

Фуртат І. М., Ногіна Т. М., Михальський Л. О., Радченко О. С.,
Стенура Л. Г., Триндей О. Б.

ВПЛИВ ПОВЕРХНЕВО-АКТИВНИХ РЕЧОВИН НА ДЕЯКІ БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

У статті наведено результати дослідження впливу синтетичних поверхнево-активних речовин на деякі біологічні властивості продуцента лізину *Corynebacterium glutamicum* 22Л. Встановлено, що під впливом ПАР відбуваються суттєві зміни секреції лізину клітинами цих бактерій, їх антигенних властивостей, складу поверхневих білків і чутливості до антибіотиків.

Синтетичні поверхнево-активні речовини (ПАР) широко використовуються як дезінфекційні та мийні засоби, консерванти косметичної та фармацевтичної продукції, а також як хімотерапевтичні препарати для профілактики деяких інфекційних захворювань. Разом із тим ПАР становлять серйозну загрозу для довкілля, оскільки вони проявляють високу токсичну дію на біологічні об'єкти та можуть викликати алергічні реакції у людини. У зв'язку з широким застосуванням вказаних ксенобіотиків все більший інтерес викликає проблема їх взаємодії з мікроорганізмами. Завдяки вираженій здатності до поверхневої адсорбції ПАР накопичуються в граничному шарі рідка фаза - мікроорганізм і взаємодіють з поверхневими структурами бактеріальної клітини. У літературі наведено досить розрізнені дані стосовно впливу ПАР на біологічні властивості переважно грамнегативних бактерій. У цих бактерій під впливом синтетичних ПАР спостерігаються зміни у ліпідному складі клітин, зокрема клітинної стінки, зменшення розміру клітин, втрата рухливості, підвищення чутливості до антибіотиків тощо [1-3]. Водночас майже відсутні дані про дію ПАР на грампозитивні бактерії, зокрема коринебактерії, які дуже поширені у природі і використовуються в біотехнології як продуценти амінокислот.

У зв'язку з викладеним вище метою даної роботи було дослідження впливу синтетичних ПАР на деякі біологічні властивості *Corynebacterium glutamicum* - типового представника непатогенних коринебактерій.

Об'єктом досліджень був штам *Corynebacterium glutamicum* 22Л - промисловий продуцент лізину та його варіанти (22Л^{Var}), що отримували після 4-11 пасажів на середовищі № 53 [4], в яке додавали ПАР у концентрації 50 мг/л. У дослідях використано аніонні ПАР - ДСН (додецилсульфат натрію), генопол LRO (лаурил-

сульфат натрію), уфарол АН70 (лаурилсульфат амонію) та неіоногенні ПАР - синтанол АСЦС12 (моноалкілові ефіри поліетиленгліколю на основі первинних жирних спиртів), лутензол АТ80, лутензол АО10 (етоксирований доголанцюговий аліфатичний спирт), 3-ЕА (триетаноламін) та міранол (динатрій амфоацетат кокосової олії").

Концентрацію лізину (мкг/мл) в культуральній рідині (КР) визначали у добових культур спектрофотометричним методом [5]. Чутливість до антибіотиків вивчали диско-дифузійним методом на середовищі АГВ [6, 7]. У роботі використані такі антибіотики: карбеніцилін, оксацилін, неоміцин, тетрациклін, доксициклін, еритроміцин, олеандоміцин, левоміцетин, рифампіцин, поліміксин М, ристоміцин і фузидин.

Екстракцію поверхневих білків з інтактних клітин, електрофорез зразків у системі ПААГ-ДСН та аналіз електрофореграм проводили, як описано раніше [8]. Імуноферментний аналіз (ELISA) з цілими клітинами та препаратами поверхневих білків КС проводили із застосуванням імунної сироватки, специфічної до *C. glutamicum* 22Л [9]. Для аналізу результатів використовували комп'ютерну програму, за допомогою якої обчислювали коефіцієнт R, що характеризував ступінь антигенної подібності штамів 22Л^{ar} до вихідного штаму-імуногену [10].

Раніше нами встановлено, що навіть короткочасний вплив синтетичних ПАР на непатогенні коринебактерії призводив до зміни деяких властивостей цих бактерій [7]. Найбільш чутливим до дії вказаних сполук виявився *C. glutamicum* 22Л, тому ми вважали доцільним розширити спектр досліджуваних ознак цього штаму після більш тривалого його контакту з ПАР.

Проведені у даній роботі дослідження показали, що наявність ПАР у середовищі помітно впливала на здатність штамів 22Л^{Var} до секреції

лізину в культуральну рідину. Так, вже після чотирьох пасажів культур на середовищі з ПАР виявляли підвищення вмісту лізину в КР. Найбільш суттєвий вплив на *C. glutamicum* 22Л справляв лутензол АТ80 - кількість лізину в КР цього варіанту збільшувалась порівняно з вихідним штамом у 3 рази. Практично однаково впливали на вихід лізину в культуральну рідину ДСН, міранол, уфарол і 3-ЕА (концентрація лізину зростала в 1,5-1,6 раза), а також генопол 1 лутензол АО 10 (вміст лізину підвищувався в 2 рази). При рості на середовищі з синтанолом концентрація лізину в КР залишалась майже незмінною. Збільшення часу контакту *C. glutamicum* з ПАР з 4 до 11 пасажів супроводжувалося значно суттєвішими відмінностями у здатності штамів 22Л^{Var} до секреції лізину в КР. Зокрема, вміст лізину в культуральній рідині варіантів, що росли на середовищі з синтанолом і лутензолом АТ80, підвищувався відповідно у 4,0-4,5 рази; з ДСН та генополом - у 7,5-8,0 разів, тоді як у присутності 3-ЕА залишався на тому самому рівні, що і після 4 пасажів - 1,6-1,7 рази. Відомо, що синтез лізину у *C. glutamicum* 22Л у фазі сповільненого росту (15-30 г) відбувається переважно шляхом екструзії. У цей період у клітин продуцента спостерігається часткове набухання КС та поява на її поверхні пухирців, під деякими з яких утворюються каналці [11]. Зареєстроване у штамів 22Л^{Var} підвищення концентрації лізину в КР є одним із наслідків

безпосереднього впливу ПАР на зовнішню поверхню бактеріальних клітин, що супроводжується збільшенням проникності клітинної стінки. Отримані нами результати узгоджуються з наведеними в літературі даними про застосування ПАР для підвищення проникності КС і збільшення секреції амінокислот бактеріальними клітинами [12].

Визначення антибіотикочутливості штамів 22Л^{Var} показало, що короточасний вплив (4 пасажі) усіх досліджених ПАР сприяв формуванню стійкості до деяких антибіотиків пеніцилінового і тетрациклінового рядів (а саме карбеніциліну і доксицикліну), а також олеандоміцину. Водночас присутність ПАР у середовищі культивування практично не впливала на чутливість цих культур до оксациліну, поліміксину М і ристоміцину. Щодо інших антибіотиків, то чутливість штамів 22Л^{Var} також мала неспецифічний характер. Досліджені ПАР викликали різної міри зміни вказаної біологічної ознаки, проте не було встановлено чіткої залежності між класом ПАР та їх впливом на антибіотикочутливість штамів 22Л^{Var} (таблиця). Збільшення часу експозиції (11 пасажів) супроводжувалося значним зростанням чутливості штамів 22Л^{Var} до карбеніциліну, оксациліну та тетрацикліну (в присутності 3-ЕА і ДСН) і, як правило, не впливало, порівняно з вихідним штамом, на зміну їх чутливості до макролідів (див. таблицю). Слід підкреслити, що особливий

Таблиця. Зміни антибіотикочутливості *Corynebacterium glutamicum* 22Л після контакту з синтетичними ПАР

Антибіотики	Діаметр зони затримки росту (в мм + 1,0 мм)												
	Вихідний штам	Варіанти штаму 22Л, що росли на середовищі з ПАР, після:											
		триетаноламіну		ДСН		лутензолу АО10		лутензолу АТ80		синтанолу АСЦС12		міранолу	
		4 п	11 п	4 п	11 п	4 п	11 п	4 п	11 п	4 п	11 п	4 п	11 п
Пеніциліни:													
карбеніцилін	30	22	40	20	37	24	36	24	39	25	39	22	40
оксацилін	15	15	24	15	27	15	28	15	28	18	24	15	26
Аміноглікозиди:													
неоміцин	31	31	24	24	24	30	23	30	24	27	23	30	25
Тетрацикліни:													
тетрациклін	33	31	41	28	41	37	39	37	40	35	40	38	40
доксициклін	31	25	35	29	36	30	32	32	32	30	38	25	34
Макроліди:													
еритроміцин	22	17	22	18	20	24	23	20	25	21	20	31	23
олеандоміцин	25	15	20	15	18	20	20	20	23	21	24	17	17
Ароматичні:													
левоміцетин	30	34	31	24	37	28	40	28	30	28	38	32	40
Анзозіцини:													
рифампіцин	32	30	42	29	44	33	43	36	37	28	45	30	44
Поліпептидні:													
поліміксин М	0	0	9	0	11	0	9	0	13	0	9	0	12
Різні:													
ристоміцин	20	18	24	20	23	22	24	22	24	21	24	20	24
фузидин	31	24	37	33	35	34	34	33	34	23	36	30	33

інтерес викликає виникнення у штамів 22Л після більш тривалого контакту з ПАР чутливості до поліміксину М, який діє переважно на грамнегативні бактерії. Це може свідчити про наявність певних змін у структурі та складі клітинної стінки коринебактерій під дією ПАР. Опосередкованим підтвердженням цього є встановлений нами раніше факт втрати здатності клітин *C. glutamicum* після контакту з ПАР позитивно фарбуватися за Грамом [7]. Нами зафіксовано також зменшення резистентності штамів 22Л^{Var} після 11 пасажів до доксицикліну, ристоміцину та фузидину під впливом 3-ЕА. В окремих випадках після більш тривалого впливу ПАР спостерігали повернення чутливості деяких варіантів до вихідного стану (див. таблицю). Таким чином, виявлена нами різниця у чутливості до антибіотиків між штамми 22Л^{ag} після 4 та 11 пасажів, очевидно, є результатом реакції на стрес, якого зазнають клітини бактерій при первинному контакті з ПАР, і поступової адаптації та виникнення механізмів захисту від присутності цих сполук у середовищі.

Порівняльний аналіз електрофоретичних білкових профілів показав, що за наявністю мажорних білків з M_r 97,0; 67,0; 63,0 та 15,5-14,4 кДа та мінорних компонентів з M_r 55,0; 50,0; 44,0; 34,0-26,5; 24,0-22,0 та 19,0-17,5 кДа штамми 22Л^{Var} практично не відрізняються від вихідного штаму. Це дає підстави розглядати вказані білки як консервативні біополімери клітинної стінки *C. glutamicum* 22Л. Поряд із вищезгаданими білками в електрофоретичних профілях штамів 22Л^{Var} були виявлені біополімери, яких нема у вихідного штаму. Найменший вплив на склад індивідуальних білків КС *C. glutamicum* 22Л справляли лутензол АТ80 та 3-ЕА (рис. 1). Основні відмінності у білкових спектрах штамів 22Л^{Var}, порівняно з 22Л, зареєстровано у зонах гелю, в які мігрують біополімери з M_r від 170,0 до 97,0 кДа та з M_r від 23,0 до 35,0 кДа. Порівняно з 22Л у штамів 22Л^{Var} зареєстровано появу мінорних білків з M_r 168,0 та 32,0 кДа. Дія усіх ПАР (за винятком міранолу) супроводжувалась появою білка з M_r 107,0 кДа. Після впливу генополу, синтанолу, ДСН та лутензолу у зразках додатково ідентифікували білок з M_r 135,0 кДа, а при контакті штаму 22Л з генополом, синтанолом та ДСН - білки з M_r 130,0 та 123,0 кДа. У білкових профілях варіантів, що контактували з генополом та синтанолом, зафіксовано появу білків M_r 155,0 та 150,0 кДа. Дія усіх ПАР (окрім лутензолу та 3-ЕА) супроводжувалась появою в електрофоретичних спектрах білків у зоні гелю з M_r 75,0-66,0 кДа. Слід зазначити, що у штамів 22Л^{Var} порівняно з 22Л

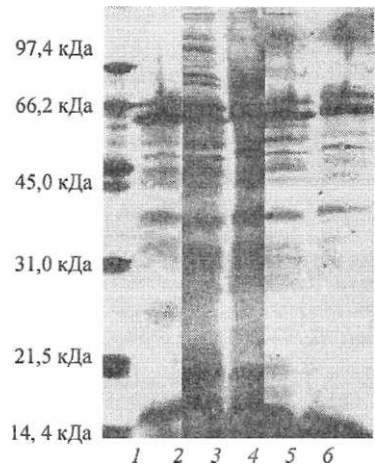


Рис. 1. Електрофореграми препаратів поверхневих білків клітинної стінки *Corynebacterium glutamicum* 22Л до (трек 2) і після культивування на середовищі з ПАР (треки 3 - 6):

/ - маркерні білки; 2 - вихідний штам; 3 - після контакту з синтанолом; 4 - після контакту з міранолом; 5 - після контакту з лутензолом АТ80; 6 - після контакту з триетаноламіном

спостерігається зникнення деяких білкових компонентів. Так, у білковому спектрі варіантів, що зазнавали впливу ДСН, лутензолу та 3-ЕА, був відсутній білок з M_r 41,0 кДа, а під дією міранолу, ДСН та лутензолу - білок з M_r 39,0 кДа.

Дослідження антигенності цілих клітин показало, що за цією ознакою штамми 22Л^{Var} відрізнялись від штаму 22Л. Зокрема, після впливу 3-ЕА, ДСН, синтанолу, міранолу та генополу штамми 22Л^{Var} за серологічними властивостями найбільше відрізнялись від вихідного штаму (рис. 2). Необхідно підкреслити, що таку зміну антигенності під дією 3-ЕА було зареєстровано як у цілих клітин, так і у препаратів поверхневих білків КС. У інших ПАР подібного ефекту не спостерігалось. Виявлені зміни в антигенності *C. glutamicum* 22Л, очевидно, пов'язані з дією досліджених ПАР на різні поверхневі компоненти клітин цього штаму, до складу

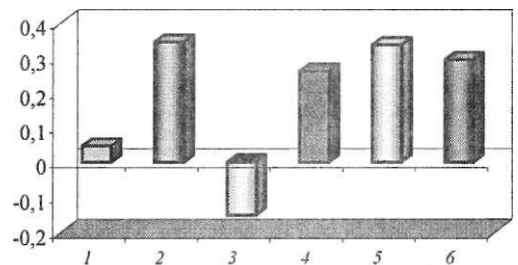


Рис. 2. Зміни антигенних властивостей *Corynebacterium glutamicum* 22Л при культивуванні на середовищі з різними ПАР (значення коефіцієнта R для штамів 22Л^{Var} порівняно з вихідним штамом):

/ - 3-ЕА; 2 - ДСН; 3 - лутензол; 4 - АСЦС12; 5 - міранол; 6 - генопол

яких входять близько 90 % полісахаридів, 10 % білків та ліпіди [13].

Таким чином, на основі отриманих даних можна стверджувати, що дія ПАР на *C. glutamicum* 22Л супроводжується суттєвими змінами їх біологічних властивостей, зокрема, чут-

ливості до антибіотиків, антигенності та складу поверхневих білків. Для виявлення механізмів впливу ПАР на поверхневі структури коринібактерій необхідне проведення подальших досліджень в умовах більш тривалого контакту бактеріальних клітин з цими ксенобіотиками.

1. *Anderes E. A., Sandine W. E., Eiliker P. R.* Lipids of antibiotic sensitive and resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* // *Can. J. Microbiol.*- 1971.- Vol. 17,- P. 1357-1365.
2. *Washman C. J., Sandine W. E., Eiliker P. R.* A strain of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to a quaternary ammonium compound (I. Physiological properties) // *J. Milk and Food Technol.*- 1976.- Vol. 39.- N 8,- P. 331-334.
3. *Nishikava K., OI S., Yamamoto T.* Induced production of acidic polysaccharide by benzalkonium chloride in a bacterium and some properties of the acidic polysaccharide produced // *Agr. and Biol. Chem.*- 1979.- Vol. 43.- N 11.- P. 2305-2310.
4. *Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH* // Catalogue of strains, 4-th ed.- 1989.- 459 p.
5. *Баздырева Н. М., Куцеба Л. С.* Спектрофотометрический метод определения лизина в культуральной жидкости *Brevibacterium* sp. 22 // *Приклади, біотехнологія,- 1974.- Т. 10.- № 5.- С. 150-158.*
6. *Gerhardt Ph.* Methods for General and Molecular Bacteriology // *Amer. Soc. for Microbiol.-Washington: D. C., 1994.-791 p.*
7. *Михальський Л. О., Радченко О. С., Фуртат І. М., Степура Л. Г.* Зміни антигенності та антибіотикочутливості коринібактерій під впливом синтетичних поверхнево-активних речовин // *Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології,- 2001.*
8. *Михальський Л. О., Фуртат І. М., Дем'яненко Ф. П., Костючик А. А.* Електрофоретичні спектри білків клітинної стінки як критерій для ідентифікації та класифікації непатогенних коринібактерій // *Укр. біохім. журн.- 2001,- Т. 73,- № 3.- С. 61-70.*
9. *Михальський Л. А., Ногіна Т. М., Фуртат І. М.* Исследование серологических свойств сапрофитных коринібактерий с помощью иммуноферментного анализа // *Мікробіол. журн.- 1997.- Т. 59,- № 5 - С. 22-27.*
10. *Михальський Л. О., Фуртат І. М., Ногіна Т. М., Веденесева О. А.* Використання комп'ютерного аналізу для оцінки антигенних взаємозв'язків різних видів коринібактерій // *Наукові записки НАУКМА. Спец. вип., - К: Видавничий дім «КМ Academia», 2001,- Т. 19,- Ч. 11.- С. 401^105.*
11. *Ancute A. Ф., Межуге Г. Р., Осе В. В.* Продуценти L-лизина из рода *Brevibacterium*: Атлас морфологических изменений,- Рига: Зинатне, 1978 - 171 с.
12. *Niederweis M, Maier E., Lichtinger T. et al.* Identification of channel-forming activity in the cell wall *Corynebacterium glutamicum* // *J. Bacteriology.- 1995.- Vol. 177.- N 19.- P. 5716-5718.*
13. *Puech V., Chami M., Lemassu A. et al.* Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane // *Microbiology - 2001,- Vol. 147- P. 1365-1382.*

/./ *M. Furtat, T. M. Nogina, L. O. Mykhalsky, O. S. Radchenko, L. G. Stepura, O. B. Trindey*

INFLUENCE OF SURFACTANTS ON SOME BIOLOGICAL PROPERTIES OF *CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM*

In this article the results of the investigation of influence of different classes of synthetic surfactants on some biological properties of the lysine producing strain of Corynebacterium glutamicum 22L are presented. The significant changes in lysine secretion by cells of these bacteria and them antigenic properties as well as of the surface proteins composition and antibiotic sensitivity to under influence of surfactants were established.