УДК 579.841.1:579.253.2

ВПЛИВ СТИМУЛЯТОРІВ НА КІНЕТИКУ РОСТУ ШТАМІВ P. AERUGINOSA

Н.І. Городницька, Т.П. Осолодченко,
ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України", м. Харків

У роботі використовувалися штами P. aeruginosa, енхансери із груп похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів у концентрації 0,1 %. Досліджувалася дія енхансерів обособлено на кінетику росту штамів P. aeruginosa. У результаті проведених досліджень встановлено, що при використанні активаторів алостеричних ферментів збільшується кількість мікробних клітин усіх вивчених штамів P. aeruginosa. Найбільші показники оптичної щільності мікробних суспензій за шкалою Mc-Farland виявлялися при додаванні енхансера А в концентрації 0,1%.

Ключові слова: *штами P. aeruginosa, енхансери, кінетика росту, оптична щільність.*

В работе использовались штаммы P. aeruginosa, энхансеры из групп производных изохинолинов, имидазолов и пиримидинов в концентрации 0,1 %. Исследовалось действие энхансеров отдельно на кинетику роста штаммов P. aeruginosa. В результате проведенных исследований было установлено, что при использовании активаторов аллостерических ферментов увеличивается количество микробных клеток всех изученных штаммов P. aeruginosa. Самые большие показатели оптической плотности микробных суспензий по шкале Mc-Farland обнаруживались при добавлении енхансера А в концентрации 0,1 %.

Ключевые слова: *штаммы P. aeruginosa, энхансеры, кинетика роста, оптическая плотность.*

Серед головних принципів промислової біотехнології, яка використовує як біологічні об'єкти мікроорганізми, є їх збереження у відповідному стані, культивування на середовищах, які здатні максимально накопичити біомасу та забезпечити отримання корисних речовин.

Суттєвими умовами для накопичення біомаси мікроорганізмів та підтримки активності штамів є оптимізація культивування відповідно до споживання поживних речовин середовищ, де вагоме місце займають різноманітні стимулятори росту.

При вирощуванні мікроорганізмів у промислових цілях для оптимізації умов культивування використовують різноманітні стимулятори росту: вітаміни, ферменти, аутолізати та ін.

Одним із перспективних засобів підвищення кількості мікробних клітин поза рамками фізіологічної норми є використання активаторів алостеричних ферментів класу фосфокіназ та індукторів синтезу циклічних мононуклеотидів [1,2].

Під час росту періодичної бактеріальної культури може не бути строгої пропорційності між збільшенням числа клітин та збільшенням бактеріальної біомаси. Ці показники необхідно розрізняти, тому що у популяції бактерій не всі клітини є життєздатними. Живими вважаються ті клітини, що утворюють колонії на агаризованому середовищі або суспензію в живильному розчині. У загальне ж число клітин включають усі видимі або іншим способом виявлені клітини; сюди, отже, входять також мертві або пошкоджені клітини.

Робота виконана відповідно до комплексної наукової програми ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України": "Дослідження нового класу перспективних для біотехнології неметаболітних енхансерів росту мікроорганізмів групи алостеричних активаторів циклічного аденозинмонофосфату" (№ державної реєстрації 0107U001642);

Метою нашої роботи було вивчити дію стимуляторів росту із групи похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів; дослідити, як впливають енхансери на кінетику росту штамів P. aeruginosa.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

У роботі використовувалися штами P. aeruginosa АТСС 27853, P. aeruginosa АТСС 9027, P. aeruginosa ІГН 66-16, люб'язно надані музеєм культур мікроорганізмів ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України". Усі штами зберігалися в напіврідкому середовищі. Життєздатність клітин підтримували методом пересівів на тверде поживильне середовище. Культуральні та морфологічні властивості мікроорганізмів підтверджували шляхом посіву на м'ясопептонний агар (МПА) та мікроскопією клітин. Стандартні середовища готували відповідно до вимог виробника. Як стандартне середовище був обраний МПА, МПБ (м'ясопептонний бульйон).

Культивування бактерій проводили в аеробних умовах на твердих (МПА з енхансерами) і рідких (МПБ з енхансерами) живних середовищах. Чашки Петрі та пробірки поміщали в термостат при температурі 37 ^{0} С на 24 години. Ріст культури оцінювали за оптичною щільністю мікробних культур. Оптичну щільність культури вимірювали на денсилометрі. Контролем було відповідне живильне середовище (МПБ) [2]. Облік результатів проводили через 24 години інкубації посівів при 37^0 С. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) визначали методом серійних розведень з подальшим висівом і підрахунком колоній бактерій на чашках з повноцінним агаризованим середовищем [3, 4, 5]. Кінетичні характеристики зростаючої періодичної культури визначали за методикою Перт [6].

Для визначення концентрації мікробних клітин використовували методи, що ґрунтуються на вимірюванні каламутності клітинних суспензій. Як стимулятори росту були досліджені похідні із групи алостеричних активаторів циклічного аденозинмонофосфату: А – похідні ізохінолінів, В – похідні імідазолів та С – похідні піримідинів. Повне найменування речовин не зазначається, тому що є предметом патентування.

Проводили дослідження енхансерів обособлено із групи похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів у концентрації 0,1 % кожного на швидкість появи колоній мікроорганізмів, їх розміри, форми. Досліджували динаміку накопичення мікробних клітин штамів *P. aeruginosa* на рідких середовищах з використанням енхансерів [7].

Оптичну щільність мікробної суспензії визначали за Mc-Farland [8]. Посівна доза P. aeruginosa становила 1 одиницю за Mc-Farland. Для визначення кількості мікробних клітин суспензію розводили до 10^7.

Колонієутворення визначали за десятинним логарифмом. Робота з мікроорганізмами проводилася відповідно до нормативних документів [9].

Повторність експериментів, як мінімум, триразова. Дані, отримані в ході експериментів, оброблялися статистично за допомогою пакета Microsoft Office Excel 2003 і подані в роботі у вигляді середньої зі стандартним відхиленням [10,11]. Також для статистичної обробки даних використовували комп'ютерну програму Biostat.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті дослідження було встановлено, що стимулятори росту із групи похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів у концентрації 0,1 % кожного впливають на кінетику росту.

У таблиці 1 подані результати вимірювання оптичної щільності мікробних суспензій P. aeruginosa ATCC 27853, P. aeruginosa ATCC 9027 та P. aeruginosa ІГН 66-16 під впливом енхансерів 0,1 % A, B або C на приладі денсилометр.

Як бачимо з таблиці 1, оптична щільність мікробних суспензій P. aeruginosa ATCC 27853, P. aeruginosa 9027 та P. aeruginosa ІГН 66-16 збільшується з часом при додаванні стимуляторів росту із групи похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів у концентрації 0,1 % кожного.

Як показано в таблиці 1, найбільша оптична щільність штаму P. aeruginosa ATCC 27853 спостерігалася при додаванні енхансера А в концентрації 0,1 % до живильного середовища та дорівнювала: 5,9 одиниць за шкалою Mc-Farland через 1 год.; 7,4 – через 3 год.; 8,0 – через 4 год.; 10,0 – через 10 год.; 14,0 – через 24 години інкубації в термостаті при температурі 37 ^{0} С. Кінцева концентрація мікробних клітин штаму P. aeruginosa ATCC 27853 через 24 години культивування майже в 2 рази перебільшувала контрольні показники.

Найбільша оптична щільність штаму P. aeruginosa ATCC 9027 спостерігалася при додаванні енхансера А в концентрації 0,1 % до живильного середовища та дорівнювала: 6,8 одиниць за шкалою Mc-Farland через 1 год., 8,6 – через 3 год., 9,0 – через 4 год.; 11,0 – через 10 год. та 14,0 – через 24 години інкубації в термостаті при температурі 37^0 С. Кінцева концентрація мікробних клітин штаму P. aeruginosa ATCC 9027 через 24 години культивування більше ніж у 2 рази перевищувала контрольні показники.

Найбільша оптична щільність штаму P. aeruginosa ІГН 66-16 спостерігалася при додаванні енхансера 0,1 % А до живильного середовища та дорівнювала: 5,7 одиниць за шкалою Mc-Farland через 1 год.; 6,2 – через 3 год.; 6,0 – через 4 год.; 8,2 – через 10 годин та 12,0 – через 24 години інкубації в термостаті при температурі 37^0 С. Кінцева концентрація мікробних клітин штаму P. aeruginosa ATCC 66-16 через 24 години культивування також у 2 рази перебільшувала контрольні показники.

Результати статистичної обробки даних таблиці 1 свідчать про те, що відмінності при різних термінах експозиції між показниками концентрації мікробних клітин при додаванні стимулятора росту А в концентрації 0,1 % та контролем статистично значущі. Це свідчить про ефективність використання енхансеру А в концентрації 0,1 % для підвищення оптичної щільності мікробних суспензій P. aeruginosa усіх вивчених штамів P. aeruginosa.

Енхансери В і С в концентрації 0,1 % суттєво не впливали на прискорення росту P.aeruginosa поза залежністю від штаму впродовж усього періоду спостереження.

Таблиця 1 - Кінетика росту штамів P. aeruginosa під впливом енхансерів

Концентрація мікробних клітин P. aeruginosa за оптичною щільністю за Mc-Farland при початковій посівній дозі 10^7 мікробних клітин**										
Експозиція	1 год		3 год		4 год		10 год		24 год	
	ρ	С, КУО/мл	ρ	С, КУО/мл	ρ	С, КУО/мл	ρ	С, КУО/мл	ρ	С, КУО/мл
P. aeruginosa АТСС 27853+0,1% А	5,9	(17,7±0,2)x10^{8*}	7,4	(22,2±0,1)x10^{8*}	8,0	(24,0±0,15)x10^{8*}	10	(30,0±0,3)x10^{8*}	14	(42±0,2)x10^{8*}
P. aeruginosa АТСС 27853+0,1% В	1,4	(4,2±0,15)x10^{8*}	1,1	(3,3±0,2)x10^{8*}	1,0	(3,0±0,1)x10^{8*}	3,0	(9,0±0,3)x10^{8*}	4,8	(14,±0,15)x10^{8*}
P. aeruginosa АТСС 27853+ 0,1 % С	0,6	(2,2±0,2)x10^{8*}	0,7	(1,8±0,2)x10^{8*}	0,6	(1,8±0,3) x10^{8*}	1,8	(5,4±0,1)x10^{8*}	5,0	(15,±0,15)x10^{8*}
P. aeruginosa АТСС 27853-контроль	0,6	(1,8±0,3)x10^{8*}	0,9	(2,7±0,15)x10^{8*}	1,3	(3,9±0,2) x 10^{8*}	2,0	(6,0±0,1)x10^{8*}	7,8	(23,4±0,2)x10^{8*}
P. aeruginosa АТСС 9027+0,1% А	6,8	(20,4±0,2)x10^{8*}	8,6	(25,8±0,1)x10^{8*}	9,0	(27,0±0,2)x10^{8*}	11,0	(33,0±0,15)x10^{8*}	14	(42,0±0,1)x10^{8*}
P. aeruginosa АТСС 9027+0,1% В	1,2	(3,6±0,15)x10^{8*}	1,8	(5,4 ±0,2) x 10^{8*}	1,7	(5,1 ±0,3)x 10^{8*}	2,2	(6,6±0,1)x10^{8*}	6,0	(18,0±0,2) x10^{8*}
P. aeruginosa АТСС 9027+ 0,1% С	0,6	(2,3±0,2)x10^{8*}	0,8	(1,8±0,2)x10^{8*}	0,6	(1,8±0,3)x10^{8*}	1,8	(5,4±0,1)x10^{8*}	5,0	(15,0±0,15)x10^{8*}
P. aeruginosa АТСС 9027–контроль	0,6	(1,8±0,3)x10^{8*}	1,0	(3,0±0,15)x10^{8*}	1,3	(3,9±0,2)x10^{8*}	2,0	(6,0±0,1)x10^{8*}	6,1	(18,3±0,15)x10^{8*}
P. aeruginosa ІГН 66-16+0,1% А	5,7	(17,1±0,3)x 10^{8*}	6,2	(18,6±0,2)x10^{8*}	6,0	(18,0±0,1)x10^{8*}	8,2	(24,6±0,15)x10^{8*}	12	(24,0±0,2)x10^{8*}
P. aeruginosa ІГН 66-16+0,1% В	1,7	(5,1±0,2)x10^{8*}	1,2	(4,8±0,3)x10^{8*}	1,3	(3,9±0,15)x10^{8*}	2,1	(6,3±0,1)x10^{8*}	5,5	(16,5±0,2)x10^{8*}
P. aeruginosa ІГН 66-16+0,1% С	0,6	(2,2±0,2)x10^{8*}	0,7	(1,8±0,15)x10^{8*}	0,5	(1,5±0,2)x10^{8*}	1,7	(5,1±0,3)x10^{8*}	5,4	(16,2±0,2)x10^{8*}
P. aeruginosa ІГН 66-16 – контроль	0,5	(1,5±0,15)x10^{8*}	0,4	(1,2±0,2)x10^{8*}	0,6	(1,8±0,1)x10^{8*}	2,0	(6,0 ±0,3)x10^{8*}	6,6	(19,8±0,2)x10^{8*}

***Примітки**: ρ- оптична щільність, одиниці; С – концентрація мікробних клітин, КУО/мл; А – ізохінолін, В – імідазол, С – піримідин, * - різниця показників статистично достовірна, ** - дані оцінюються за шкалою відповідності показників мутності мікробних суспензій в одиницях за шкалою Mc-Farland до концентрації мікробних клітин мікроорганізмів різних груп*

Кінетика росту мікроорганізмів під дією різноманітних стимуляторів вивчається давно, оскільки дія енхансерів цікава для науки та біотехнологічного виробництва. Механізм дії цих речовин до кінця не з'ясований. Тому вперше було проведено дослідження, чи будуть впливати стимулятори росту на кінетику росту штамів P. aeruginosa, оскільки в попередніх працях показано, що енхансери із груп похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів впливають на метаболітні процеси в клітинах [12].

Таким чином, проведені нами дослідження додають деякі нові результати до вирішення важливої маловивченої біотехнологічної проблеми впливу енхансерів на кінетику росту мікроорганізмів P. aeruginosa. Показано, що досліджені енхансери із груп похідних ізохінолінів, імідазолів та піримідинів по-різному впливають на кінетику росту всіх вивчених штамів P. aeruginosa.

Встановлено, що з усіх вивчених енхансерів похідне з групи ізохінолінів (А) в концентрації 0,1 % є найбільш ефективним та перспективним стимулятором росту.

ВИСНОВКИ

1. Вивчені стимулятори росту із групи похідних ізохінолінів (А) в концентрації 0,1 % впливають на кінетику росту всіх вивчених штамів P. aeruginosa : через 24 години в 2 рази збільшують концентрацію мікробних клітин порівняно з контролем.

2. Використання енхансерів із групи похідних імідазолів (В) та піримідинів (С) суттєво не впливало на інтенсивність росту всіх вивчених штамів P. aeruginosa.

Перспективи подальших досліджень будуть спрямовані на розроблення комбінацій різноманітних енхансерів та вивчення їх впливу на накопичення біомаси штамів P. aeruginosa.

SUMMARY

EFFECT OF STIMULATORS ON THE KINETICS OF GROWTH STRAINS OF P. AERUGINOSA

N.I. Gorodnitskaya, T.P. Osolodchenko
State Establishment " I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of the Academy of Medical Science of Ukraine", Kharkov

We used strains of P. aeruginosa, enhancers of the groups of derivatives isoquinoline, imidazole and pyrimidine in concentration of 0.1%. We investigated the effect of enhancers separately on the kinetics of growth strains of P. aeruginosa. As a result of researches was found that the use of activators of allosteric enzymes increased the number of microbial cells of all studied strains of P. aeruginosa. The biggest indicators of the optical density of bacterial suspensions detected by adding enhancer A in concentration of 0.1% on the scale of Mc-Farland.

Key words: *strains of P. aeruginosa, enhancers, kinetics of growth, optical density.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Влияние концентраций никотинамидадениндинуклеотида и гемина на рост Haemophilus influenzae типа В и синтез капсульного полисахарида / О.Е. Орлова, С.И. Елкина, Н.Е. Ястребова и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии : Двухмесячный научно-практический журнал. - 2005. - N 4 . - С. 12-15.
2. Иванкин А.Н. Биологически активные вещества из животной ткани и микроорганизмов. Методы получения и структурно-функциональные взаимосвязи: автореф. дис. ... д-ра хим. наук. – М., 1998. – С. 39.
3. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клинико-диагностических лабораториях. Приложение 1 к приказу МЗ СССР № 535 от 22 апреля 1985 г.
4. Aruna Jahoor, Rashila Patel, Amanda Bryan, Catherine Do, Jay Krier et al. // J. Bacteriol. - 2008. - Vol. 190, N. 13. – P. 4408-4415.
5. Crespo M.P., Woodford N., Sinclair A., Kaufmann M.E. et al. // J. Clin. Microbiol. - 2004. - 42(11). – P. 5094–5101.

6. Перт С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт. – М.: Мир, 1978. – 331 с.
7. Pier G.B. // J. Med. Microbiol. - 2007. - № 297(5). – P. 277-295.
8. Стандартизація приготування мікробних суспензій: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006. - К.: Укрмедпатентінформ, 2006. - 5 с. – (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
9. Основные методы лабораторных исследований в клинической бактериологии. - Женева, 1994.
10. Ашмарин В. Математические методы в биологии. – М.: Мир. – 1964. – С. 203.
11. Шлегель Г. Общая микробиология / Г. Шлегель – М.: Мир, 1987. – 567С.
12. Городницька Н.І., Мартинов А.В., Осолодченко Т.П.// Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: "Фармацевтична технологія та погляд у майбутнє". – Х.: Вид-во "ФаУ", 2008. – С. 241-250.

Надійшла до редакції 30 вересня 2010 р.