

УДК 579.252.55

А. Ф. Казанчян, С. Т. Мнацаканов, Н. М. Арутюнян,  
Р. А. Бегларян, М. А. Погосян, Р. А. Захарян

### Влияние магнитного поля на бактерию *Salmonella derby* К 89

(Представлено чл.-корр. АН Армении К. Г. Карагезяном 15/XI 1990)

Геоманнитное поле—важный экологический фактор, флюктуация которого отражается на морфолого-культуральных<sup>(1)</sup> и биохимических свойствах микроорганизмов: изменяется химический состав, антигенная структура, вирулентность, устойчивость к антибиотикам, фагам, облучению ультрафиолетом<sup>(1, 2)</sup>.

Постоянные магнитные поля, как и электромагнитные, могут вызывать прямые мутации, но чаще влияют на электрохромосомальные генетические структуры, которые при этом репрессируются или элиминируются<sup>(1)</sup>.

В связи с этим представлялось актуальным выяснить влияние постоянного магнитного поля на спектр антибиотикоустойчивости и возможные изменения в экстрахромосомальном генетическом аппарате бактерии кишечной группы *Salmonella derby* штамм К 89. В составе этой бактерии имеется трансмиссибельная плазмида, при мультимеризации которой образуются олигомерные и катенированные формы, причем доминирующими являются мономер и димер<sup>(3)</sup>.

В данной работе исследовалась структурно-функциональная изменчивость плазмиды рSD *S. derby* К 89 в культуре, обработанной магнитными полями различных напряженностей.

Бактерии *S. derby* штамма К 89 выращивали в бульоне, приготовленном из основе рыбной пасты (50 г пасты на 1 л воды, рН 7,6), при температуре 37°. Обработку электромагнитным полем культуры клеток в концентрации  $10^6$ — $10^7$  клетка/мл проводили при комнатной температуре в пермеометре сильных полей напряженностью  $0,48$ — $0,6 \times 10^6$  А/м в экспозиции от 30 до 150 мин. Клетки для исследований выращивали на рыбной агаризованной среде с добавками пенициллина, хлорамфеникола, стрептомицина в каждом отдельном случае. Инкубацию вели в течение 18—20 ч при 37°. В следующей серии опытов штамм *S. derby* К 89 непрерывно культивировали в постоянном магнитном поле (ПМП).

напряженностью  $0,48 \times 10^5$ — $0,192 \times 10^6$  А/м в течение 24 ч при температуре 37°. Для определения устойчивости к антибиотикам обработанные ПМП клетки высевали на агаре с добавками антибиотиков: пенициллина (15—50 мкг/мл), стрептомицина (100—300 мкг/мл), хлорамфеникола (10—500 мкг/мл).

Плазмидные ДНК выделяли по Бэрибойму—Доли (4). Трансформацию проводили согласно методу, описанному в (5). Определение вирулентности культур ( $LD_{50}$ ) проводили по методу Рида и Менча (6). Конечную величину вычисляли по формуле

$$LD_{50} = \frac{50 - \text{процент летальности при низшей критической дозе}}{\text{процент летальности при высшей критической дозе} - \text{процент летальности при низшей критической дозе}}$$

Энтеротоксикогенность испытуемых культур определяли на модели лигированных отрезков тонкой кишки кролика по методу (7). Гемолитическая активность определялась на специально разработанной плотной питательной среде, состоящей из аминокептида, эритроцитарно-кислотного гидролиза и глюкозы, с добавлением 5%-ной цитратной крови (8).

Фимбриальные антигены эдгезии типа СFA I и СFA II определялись в реакции Д-маннозорезистентной гемагглютинации с эритроцитами человека II группы крови, цыплят и бычьими эритроцитами. В опыт бралась 3%-ная взвесь эритроцитов (9—11).

Антигены К 88, К 99, *vir* были определены в реакции микроагглютинации на стекле с помощью антисывороток, полученных с помощью экспериментальной иммунизации кроликов культурами *E. coli* К 12 К 88<sup>+</sup>, *E. coli* К 12 К 99<sup>+</sup>, *E. coli* К 12 *vir*<sup>+</sup> с последующей сорбцией сывороток живой изогенной культуры *E. coli* К 12 (К 88<sup>-</sup>, К 99<sup>-</sup>, *vir*<sup>-</sup>). Применялись сыворотки, проверенные на специфичность в перекрестных реакциях агглютинации с культурами *E. coli* К 12 К 88<sup>+</sup>, *E. coli* К 12 К 99<sup>+</sup>, *E. coli* К 12 *vir*<sup>+</sup>.

Результаты показали, что бактерии *S. derby* К 89 как при длительном воздействии ПМП напряженностью  $0,48$ — $0,6 \times 10^6$  А/м, так и при непрерывном культивировании в ПМП напряженностью  $0,48 \times 10^5$ — $0,192 \times 10^6$  А/м оказались магнитоустойчивыми и указанные дозы существенно не влияли на рост бактерий (рис. 1, табл. 1). Вместе с тем при тестировании на устойчивость к антибиотикам бактерий, обработанных магнитным полем, выявлена повышенная, по сравнению с контролем, устойчивость к хлорамфениколу: максимальная (концентрация хлорамфеникола в случае *S. derby* К 89 составляет 25 мкг/мл при пассировании в селективных условиях), а в случае культуры, обработанной ПМП,— 500 мкг/мл. При этом устойчивость к пенициллину ( $Pen^r$ ) и стрептомицину ( $Sm^r$ ) оставалась неизменной (20 мкг/мл и 0,5 мг/мл соответственно) (табл. 2).

Одни из хлорамфениколустойчивых магнитных вариантов обозначен нами *S. derby* К 89 М и исследован на наличие в нем плазмиды рSD. Опыты показали, что *S. derby* К 89 М содержит все олигомерные формы плазмиды рSD. Можно отметить увеличение доли высокомолекулярных мультимеров плазмиды рSD в *S. derby* К 89 М (рис. 2.).

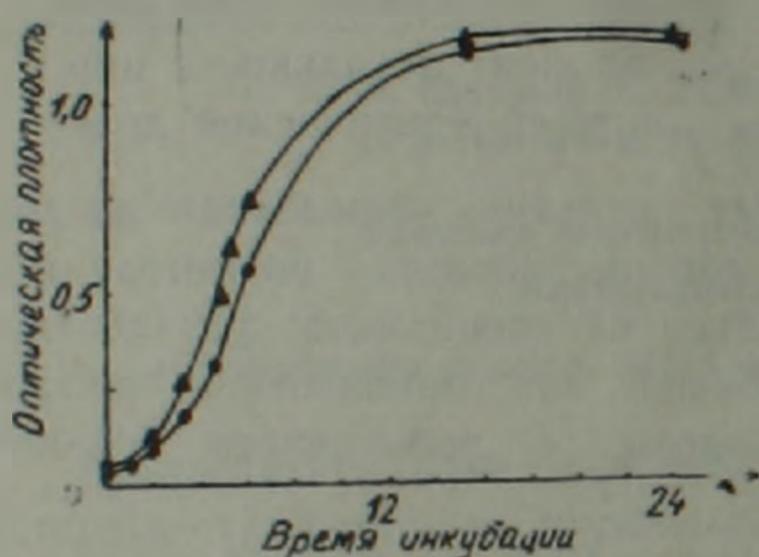


Рис. 1. Характеристика роста бактерий *S. derby* К 89 (●) и *S. derby* К 98 М (▲)

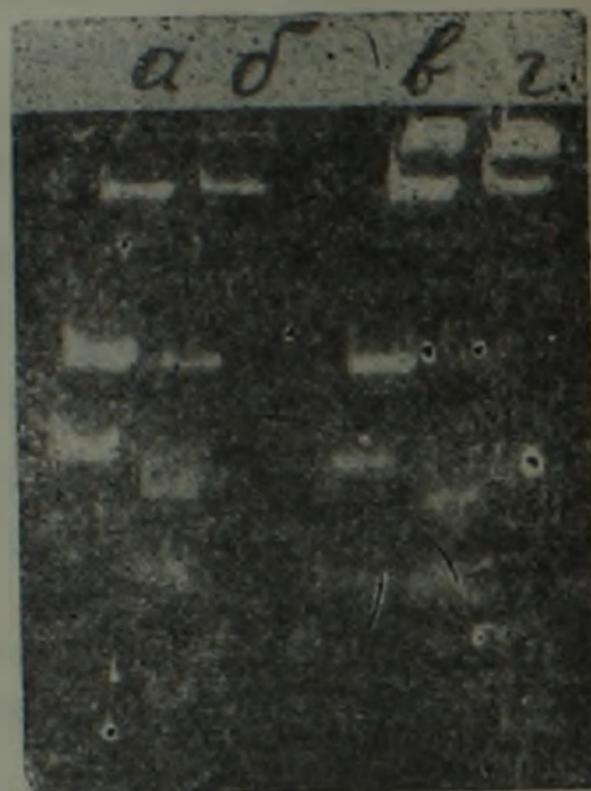


Рис. 2. Электрофореграмма плазмидной ДНК *S. derby* К 89 (в, г) и *S. derby* К 89 М (а, б) — препараты плазмид, обработанные DN-нуклеазой

Представляло определенный интерес выяснить, сохраняется ли высокая устойчивость к хлорамфениколу в других штаммах? С этой целью были поставлены опыты по трансформации бактерий-реципиентов *E. coli* HB 101 и *S. typhimurium* AG-64 плазмидой рSD) обработанного ПМП *S. derby* К 89 М. Оказалось, что данная плаزمида трансформирует бактерии-реципиенты с относительно низкой частотой по сравнению с соответствующей плазмидой дикого штамма *S. derby* К 89 ( $2 \pm 0,1 \times 10^4$  на мкг ДНК), при этом повышенная устойчивость к хлорамфениколу (500 мкг/мл) передается клетке-реципиенту.

Таким образом, основываясь на приведенных данных, можно отметить высокую устойчивость бактерии *S. derby* К 89 к воздействию магнитного поля. В отличие от *Staphylococcus aureus*, плазмидная активность которого резко подавляется под влиянием колебаний естественного поля (1), плазмидные ДНК *S. derby* К 89 обладают повышенной магнитоустойчивостью, причем в условиях среднего магнитного поля особенно активизируются процессы олигомеризации низкомолекулярных плазмид в высокомолекулярную форму, что одновременно сопровождается повышенной устойчивостью к одному из антибиотиков, а именно к хлорамфениколу. Полученный результат свидетельствует, что выявляемая устойчивость обработанной магнитом *S. derby* К 89 М и устойчивость трансформантов есть результат локальных структурных изменений в самой молекуле трансформирующей ДНК плазмиды,

вероятно, влияющей на эффективность экспрессии гена *cat*. Выявленные генетические эффекты магнитного поля в отношении *S. derby* К 89 имеют принципиальное значение для понимания тех эпидемиологических последствий, которые способна вызвать магнитная возмущенность внешней среды.

Таблица 1

Влияние постоянного магнитного поля на антибиотикоустойчивость штамма *S. derby* К 89

Антибиотики мкг/мл	$H = 750$			$H = 1300$		
	Время экспозиции					
	30 мин	60 мин	120 мин	1-е сутки	2-е сутки	3-ьи сутки
Пенициллин, 20	+	+	+	+	+	+
Хлорамфеникол, 25	+	+	+	+	+	+
Стрептомицин, 50	+	+	+	+	+	+

Таблица 2

Устойчивость к антибиотикам у культур *S. derby* К 89 и *S. derby* К 89 М

Культура	Пенициллин, мкг/мл				Флорамфеникол, мкг/мл								Стрептомицин, мкг/мл			
	10	20	40	60	10	25	50	100	150	200	400	500	100	1000	5000	8750
<i>S. derby</i> К 89	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>S. derby</i> К 89 М	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Под влиянием постоянного магнитного поля могут изменяться и такие свойства биологических агентов, как, например, вирулентность и патогенность. Нами была исследована вирулентная активность штамма *S. derby* К 89 и обработанного ПМП *S. derby* К 89 М. Вирулентность определяли по степени  $LD_{50}$ . Сопоставление величин  $LD_{50}$  у дикого штамма *S. derby* К 89 и обработанного ПМП *S. derby* К 89 М показало, что величина  $LD_{50}$  у мутанта *S. derby* К 89 М (0,37) меньше значения  $LD_{50}$  дикого штамма *S. derby* К 89 (0,5), т. е. мутант обладает несколько большей степенью вирулентности.

Известно, что патогенность—это комплексный полидетерминантный признак бактерий. Одно из важнейших свойств, имеющих значение в определении патогенности, заключается в способности бактерий прикрепляться к поверхности инфицируемых клеток, что обеспечивается наличием у бактерий поверхностных антигенов—адгезинов. При определении антигенов CF AI, CF AII, К 88, К 89 и *vir* у бактерий *S. derby* К 89 и *S. derby* К 89 М оказалось, что как дикий штамм, так и мутант содержат одинаковый набор антигенных структур, а именно: К 88, К 89, *vir* и не содержат CF AI и CF AII.

Нами была проанализирована и способность к синтезу энтеротоксина бактерий *S. derby* К 89 и *S. derby* К 89 М. Из результатов проведенных операций стало очевидно, что мутант *S. derby* К 89 М, в отличие от дикого штамма *S. derby* К 89, не синтезирует энтеротоксин.

Анализ результатов сравнительного изучения патогенности у бактерий штамма *S. derby* К 89 и мутанта *S. derby* К 89 М приводит к выводу о том, что некоторое повышение вирулентности мутанта *S. derby* К 89 М может быть обусловлено не энтеротоксигенным, а иными факторами патогенности.

В этой связи магнитное поле указанных параметров может рассматриваться как одна из возможных причин изменения физиологических свойств микробов в естественных условиях.

Институт экспериментальной биологии Академии наук Армении  
Армянский научно-исследовательский институт эпидемиологии, вирусологии  
и медицинской паразитологии Минздрава Армении

Ա. Յ. ՂԱԶԱՆՉՅԱՆ, Ս. Տ. ՄՆԱՅԱԿԱՆՈՎ, Ե. Մ. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ,  
Ռ. Ա. ԻՅՎԱՐՅԱՆ, Մ. Ա. ՊՈՂՈՍՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

### Մագնիսական դաշտի ազդեցությունը *Salmonella derby* К 89 բակտերիայի շտամի վրա

*S. derby* К 89 վայրի շտամը պարունակում է R-պլազմիդ, որն ունի մոնո- և օլիգոմերի Մագնիսական դաշտի ազդեցության տակ նկատվում է անտիբիոտիկակայունության զգալի աճ (20 անգամ) բլորամֆենիկոլի հանդեպ: Այդ բարձր կայունությունը պահպանվում է տրանսֆորմատների և էքսկոնյուգանտների մոտ: Կայունության աստիճանը ստրեստումիցիկի և պենիցիլինի հանդեպ նույնն է, ինչ որ վայրի շտամի մոտ:

*S. derby* К 89 մագնիսական շտամի և վայրի շտամի համեմատական ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ էնտերոտոքսինի սինթեզը մուտանտի բջիջներում ճնշված է, միևնույն ժամանակ երկու շտամները պարունակում են ադհեզիվ գործոնների նույն ամրոզությունը (К 88, К 89, VIG), իսկ վիրուլենտության աստիճանի տարբերությունը աննշան է:

### ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- 1 С. А. Павлович, Магниточувствительность и магнитовосприимчивость микроорганизмов, Беларусь, Минск, 1981.
- 2 А. М. Опалинская, Л. Т. Агулова, Влияние естественных и искусственных электромагнитных полей на физико-химическую и элементарную биологическую систему, Томский гос. ун-т, 1984.
- 3 А. Ф. Казанчян, Биол. журн. Армении, т. 38, № 11, с. 1016—1020 (1985).
- 4 Н. С. Blaholmi, J. Doly, Nucl. Acids Research, v. 7, № 6, p. 1513—1523 (1979).
- 5 С. Я. Дитятин, В. Н. Ильяшенко, Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1978, № 9, с. 135—136, 1978.
- 6 М. С. Захарова, Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунологии, № 10, с. 71—75, 1946.
- 7 De S. N. Chatterje D. N., J. Pathol., v. 66, № 2 p. 559—562 (1973).
- 8 С. Т. Мнацаканов, М. Н. Кэцинян, В. Г. Луходед и др. авт., свидетельство № 1004470 от 19.11.1982.
- 9 D. G. Evans, F. G. Evans, Infect. and Immun., v. 21, № 2, p. 617—633 (1978).
- 10 D. G. Evans, F. G. Evans, W. S. Tjoa, H. L. Du Pont, Infect. and Immun., v. 19, № 2, p. 722—736 (1978).
- 11 D. G. Evans, F. G. Evans, W. S. Tjoa, Infect. and Immun., v. 18, № 2, p. 330—337 (1977).