

УДК 576.809.518

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. Д. Азатян, А. М. Диланян

О биологической активности ацетиленовых гликолей

(Представлено чл.-корр. АН Армянской ССР А. К. Паносяном 10/VII 1972)

В числе значительного количества различных ацетиленовых соединений, проявивших активность в качестве дефолиантов, репеллентов, аттрактантов насекомых и пестицидов, а также различную физиологическую активность в отношении теплокровных животных, в последние годы в литературе появились также единичные упоминания отдельных ацетиленовых соединений, обладающих активностью по отношению к микроорганизмам. Например, в качестве бактерицида—нитритный эфир 3-метилбутин-1-ола-3⁽¹⁾, против *X. phaseoli* и *Staph. aureus*-1,4-бис(дихлорацетокси)бутин-2 и 1,4-бис(йодацетокси)бутин-2⁽²⁾, 5-нитро-2-фурилфенилацетиленилкетон, проявивший бактериостатическое действие против *Staph. aureus* и *Bac. mycoides*⁽³⁾, 2-бутиндиол-1,4-бис(этилксантат), проявивший подавляющее действие на *Staph. aureus* и *Asp. niger*⁽⁴⁾, некоторые изотиомочевинные производные бутин-2 и бутин-2-ола-1, задерживающие рост *Mycobact. 607*⁽⁵⁾. Сведений же о биологической активности ацетиленовых спиртов и гликолей в отношении бактерий кишечной группы в открытой печати нет.

Было интересно выяснить действие ацетиленовых гликолей на кишечные бактерии. С этой целью в качестве объекта исследования из ацетиленовых соединений были взяты простые симметричные γ -гликоли: 2,5-диметилгексин-3-диол-2,5 и 3,6-диметилоктин-4-диол-3,6, а из бактерий—22 штамма кишечной палочки, включая 12 эталонных штаммов патогенных и апатогенных форм. Опыты были проведены в 1969 г.

Культивирование кишечных палочек производилось на полноценной питательной среде (МПБ) и на синтетической среде М-9 и ее модификации. Изучались морфологические и культуральные свойства кишечной палочки.

Биологическое действие гликолей проверялось по изменению концентрации бактериальных суспензий фотоэлектроколориметром модели ФЭК-М и активной кислотности (рН) в жидких культурах рН-метром ЛПУ-01, в различные сроки наблюдения, и определялось количество

общего белка турбидиметрическим методом в нативных бактериальных суспензиях.

Проведенные опыты показали определенную биологическую активность 3,6-диметилноктин-4-диола-3,6 в отношении всех 22 изученных штаммов.

В табл. 1 приведены результаты исследования 12 штаммов кишечной палочки—патогенных и апатогенных форм—на синтетической питательной среде М-9 с 0,4% глюкозы и ее модификации—с добавлением к солевой основе ацетиленового гликоля и маннита в количестве по 0,4%. Наблюдения проводились по прошествии 24 и 48 часов.

Как видно из таблицы, первые шесть штаммов—патогенные штаммы *E. coli*—довольно интенсивно размножаются в синтетической среде М-9 с глюкозой в течение 24—48 часов: оптическая плотность суспензий по сравнению с исходной увеличивается в 2—3 раза. Оптическая плотность суспензий *E. coli* *commune* увеличивается в 3,5—4 раза, а *E. coli* *communiog*—в 4—6,5 раз. Происходят значительные изменения рН той же среды М-9 в результате расщепления глюкозы этими штаммами.

При добавлении же к солевой основе среды М-9 ацетиленового гликоля в качестве источника углерода, вместо глюкозы, все 12 штаммов кишечной палочки не размножились и не изменили реакцию среды, тогда как при посеве из бактериальных суспензий на МПА и среду Эндо имел место рост культур. Следовательно, гликоль оказал бактериостатическое действие—ингибировал рост и размножение бактериальных клеток кишечной палочки.

В качестве контроля в опыт был включен также шестиатомный спирт—маннит, обычно достаточно интенсивно расщепляющийся кишечными палочками с образованием кислоты и газа. Все шесть патогенных штаммов, а из апатогенных форм все три штамма *E. coli* *commune* и один штамм *E. coli* *communiog* достаточно интенсивно расщепляли маннит, в результате чего изменился и рН среды. Два штамма *E. coli* *communiog* меняют рН среды в пределах слабокислой реакции—рН 6,1, несмотря на максимальное увеличение бактериальной биомассы—более чем в шесть раз. При расщеплении маннита у патогенных форм и частично у *E. coli* *commune*, ферментативные процессы, по-видимому, доминируют над конструктивными, в то время как у *E. coli* *communiog* наблюдается превалирование конструктивных процессов над ферментативными.

Установив биологическое действие гликоля на различные штаммы кишечной палочки, интересно было проверить и активность различных его концентраций. С этой целью опыты были поставлены с одним штаммом—*E. coli* *commune* 846.

К солевой основе синтетической среды М-9 были добавлены 0,1, 0,2, 0,4 и 0,8% гликоля, а в контрольные колбы—по 0,4% глюкозы и маннита. Наблюдения велись в течение десяти дней. Результаты этого опыта иллюстрированы рисунками 1, 2 и 3. Из приведенных кривых по динамике изменений концентраций бактериальных клеток, рН в куль-

туральной жидкости и общего количества белка нативных бактериальных клеток видно, что после 24 часов инкубации при 37°, при окислении глюкозы и маннита значительно увеличивается бактериальная биомасса—в 2 и 2,5 раза, соответственно, и резко падает рН среды, а при

Таблица 1

Изменение оптической плотности и рН бактериальных суспензий различных штаммов кишечной палочки при культивировании на синтетических средах

№№ по порядку	Культуры	ОП* исходной бактериальной суспензии	Контроль				Опыты				Контроль				
			Среда М-9 (с глюкозой)				Среда М-9 (с ацетиленовым гликолем)				Среда М-9 (с маннитом)				
			через 24 часа		через 48 часов		через 24 часа		через 48 часов		через 24 часа		через 48 часов		
			ОП	рН	ОП	рН	ОП	рН	ОП	рН	ОП	рН	ОП	рН	
1	E. coli	145	0,22	0,49	5,10	0,58	5,74	0,19	6,78	0,25	6,80	0,46	5,25	0,48	5,45
2	" "	408	0,22	0,47	4,98	0,50	5,28	0,17	6,80	0,17	6,85	0,41	5,80	0,45	5,76
3	" "	0111	0,24	0,49	5,19	0,47	5,30	0,14	6,80	0,20	6,84	0,35	5,90	0,44	5,52
4	" "	055	0,22	0,74	5,22	0,75	5,32	0,20	6,78	0,21	6,83	0,55	5,30	0,60	5,46
5	" "	086	0,27	0,67	5,30	0,57	5,32	0,20	6,80	0,24	6,82	0,57	5,40	0,54	5,52
6	" "	026	0,29	0,85	5,12	0,85	5,32	0,28	6,80	0,27	6,84	0,78	5,25	0,76	5,42
7	" commune	86	0,23	0,87	5,43	0,86	5,26	0,18	6,80	0,23	6,84	0,71	5,40	0,75	5,46
8	" "	846	0,30	1,00	5,66	1,00	5,82	0,30	6,80	0,30	6,84	0,92	5,76	0,93	5,76
9	" "	675	0,18	0,86	5,25	0,88	5,35	0,12	6,80	0,17	6,85	0,70	5,40	0,71	5,60
10	" communior	815	0,19	0,85	5,10	0,84	5,49	0,15	6,80	0,18	6,83	0,66	5,40	0,63	5,45
11	" "	7-8/9	0,25	1,00	5,85	1,10	5,90	0,20	6,80	0,26	6,84	1,00	6,05	1,10	6,10
12	" "	1715	0,18	1,10	6,10	1,20	6,26	0,16	6,80	0,21	6,84	1,00	6,10	1,10	6,23
13	Контроль		0,00	0,00	6,78	0,00	6,85	0,00	6,83	0,00	6,85	0,00	6,81	0,00	6,84

* ОП—оптическая плотность.

наличии в среде различного количества добавок ацетиленового гликоля сдвигов почти не наблюдается. При наименьшей примененной концентрации—0,1%—гликоля намечается небольшой подъем общего количества белка нативной бактериальной суспензии по сравнению с высокими концентрациями гликоля. По-видимому это обусловлено морфологическими и биохимическими изменениями самих бактериальных клеток кишечной палочки.

Сопоставление приведенных биологических показателей указывает на определенную их взаимосвязь: с увеличением концентрации бактериальных клеток увеличивается количество общего белка, а в результате активно действующих ферментативных систем резко падает рН среды; последнее более выражено при окислении маннита.

При окислении глюкозы через два дня инкубации незначительно снижаются концентрация бактериальных клеток и общее количество белка, а рН повышается. В дальнейшем увеличиваются концентрация бактериальных клеток и количество их общего белка, достигая максимума на шестой день инкубации. Неуклонно повышается рН среды. На десятый день инкубации отмечен спад концентрации бактериальных

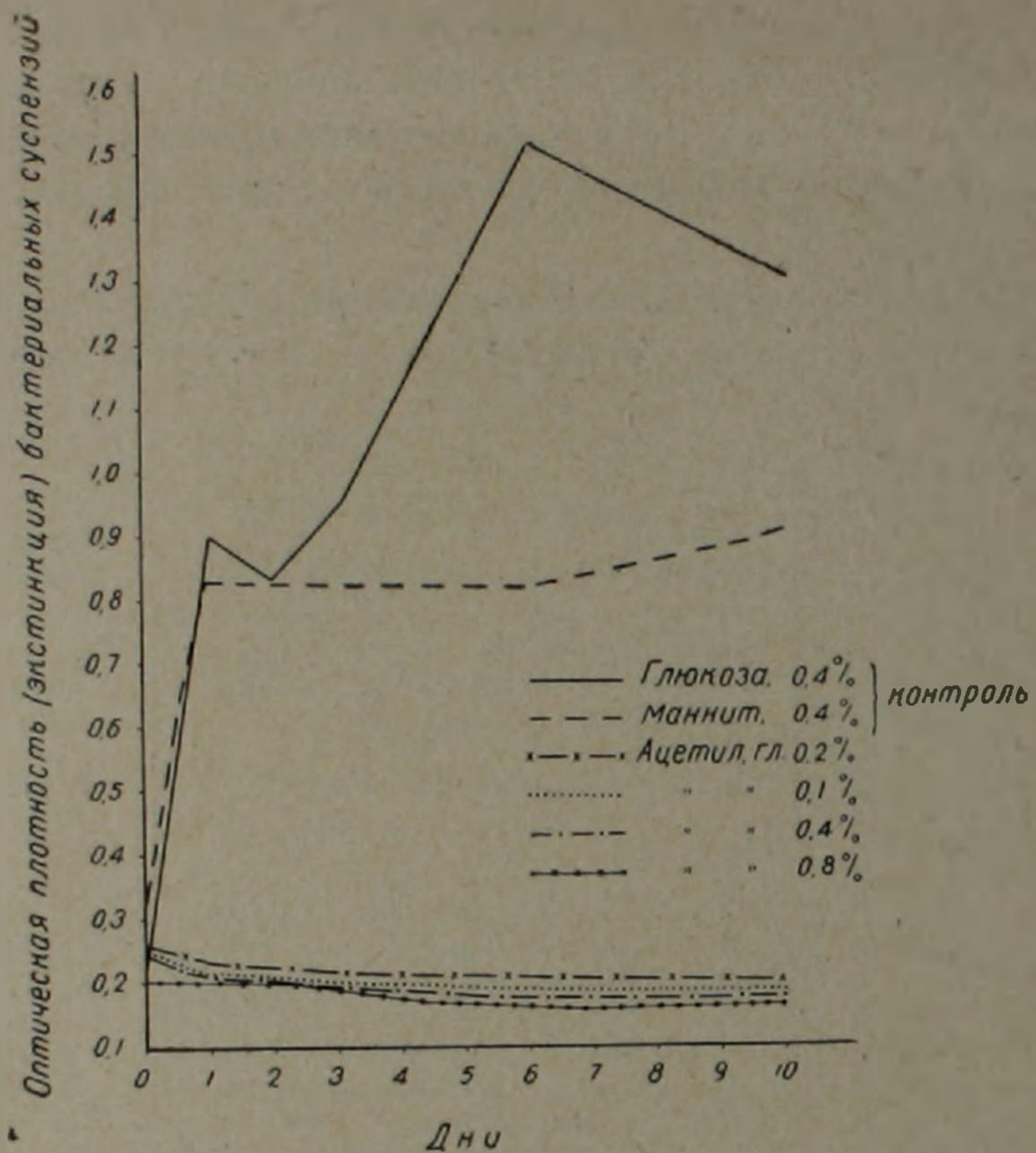


Рис. 1. Динамика изменения концентрации бактериальных клеток *E. coli* commune 846 при культивировании на синтетической среде с различными концентрациями ацетиленового гликоля

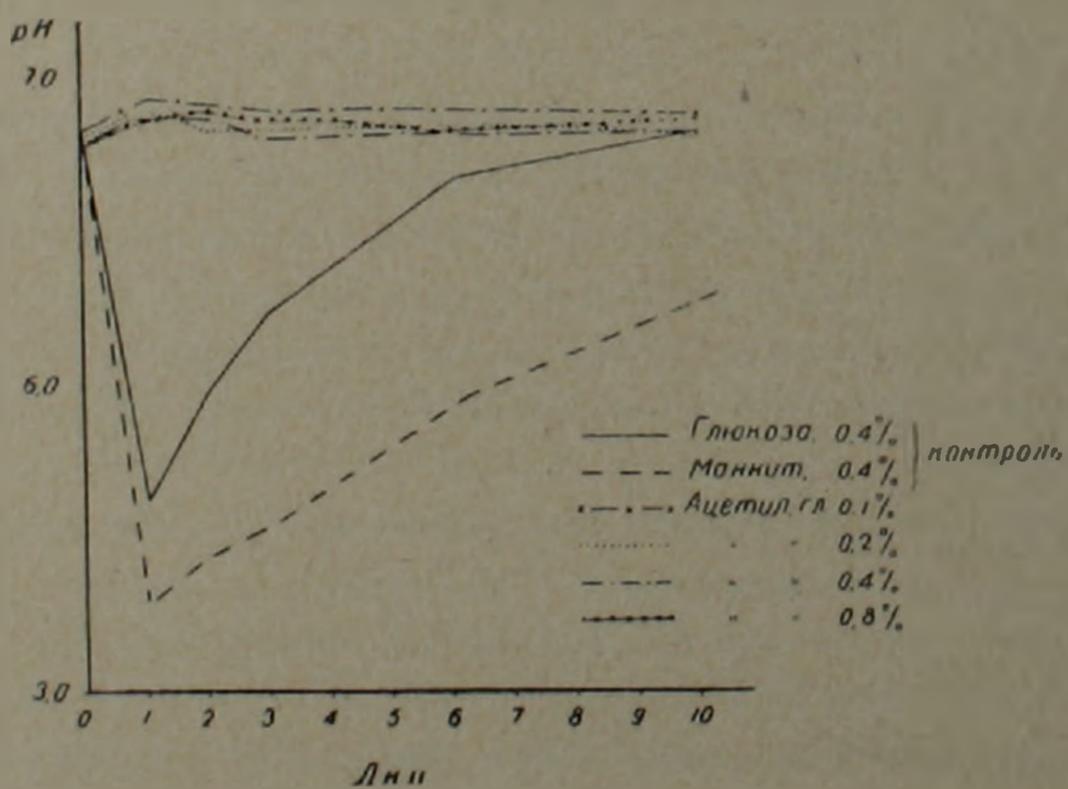


Рис. 2. Динамика изменения pH в культуральной жидкости *E. coli* commune 846

клеток и количество общего белка, а pH повышаясь, достигает исходной точки, приближаясь к нейтральной реакции.

При расщеплении маннита оптическая плотность бактериальной

суспензии остается постоянной со второго дня по шестой день измерения. Имеются небольшие количественные сдвиги содержания белка по шестой день наблюдения, а рН повышается. Все указанные показатели достигают максимума на девятый день инкубации. В течение этого

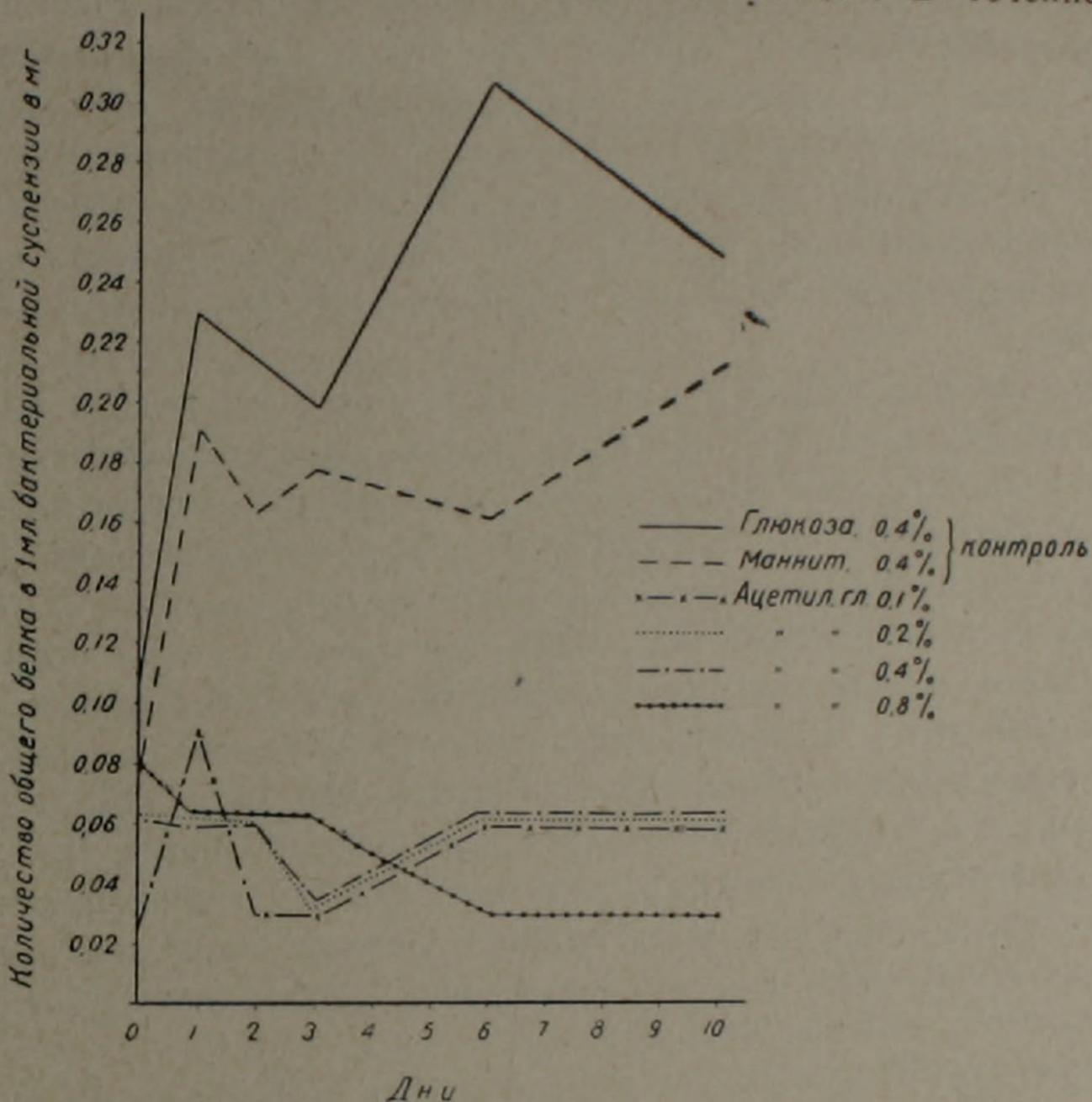


Рис. 3. Динамика изменения общего белка нативных бактериальных клеток *E. coli commune* 846

периода наблюдения количество биомассы *E. coli commune* 846 и общий белок культуры отстают от данных при окислении глюкозы. Сравнительно низкие показатели рН, то есть сильное подкисление среды, при окислении маннита, возможно, обусловлено ранним биосинтезом соответствующих активных ферментативных систем. Со второго дня рН среды повышается, но к концу срока наблюдения отстает от исходной реакции, что может быть связано с дезаминированием белковых компонентов бактериальных клеток в результате истощения источника углеводного питания—маннита.

В средах, содержащих различные концентрации ацетиленового гликоля, оптическая плотность бактериальной суспензии *E. coli commune* 846 и рН среды не изменились в течение десятидневного наблюдения, незначительны были изменения в белковом балансе бактериальных тел; под действием 0,1% ацетиленового гликоля количество белка уменьшается на вторые сутки, оставаясь на этом уровне до десятого дня. Добавление 0,2% гликоля снижает количество белка через 24 часа, оставляя его на этом уровне в течение последующих 24 часов, но к третьему дню определения оно снижается. При 0,4% гликоля коли-

чество белка остается на исходном уровне в течение первых двух дней, к третьему дню падает, как и при концентрации 0,2%. К шестому дню количество бактериального белка увеличивается вдвое при концентрациях 0,1, 0,2 и 0,4% гликоля; на этом уровне остается до десятого дня инкубации при 37°. Действие 0,8% гликоля на белковые компоненты бактериальных клеток *E. coli* commune 846 не сказывается в течение первых трех дней, количество общего белка остается на исходном уровне; к шестому дню оно уменьшается в два раза, оставаясь на этом уровне до десятого дня определения. Таким образом, ацетиленовый гликоль в концентрациях 0,1, 0,2 и 0,4% оказывает бактериостатическое, а при концентрации 0,8% — бактерицидное действие на *E. coli* commune 846.

Микроскопия мазков бактериальных суспензий, окрашенных по Граму, показала, что бактериальные клетки на средах М-9 (с глюкозой) и маннитом грамотрицательны, полиморфны, окружены белым ореолом. При росте на синтетической среде с маннитом редко наблюдаются утолщенные и укороченные формы.

При культивировании этого штамма в солевой среде с 0,1% раствором ацетиленового гликоля наблюдаются грамотрицательные палочки с белым ореолом, удлиненные и нитевидные формы, в связи с чем увеличивается и количество общего белка, о чем было сказано выше. Встречаются и «грамположительные» кокковидные формы. При увеличении концентрации гликоля в среде наблюдаются грамотрицательные палочки, очень слабо окрашивающиеся, контуры бактерий не ясны, расположены кучками, а не в одиночку или попарно, имеются «грамположительные» кокковидные формы.

Посев бактериальных суспензий из среды М-9 (с глюкозой) и маннитом на МПА дал обычные светло-желтые гладкие колонии с темно-желтым центром, посев на среду Эндо из суспензии среды М-9 (с глюкозой) — красные колонии (густой рост), а из среды с маннитом были получены два типа колонии: обычные красные, на периферии которых росли дочерние, бледно-розового цвета, и почти бесцветные лактозоотрицательные.

Посев бактериальных суспензий из среды с 0,1% гликоля на МПА дал светло-желтые колонии с темно-желтым центром, а на Эндо-красные колонии с гладкой поверхностью. При высоких концентрациях гликоля выращенные культуры *E. coli* commune 846 дали на Эндо колонии на подобие почкующейся дрожжевой клетки: на периферии обычной круглой колонии росла другая дочерняя колония, по величине меньшая соседней; на МПА колонии имели более интенсивно-желтую окраску. У некоторых колоний наблюдалась радиальная исчерченность (при 0,2% гликоля), лимonoобразные и круглые колонии светло-желтого цвета (при 0,4%); при 0,8% концентрации гликоля рост на Эндо и МПА отсутствовал.

Проведенное исследование позволяет нам отметить следующее: 3,6-диметил-октин-4-диол-3,6 обладает определенной биологической

активностью по отношению к кишечной палочке, вызывая морфолого-физиологические изменения, а при сравнительно высоких концентрациях оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие. Гликоль действует на биосинтез белка, оказывая ингибирующее действие на рост и размножение *E. coli* commune 846, в результате чего через 24 часа инкубации были обнаружены удлиненные и нитевидные формы с выраженным увеличением общего количества белка. Кроме того, он действует и на сложную структуру клеточной стенки бактерий, меняя ее ригидность, эластичность, внутриклеточное осмотическое давление, повреждает клеточную стенку, превращая клетки этого штамма в сферопласты или протопласты с сохранением специфических функций исходных форм штамма, чем и обусловлено отсутствие роста и размножения на синтетической и полноценной питательных средах в присутствии ацетиленового гликоля и пышный рост без него. Наличие «грам-положительных» кокковидных форм, наряду с полярной зернистостью палочковидных форм *E. coli* commune 846, и сглаживание контуров бактериальных клеток также позволяет сделать вышеприведенные заключения.

Лаборатория химической физики
Академии наук Армянской ССР

Վ. Գ. ԱԶԱՏՅԱՆ, Ա. Մ. ԳԻՂԱՆՅԱՆ

Ացետիլենային գլիկոլների կենսաբանական ակտիվության մասին

Մանրենների նկատմամբ ացետիլենային գլիկոլների ակտիվության մասին գրականության մեջ տվյալներ չկան:

Ներկա աշխատանքում շարադրված է ախտածին և ոչ ախտածին աղիքային ցուպիկների 22 շտամի, մասնավորապես 12 էտալոնային շտամների նկատմամբ ացետիլենային պարզ, սիմետրիկ γ -գլիկոլներից մեկի՝ 3,6-դիմեթիլօկտին-4-դիոլ-3,6-ի ազդեցությունը: Պազված է, որ այդ ացետիլենային գլիկոլը ունի սրտչակի կենսաբանական ակտիվություն՝ առաջ է բերում աղիքային ցուպիկների ձևաբանական և ֆունկցիոնալ փոփոխություններ, ընդ որում 0,1-0,4% կոնցենտրացիայով գործադրվելիս ցուցաբերում է բակտերիոստատիկ, իսկ 0,8% կոնցենտրացիայով գործադրվելիս՝ բակտերիցիդ հատկություն: Գլիկոլն արգելակում է աղիքային ցուպիկների բազմացումը, առաջանում են երկար թելանման ձևեր, ազդում է սպիտային փոխանակության վրա, բակտերիալ բջջապատի բարդ կառուցվածքի վրա, փոփոխելով նրա առաձյականությունը, կարծրությունը, ներբջջային օսմոտիկական ճնշումը, վնասելով բջջապատը, բակտերիալ բջիջները վերածելով սֆերոպլաստների կամ պրոտոպլաստների, շխախտելով աղիքային ցուպիկների սկզբնական ձևերի յուրահատուկ ֆունկցիաները և դրանով էլ պայմանավորում լիարժեք և սինթետիկ միջավայրերում աղիքային ցուպիկների աճման արգելակումը:

ЛИТЕРАТУРА — ФРЕНЧОВИ ПРОЗОРЪ

¹ Патент США 2,955,131 (С. А. 55, 9279i, 1961). ² Патент США 2,931,754 (С. А. 54, 14563e, 1960). ³ Сб. Химия ацетилена, Изд. «Наука», М., 1968, стр. 427. ⁴ Пат. США 3,404,173 (С. А. 70 (17), 77360v, 1969). ⁵ S. Umezawa, I. Uchida, K. Osada, Proc. Fujihara Mem. Fac. Eng. Keio Univ. (Tokio), 12 (44), 12, 1959 (С. А. 54, 19479i, 1960).