ureafaciens БИМ В-6	0 (контроль)	6,3	0,645	1,07
	1	8,9	0,391	1,77
	10	60,0	0,153	4,53
	50	120	0,085	8,15
	100	Полное ингибирование		-

целесообразно использование кинетических параметров роста культуры: удельной скорости, время генерации $g.v$, константы скорости деления μ экспоненциального роста. Исследования кинетических параметров могут быть дополнены культурально-морфологическими показателями отдельных клеток и колоний микроорганизмов. В ходе выполнения экспериментальной работы экспериментально обоснован постулат о применимости кинетических параметров развития популяции в периодической системе для оценки токсических воздействий. Выявлены закономерные зависимости между направленностью морфологических изменений, показателями популяционного развития клеток прокариотических микроорганизмов и токсическим воздействием.

Литература

- 1 Дудчик, Н. В. Использование микробиотестирования при оценке токсичности химических веществ в окружающей среде / Н. В. Дудчик // Гигиена и санитария. 2009. № 1. С. 84–87.
- 2 Некоторые особенности выживаемости дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4 / М. А. Давтян [и др.] [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://elib.sci.am/2002_1/11/11r.htm. - Дата доступа: 25.05.2009.

- 3 Синтез и изучение влияния производных имидазола на параметры роста и морфологические характеристики грибов рода *Candida* / О. Н. Нечаева [и др.] // Вестник СамГУ. 2004. № 2. С. 131–138.
- 4 Ahtiainen, J. Microbiological tests and measurements in the assessment of harmful substances and pollution / J. Ahtiainen. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.bionewsonline.com/b/2/jucca_ahtianen.htm. - Дата доступа: 23.10.2009.
- 5 Study on the toxic effects of diphenol compounds on soil microbial activity by combination of methods / H. Chen [et al.] // J. Hazard Mater. 2009. Vol. 167, № 1–3. P. 846–51.
- 6 Pampulha, M. E. Effects of a phosphinothricin based herbicide on selected groups of Soil microorganisms / M. E. Pampulha, M. A. Ferreira, A. Oliveira // J. Basic Microbiol. 2007. Vol. 47, № 4. P. 325–331.