
РАДИОЛОГИЯ И РАДИОБИОЛОГИЯ, РАДИАЦИОННАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

RADIOLOGY AND RADIOBIOLOGY, RADIATION SAFETY

УДК 504.06

ИНАКТИВИРУЮЩЕЕ И МУТАГЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ ГАММА-ИЗЛУЧЕНИЯ НА ВОЗБУДИТЕЛЯ ПАРАТИФОЗНОЙ ИНФЕКЦИИ (*S. TYPHIMURIUM* 355) В МОДЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

А. И. ЕРОШОВ¹⁾

¹⁾Международный государственный экологический институт имени А. Д. Сахарова,
Белорусский государственный университет, ул. Долгобродская, 23/1, 220070, г. Минск, Беларусь

Установлено, что ионизирующее излучение оказывает мутагенное действие на возбудителя паратифозной инфекции (*S. typhimurium* 355). При гамма-облучении повреждаются основные чувствительные структуры клетки-ДНК и мембраны. В культуре облученных клеток выделены некоторые биохимические мутанты. При обычных условиях их рост не обнаружен. Только внесение в питательную среду необходимых факторов роста (набор аминокислот) в приведенном сочетании повысило их выживаемость, но патогенные свойства исчезли.

Ключевые слова: гамма-излучение; возбудитель паратифозной инфекции; ДНК; мембраны; мутанты; патогенность.

Образец цитирования:

Ерошов А. И. Инактивирующее и мутагенное действие гамма-излучения на возбудителя паратифозной инфекции (*S. typhimurium* 355) в модельных средах // Журн. Белорус. гос. ун-та. Экология. 2019. № 1. С. 40–45.

For citation:

Eroshov A. I. Inactivating and mutagenic effects of gamma-radiation on the causative agent of (*S. typhimurium* 355) paratyphoid infection in model media. *J. Belarus. State Univ. Ecol.* 2019. No. 1. P. 40–45 (in Russ.).

Автор:

Анатолий Иванович Ерошов – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры социально-гуманитарных наук и устойчивого развития.

Author:

Anatol I. Eroshov, doctor of science (biology), full professor; professor at the department of social-humanitarian sciences and sustainable development
An.Eroshov@ISEU.by

INACTIVATING AND MUTAGENIC EFFECTS OF GAMMA-RADIATION ON THE CAUSATIVE AGENT OF (*S. TYPIMURIUM* 355) PARATYPHOID INFECTION IN MODEL MEDIA

A. I. EROSHOV^a

^aInternational Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University,
23/1 Daŭhabrodskaja Street, Minsk 220070, Belarus

It is established, that the ionizing radiation processes evoke strong mutagen action. At radiation basic sensitive structures of a cell-DNA and membranes are damaged. In culture of the irradiated cells biochemical mutants have been found. In normal conditions their growth is not found. Only entering into a nutrient medium of necessary factors of growth (a set of amino acids) has raised their survival rate, but pathogenic properties have disappeared.

Key words: gamma-radiation; pathogen of paratyphoid infection; DNA; membranes; mutants; pathogenicity.

Введение

Радиочувствительность микроорганизмов, как свидетельствуют многочисленные исследования определяют условия, в которых они находились до, во время и после облучения. Она также зависит от состава среды, присутствия протекторов или сенсibilизаторов в ней, температуры, кислородного режима и других факторов. Поэтому при определении инактивирующих доз для каждого вида микроорганизмов или ассоциативной группы в целом необходимо учитывать все факторы, изменяющие радиочувствительность клеток [1; 2; 5; 6; 10].

Под влиянием окружающей среды и действия неспецифических (в природе) и специфических (техногенных) ингибиторов отдельные звенья энергетических и конструктивных процессов могут сильно видоизменяться в качественном и количественном отношении – от максимального до полного исключения с гибелью клетки. Ингибиторы роста подразделяются на специфические, действия которых направлены на определенные процессы в клетке, и неспецифические, влияющие на несколько ее функций. Рецепторами ингибиторов могут быть любые полимеры: нуклеиновые кислоты, белки, полимеры клеточной стенки и мембранные структуры. При контакте ингибитора с ДНК изменения, которые он вносит в структуру клетки, передаются потомству, вызывая изменения в генетическом материале. Связь с другими рецепторами вызывают только физиологические изменения. Мембраны, полимеры клеточной стенки, белки, РНК начинают функционировать аномально [2; 5–7; 9; 11].

При исследовании действия ионизирующего излучения на мембраны были определены трансформации заряда клеточной поверхности и электрофоретической подвижности белков, нарушения ультраструктурной организации мембран, изменения в поверхностном натяжении [7].

В механизме летального эффекта микроорганизмов главную роль играет образование пиримидиновых димеров в молекулах нуклеиновых кислот. Образование димеров ДНК ведет к гибели клеток вследствие возникновения летальной мутации, потери способности к репликации за счет нерепарированных сшивок ДНК-ДНК или ДНК-белок, или нарушения процессов транскрипции (даже в одной из молекул ДНК) [1; 2; 5]. Для определения действия гамма-излучения на микроорганизмы был выбран представитель рода паратифозных бактерий, включающий большое количество видов, названных по предложению Международного съезда микробиологов (1934 г.) *сальмонеллами* в честь микробиолога Д. Сальмона.

Паратифозные бактерии (*сальмонеллы*) по патогенным, культурально-биохимическим и антигенным свойствам имеют большое эпидемиологическое и эпизоотическое значения. Различают следующие группы *сальмонелл*: паратифозные бактерии, патогенные только для человека; паратифозные бактерии, обладающие специфической патогенностью в отношении определенных видов животных; паратифозные бактерии – мясные или пищевые отравители, вызывающие у человека тяжелую пищевую токсикоинфекцию (употребление обсемененного *сальмонеллами* мяса, молока и других продуктов).

Цель исследования – изучение инактивирующего и мутагенного действия гамма-излучения на штамм *сальмонеллы*. В статье приведены данные по определению инактивирующих доз гамма-облучения (гамма-установка – источник ¹³⁷Cs) только на тест-микробы (*S. typhimurium* 355) с целью показа методики по определению инактивирующих доз для 50 тест-микробов. Исследование выполнялось с целью подготовки проекта производственной гамма-установки по обеззараживанию сточных вод разного происхождения, загрязненных патогенными микроорганизмами, а также для разработки плана ввода ее в эксплуатацию.

Материалы и методы исследования

Опыты по определению действия гама-излучения на микроорганизмы рода *Salmonella* были проведены на штамме (*S. typhimurium* 355) в фазе экспоненциального роста. Суспензию сальмонеллы в фосфатном буфере определенной концентрации облучали возрастающими дозами гамма-квантов от 0,10 до 5,50 кГр (источник излучения ^{137}Cs , мощность дозы – 0,17 кГр /с; гамма-установка «Стимулятор»). Выживаемость облученной культуры определяли высевом на селективные питательные среды (висмут-сульфатный агар и др.) с термостатированием при 37,5 °С в течение 24–36 ч.

Вторая серия исследований была направлена на определение мутационного эффекта гамма-излучения на микроорганизмы. Обычно для индукции мутаций используют такое воздействие какого-либо фактора (физического, химического и др.), при котором выживаемость микроорганизмов составляет 0,1–0,001 %. В данных исследованиях для изучения индуцированных гамма-излучением мутаций у микроорганизмов использовали тот же штамм (*S. typhimurium* 355), выращенный на питательной среде (МПБ, МПА) в фазе экспоненциального роста при температуре 37,5 °С в течение 15–17 ч. Концентрацию жизнеспособных клеток определяли чашечным способом. Суспензию микроорганизмов в фосфатном буфере в концентрации $1,0\text{--}2,0 \times 10^6$ микробных клеток/мл облучали гамма-квантами в дозах от 2,0 до 3,0 кГр (источник излучения также ^{137}Cs , мощность дозы – 0,17 Гр/с (м. кл./мл – количество микробных клеток в одном мл среды)).

После облучения проб определяли концентрацию выживших микроорганизмов путем посева на питательную среду М-9 с пенициллином (концентрация 200 ед/мл) для снижения выживаемости прототрофов. Через 17 ч инкубации при 37 °С из разведений 10^{-1} и 10^{-2} в фосфатном буфере делали посев по 0,1 мл на питательный агар с равномерным распределением по поверхности. После 17-часовой инкубации просматривали посеы и отбирали те, на которых росло от 20 до 100 колоний. Затем методом реплик-отпечатков снимали колонии и переносили в чашки с минимальным агаром (МА). После инкубации на МА посеы просматривали и сравнивали с посевом на питательном агаре (ПА). Отбирали те колонии, рост которых на МА отсутствовал. Эти колонии предполагаемых мутантов ресуспендировали в фосфатном буфере и изучали их рост на МА и ПА с выделением мутанта.

Тестирование клонов на аутокотрофность и определение потребности мутантов в факторах роста определяли по Холлидею [2].

Факторы роста – аминокислоты, витамины, пурины и пиримидины – были приготовлены согласно методике и их вносили в минимальную среду или минимальный агар в 12 комбинациях сред [3]. Основные биохимические (сахаролитические) свойства определяли высевом на среды Гисса, патогенность – заражением белых мышей. Стерильные растворы аминокислот (стерилизация гамма излучением в дозе 25,0 кГр) вносили по 1 мл на 100 мл среды (МА).

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты опытов отражены в табл. 1. После облучения жизнеспособных клеток сальмонеллы мышинного тифа в рабочей концентрации $(969,0 \pm 86,0) \cdot 10^6$ м.кл./мл дозой 0,1 кГр концентрация жизнеспособных клеток снизилась до 10 %. При дозе 0,2 кГр жизнеспособными остаются менее 1,0 % клеток.

Таблица 1

Результаты облучения *S. typhimurium* 355 гамма-квантами в буферном растворе (мощность дозы 0,17 Гр/с)

Table 1

The results of irradiation of *S. typhimurium* 355 by gamma-quanta in a buffer solution (dose rate 0.17 Gy / s)

Концентрация жизнеспособных клеток, м. кл./мл (10^6)	Доза облучения, кГр	Концентрация выживших клеток, м.кл./мл	Инактивация, %
1	2	3	4
969,0±86,0	0,1	$97,6 \cdot 10^6$	89,92
969,0±86,0	0,2	$3,62 \cdot 10^6$	99,63
950,0±67,0	1,0	$0,76 \cdot 10^6$	99,99
950,0±66,0	2,0	820,0±38,0	99,999
1100,0±89,0	3,0	648,0±43,0	99,999
980,0±74,0	4,0	20,4±8,2	99,999
1100,0±80,0	5,0	15,0±3,0	99,999
960,0±84,0	5,5	0,0	100,00

С увеличением дозы гамма-квантов на один порядок (0,2 и 2,0 кГр) концентрация выживших микробов снижается на четыре порядка. Имеет место прямая зависимость выживаемости микроорганизмов от величины поглощенной дозы. При дозе 5,5 кГр не было выявлено жизнеспособных клеток на питательных средах в течение 7–10 дней.

В теоретической микробиологии в качестве критерия радиочувствительности выбирают такую дозу излучения, которая необходима для инактивации 63 % клеток в облучаемой среде. Так как 37 % клеток сохраняют первоначальные свойства, эта доза получила название «доза 37 %-ной сохранности» – D_{37} .

D_{37} гамма-квантов для сальмонеллы мышинного тифа 0,05 кГр. Из данных табл. 1 следует, что клетки гибнут при самых малых дозах облучения. Однако даже при самой высокой дозе некоторое число клеток сохраняет жизнеспособность.

Для изучения индуцированных гамма-излучением мутаций использовали штамм *S. typhimurium* 355, патогенный для белых мышей. В ряде серий опытов суспензию сальмонеллы в фосфатном буфере в концентрациях $1,0\text{--}2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток в 1 мл облучали гамма-квантами в дозах 2,0 и 3,0 кГр. По вышеприведенной методике было выделено шесть мутантов по ауксотрофности их потребности в аминокислотах, факторах роста (по Холлидею). Сочетания аминокислот (мг/мл) приведены в табл. 2. Сочетание факторов роста (аминокислот) с 1 по 6 в таблице по вертикали (6 факторов роста). Сочетание факторов роста с 7 по 12 – тоже 6 факторов роста. В питательные среды были внесены по одному сочетанию факторов роста.

Таблица 2

Сочетание аминокислот (факторов роста), мг/мл

Table 2

The combination of amino acids (growth factors), mg / ml

	1	2	3	4	5	6
7	аденин 5 мг/мл	биотин 1 мг/мл	фенилаланин 1 мг/мл	аланин 1 мг/мл	аргинин 1 мг/мл	лейцин 1 мг/мл
8	гипоксантин 5 мг/мл	фолиевая кислота 50 мг/мл	серин 2 мг/мл	цистеин 2 мг/мл	орнитин 2 мг/мл	глицин 2 мг/мл
9	цитозин 5 мг/мл	пантатеновая кислота 50 мг/мл	триптофан 2 мг/мл	треонин 2 мг/мл	аспарагиновая кислота 2 мг/мл	изолейцин 2 мг/мл
10	гуанин 5 мг/мл	пиридоксин 50 мг/мл	тирозин 1 мг/мл	тиосульфат натрия 5 мг/мл	пролин 1 мг/мл	гистидин 1 мг/мл
11	тимин 5 мг/мл	тиамин 1 мг/мл	р-Аминобензойная кислота 1 мг/мл	метеонин 1 мг/мл	глутаминовая кислота 1 мг/мл	лизин 1 мг/мл
12	урацил 5 мг/мл	рибофлавин 250 мг/мл	никотиновая кислота 2 мг/мл	холин 2 мг/мл	инозит 500 мг/мл	валин 2 мг/мл

Если штамм нуждался в каком-либо одном факторе роста, то он находился (по горизонтали и по вертикали) только на двух из 12 комбинаций сред (табл. 2).

В табл. 3 приведены результаты исследований выживших клеток сальмонеллы и выделенных из них мутантов путем посева на минимальный агар (МА) с двенадцатью комбинациями среды с аминокислотами.

Таблица 3

Выход ауксотрофных мутантов *S. typhimurium* 355 при гамма-облучении

Table 3

The output of auxotrophic mutants of *S. typhimurium* 355 with gamma irradiation

Показатели	Доза облучения, Гр	
	2,0 кГр	3,0 кГр
Мутаген	гамма-кванты	гамма-кванты
Способ отбора	метод реплик	метод реплик
Исследовано колоний	973	731
Из них ауксотрофов, шт	4	2
Количество ауксотрофов, %	0,41	0,27
Выживаемость, %	0,0001	0,0001

У ауксотрофных мутантов, выделенных из облученной культуры штамма *S. typhimurium* 355 дозами 2,0 и 3,0 кГр и обладающих ауксотрофностью по аргинину и по триптофану, были определены их сахаролитические свойства.

В табл. 4 приведены данные по исследованию биохимических свойств мутантов, выделенных из облученной культуры сальмонеллы мышинного тифа.

Таблица 4

Основные биохимические свойства мутантов штамма *S. typhimurium* 355

Table 4

The main biochemical properties of mutants of the strain *S. typhimurium* 355

Среда Гисса	Сахаролитические свойства микробов					
	Мутант M _{RS+ГР}		Мутант M _{RS}		Интактная культура <i>S. typhimurium</i> 355	
	Кислота	Газ	Кислота	Газ	Кислота	Газ
Маннит	—	—	—	—	+	—
Глюкоза	+	—	—	—	+	+
Лактоза	+	+	+	+	—	—
Сахароза	+	—	—	—	—	—
Дульцит	—	—	—	—	+	+
Рамноза	—	—	—	—	+	+
Арабиноза	+	—	—	—	+	+

Как следует из табл. 4, у мутантов, выделенных после облучения исходной культуры сальмонеллы дозами 2,0 и 3,0 кГр, утрачено свойство сбраживать манит, глюкозу (газ), дульцит, рамнозу и арабинозу. После облучения дозой 2,0 кГр было исследовано 973 колонии и выделено 4 мутанта.

При испытании клонов на ауксотрофность при определении потребности мутантов в разных аминокислотах, факторах роста (по Холлидею) установлено, что выделенные мутанты обладают полиауксотрофностью (сочетание 5 и 9). Выращенная культура мутантов на среде с этим сочетанием аминокислот (факторов роста) была суспендирована в концентрации $2,0 \times 10^6$ жизнеспособных клеток в 1 мл и введена группе белых мышей (15 животных). Все подопытные белые мыши выжили. Контрольные белые мыши (15 животных), которым была введена интактная (необлученная) культура *S. typhimurium* 355, погибли в течение двух суток.

Закключение

Из анализа экспериментальных данных следует, что инактивация бактериальной клетки (при ионизирующем излучении) может наступить вследствие повреждения структур и клеточных мембран. Современные исследования свидетельствуют, что в микробной клетке излучениями повреждаются основные чувствительные структуры – ДНК и мембраны. В настоящее время достаточно данных о том, что гибель облученных клеток является следствием взаимодействия повреждений, возникающих как в ДНК, так и в клеточных мембранах, а также и в других структурах, поврежденных излучением. Установлено, что ионизирующее излучение является сильным мутагенным фактором. При воздействии излучения энергия в клетке распределяется неравномерно, и летальный эффект может быть связан с повреждением любых структур, адсорбировавших энергию. В наших исследованиях были применены дозы облучения, приводящие к низкому уровню выживаемости ($10,0 \times 10^{-5}$) жизнеспособных клеток. Выживаемость облученных бактерий определяется обычно по количеству выросших колоний на полноценной среде (мясо-пептонный агар (МПА)) и минимальной среде М-9 с 20 % содержанием глюкозы и одной из 12 комбинаций факторов роста. Методами реплик-отпечатков выделено шесть биохимических (ауксотрофных) мутантов. Установлено, что они растут только на полноценной питательной среде (МПА) и не выделяются на минимальной глюкозо-солевой среде М-9.

Таким образом, при внесении ряда аминокислот в минеральную среду удалось повысить выживаемость облученных клеток штамма *S. typhimurium* 355. Использование среды М-9 и набора факторов роста (5 и 9), в которых имеется глутаминовая, аспарагиновая кислоты и фенилаланин, входящих в состав белков клеточной стенки грамотрицательных бактерий, показало, что ионизационное воздействие на бактерии привело к нарушению синтеза этих аминокислот в микробной клетке.

Нами исследованы биохимические свойства мутантов сальмонеллы мышинного тифа. Анализ свидетельствует об их низких сахаролитических свойствах. Опытами установлено, что патогенные признаки у мутантов утрачены. С клеточной стенкой (мембраной) связаны биохимические процессы, обеспечивающие нормальную жизнедеятельность клетки и ее деление. Можно предположить, что любой фактор, повреждающий мембрану, приводит к изменению биохимии клетки, а при сложности строения мембран, любые нарушения обуславливают изменения биохимических процессов общего характера, в том числе и патогенности.

Обсуждая конечные итоги исследований, можно констатировать, что гамма-излучение является эффективным средством инактивации патогенной микрофлоры, имеющей эпизоотическое и эпидемиологическое значения. По результатам исследований выполнен проект экспериментально-производственной установки по обеззараживанию сточных вод в сельскохозяйственном предприятии «Боровляны» Минского р-на Республики Беларусь.

Библиографические ссылки

1. Мясник М. Н. Генетический контроль радиочувствительности бактерий. М., 1984.
2. Ли Д. Е. Действие радиации на живые клетки: пер. с англ. М., 1988.
3. Lea D. E. Actions of radiation on living cells. Cambridge, 1946.
4. Павлович С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией. Минск, 2008.
5. Воробьев А. А., Быков А. С., Пашков Е. П. и др. Микробиология: учебник. М., 1998.
6. Гаевская Б. М. О природе радиочувствительности биологических объектов // Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. М., 1983. С. 67–75.
7. Bresler S. E., Noskin L. A., Stepanova J. M., et al. Mechanism of the Radioprotecting Action of Chemical Compounds on Escherichia coli Cells. // Mol. and Gen. Genet. 1978. Vol. 163, No 1. P. 75–85.
8. Бергельсон Л. Д. Биологические мембраны. М., 1975.
9. Бутото Н. В., Гребенюк А. Н., Легеца В. И. и др. Основы медицинской радиобиологии. СПб, 2004.
10. Коггл Дж. Биологические эффекты радиации. М., 1986.
11. Жизнеспособность клеток, облученных в малых дозах / под ред. Т. А. Альпер. М., 1980.
12. Мясник М. Н., Скворцов В. Г. Роль генотипа в модификации кислородного эффекта у клеток Escherichia coli. // Проблемы природной и модифицированной радиочувствительности. М., 1983. С. 148–154.

References

1. Myasnik M. N. [Genetic control of the radiosensitivity of bacteria]. Moscow, 1984 (in Russ.).
2. Lea D. E. [Actions of radiation on living cells]. Moscow, 1988 (in Russ.).
3. Lea D. E. Actions of radiation on living cells. Cambridge, 1946.
4. Pavlovich S. A. [Microbiology with virology and immunology]. Minsk, 2008 (in Russ.).
5. Vorobev A. A., Bykov A. S., Pashkov E. P., et al. [Microbiology]: textbook. Moscow, 1998 (in Russ.).
6. Gaevskaya B. M. [About the nature of the radiosensitivity of biological object]. *Problems of natural and modified radiosensitivity*. M., 1983. P. 67–75 (in Russ.).
7. Bresler S. E., Noskin L. A., Stepanova J. M., et al. Mechanism of the Radioprotecting Action of Chemical Compounds on Escherichia coli Cells. *Mol. and Gen. Genet.* 1978. Vol. 163, No 1. P. 75–85.
8. Bergelson L. D. [Biological membranes]. Moscow, 1975 (in Russ.).
9. Butomo N. V., Grebenyuk A. N., Legeza V. I., et al. [Fundamentals of Medical Radiobiology]. St. Petersburg, 2004 (in Russ.).
10. Coggle J. [Biological Effects of Radiation]. Moscow, 1986 (in Russ.).
11. Alper. T. A. (ed.). [The viability of cells irradiated in small doses]. Moscow, 1980 (in Russ.).
12. Myasnik M. N., Skvortsov V. G. [The role of the genotype in the modification of the oxygen effect in Escherichia coli cells]. *Problems of natural and modified radiosensitivity*. Moscow, 1983. P. 148–154 (in Russ.).

Статья поступила в редколлегию 02.11.2018.
Received by editorial board 02.11.2018.