

Експериментальна медицина та морфологія

УДК[537.868+534-8]:579.871.1:577.152.321(045)

Т.І. Антушева

ВПЛИВ ФІЗИЧНИХ ЧИННИКІВ НА АКТИВНІСТЬ α -АМІЛАЗИ КОРИНЕБАКТЕРІЙ

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМНУ», м. Харків

Резюме. Вивчена зміна амілолітичної активності музейних штамів коринебактерій дифтерії залежно від впливу низькочастотних ультразвукових коливань (УЗ) та міліметрових хвиль електромагнітного випромінювання (ЕМП) у частотних діапазонах 61,1 ГГц та 42,2 ГГц. Встановлено підвищення активності α -амілази після монофакторної дії міліметровими хвилями використаних частотних діапазонів (більшою мірою при дії

частоти 42,2 ГГц). Від комбінованої дії УЗ та ЕМП-хвиль рівень амілазної активності був менший, ніж після використання тільки ЕМП. Після дії тільки УЗ не виявлено підвищення активності α -амілази.

Ключові слова: амілолітична активність, α -амілаза, коринебактерії дифтерії, ультразвук, міліметрові хвилі.

Вступ. Сьогодні все більше науковців вивчають реакції живих істот, у тому числі і мікроорганізмів, на вплив різних фізичних чинників [1,8,11,20]. Встановлено, що певні абіотичні чинники спроможні викликати адаптивні зміни біологічних властивостей бактерій, що може призводити до посилення як інвазивних, так і патогенних властивостей [2,11,18,20]. У природному середовищі на формування біоценозів мікроорганізмів одночасно впливають багато абіотичних чинників, тому в експериментальних досліджах доцільно відтворювати не тільки монофакторний вплив, але й сумісну дію фізичних чинників на бактеріальні клітини [1,12]. Серед фізичних чинників значну увагу в дослідників привертають як міліметрові хвилі в різних частотних діапазонах, так і ультразвукові коливання (УЗ) [3,6,7,9,18,20]. Вони належать до найперспективніших факторів для розробки нових технологій одержання біологічно активних речовин.

Патогенні мікроорганізми є паразитами, що використовують для життєдіяльності вже готові поживні субстрати, застосовуючи низку ферментів, необхідних для споживання речовин [4,8,13]. Енергія, яка при цьому виділяється, йде для підтримки життєдіяльності, росту та розмноження. Бактерії не можуть накопичувати значну кількість запасних речовин, тому вони залежать безпосередньо від поживних речовин субстратів. Відомо, що універсальним джерелом енергії є глюкоза, проте в «чистому» виді вона міститься не в кожному субстраті.

Представники збудника дифтерії характеризуються тим, що метаболічні процеси в них представляють собою високоінтегральні реакції з участю амілаз. Це розширює коло субстратів, що

можуть бути використані для живлення патогенними коринебактеріями за рахунок здатності їх розщеплювати такі складні полісахариди, як крохмаль. До того ж, участь зазначених ензимів свідчить про можливість суттєвих за інтенсивністю змін катаболітичних та анаболітичних процесів у клітинах *C. diphtheriae*. Таке ствердження базується на тому, що амілази відносяться за кількістю молекул субстрату, що ферментуються в одиницю часу даними ферментами, до найактивніших серед усіх відомих ензимів [16,17]. Тому цілеспрямований пошук шляхів підвищення чи зниження активності амілаз у патогенних коринебактерій має важливе теоретичне та практичне значення.

Мета дослідження. Вивчити можливості зміни катаболітичної активності коринебактерій дифтерії, зокрема активності α -амілази, під впливом сумісної та монофакторної дії ультразвукових коливань і електромагнітних полів (ЕМП).

Матеріал і методи. Активність α -амілази визначали в мкг/мл мікробної суспензії амілокластичним методом (за основу обраний уніфікований метод Каравея, що нами модифікований) [10,14,21] у музейних штамів патогенних коринебактерій (*Corynebacterium diphtheriae variant gravis*) до та після застосування фізичних чинників.

Суспензію мікроорганізмів готували і доводили до оптичного стандарту каламутності 1,0 одиниць за шкалою McFarland за допомогою приладу Densi-La-Meter (Lachema, Чехія) згідно з інструкцією до приладу та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006 "Стандартизація приготування мікробних суспензій", м.Київ. Синхронізацію

культур проводили за допомогою дії низької температури [19].

Джерелами мікрохвильового випромінювання служили стандартні височастотні генератори Г4-141 і Г4-142 з діапазоном частот для Г4-141: $f_1=37,5-53,57$ ГГц; для Г4-142: $f_2=53,57-78,33$ ГГц та середньою щільністю потоку потужності $0,1$ мВт/см². При дії електромагнітним полем опромінювані об'єкти знаходилися на відстані $L \approx 5-7$ см від площини апертури, тобто в ближній зоні антени. Для створення ультразвукових (УЗ) коливань використовували стандартний генератор ГЗ-109 на частоті випромінювання 60 кГц та ультразвуковий пристрій ТУ 3468-001-42369179-03 на частоті 130 кГц. Пробірки з бактеріальною суспензією також розташовувалися в ближній зоні випромінювача. Крім того, проведено дослідди при розташуванні ультразвукового випромінювача частоти 130 кГц безпосередньо в суспензії бактерій. Усі використані в досліді прилади фізичних індукторів надані Інститутом радіофізики та електроніки ім. О.Я. Усикова НАН України згідно з договором про науково-практичне співробітництво від 01.09.2009 р.

Діапазон та тривалість впливу фізичними чинниками змінювали згідно з потребами дослідів:

1. Опромінення ультразвуком з частотою 130 кГц від 30 хвилин до 8 годин;
2. Опромінення ультразвуком з частотою 60 кГц від 30 хвилин до 8 годин;
3. Опромінення міліметровими хвилями з частотою $42,2$ ГГц або $61,0$ ГГц упродовж 1 години;
4. Опромінення ультразвуком з частотою 60 кГц від 30 хвилин до 7 годин з наступним опроміненням міліметровими хвилями з частотою $42,2$ ГГц упродовж 1 години;
5. Опромінення міліметровими хвилями з частотою $42,2$ ГГц упродовж 1 години з наступним опроміненням ультразвуком з частотою 60 кГц від 30 хвилин до 7 годин;
6. Опромінення ультразвуком з частотою 60 кГц від 30 хвилин до 7 годин з наступним опроміненням міліметровими хвилями з частотою $61,0$ ГГц упродовж 1 години;

7. Опромінення міліметровими хвилями з частотою $61,0$ ГГц упродовж 1 години з наступним опроміненням ультразвуком з частотою 60 кГц від 30 хвилин до 7 годин.

Контролем були клітинні суспензії коринибактерій без обробки фізичними чинниками.

Досліди проводили у $3-5$ повторюваннях. Результати обробляли статистично за допомогою персонального комп'ютера із застосуванням комп'ютерних програм Statistica-6, пакета прикладних програм для обробки медико-біологічної інформації "BMDP". Достовірність розбіжностей визначали за допомогою критерію t – Стьюдента, з обчисленням середньої величини M , середньоквадратичного відхилення S , середньої похибки величини m , значення достовірності p . Для аналізу одержаного матеріалу проводилось його групування за атрибутивними та варіаційними ознаками. У результаті зведення матеріалу при підрахунках одиниць спостережень отримані абсолютні числа, які виражали описові і кількісні ознаки. Подальша обробка експериментальних даних здійснювалась у відповідності з правилами рядової і альтернативної варіаційної статистики [5,15].

Результати дослідження та їх обговорення. При дослідженні ферментативної активності α -амілази опромінених УЗ музейних штамів *C.d.gravis* встановлено, що в контрольних зразках активність зазначеного ферменту достовірно вища, ніж у всіх досліджуваних пробах, незалежно від тривалості дії на них ультразвуку. Так, після впливу УЗ у частотному діапазоні 130 кГц активність α -амілази менша порівняно з контрольними зразками на 26% при дії на культури УЗ упродовж 3 годин та на 9% при опроміненні культур УЗ упродовж 2 та 4 годин, і тільки при дії ультразвуку на зразки культур упродовж 8 годин їх амплілітична активність досягала значення контрольних штамів. При застосуванні УЗ з частотою 60 кГц всі опромінені зразки мали нижчі значення активності амілази не тільки порівняно з контрольними культурами, але й з тими продуцентами, на які діяли УЗ з частотою 130 кГц (рис.1).

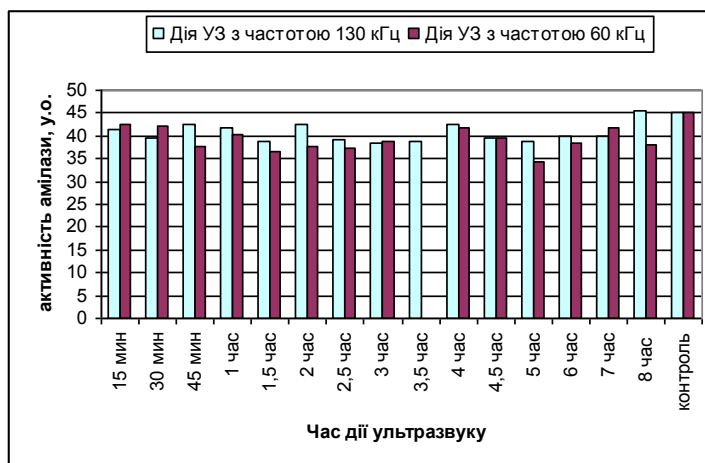


Рис.1. Активність α -амілази музейних штамів коринибактерій дифтерії після впливу ультразвуком у частотних діапазонах 60 кГц та 130 кГц (обробка у пробірках)

Схожі результати отримані при знаходженні джерела УЗ безпосередньо в суспензії музейних мікроорганізмів. При обробці продуцентів УЗ у частотному діапазоні 130 кГц упродовж 4,5-5 годин активність α -амілази збільшувалась тільки на 7% порівняно з контрольними зразками (рис.2). Обробка мікробних суспензій упродовж 1,5-3 годин, навпаки, призводила до інгібування

на 25% ферментативної активності взятих у досліді штамів. Таким чином, при дії УЗ з частотою 130 кГц як безпосередньо на мікробну завись, так і на мікробну завись у пробірках, спостерігається аналогічне зниження амілазної активності коринебактерій при дії УЗ упродовж 1,5-3 годин та деяке збільшення після дії УЗ 4-4,5 години.

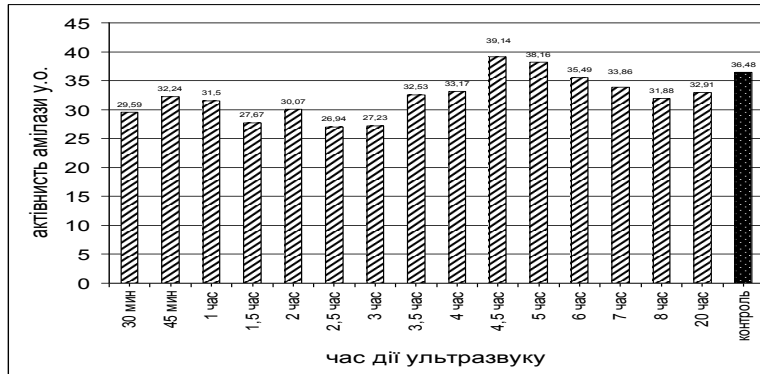


Рис.2. Активність α -амілази музейних штамів коринебактерій дифтерії після впливу ультразвуком у частотному діапазоні 130 кГц при розташуванні випромінювача безпосередньо в бактеріальній суспензії

Таблиця

Активність α -амілази музейних штамів *C.d.gravis* залежно від способу застосування ультразвуку та електромагнітних полів (мкг/мл мікробної суспензії)

Фізичні чинники	Середні показники активності α -амілази (M \pm m), мкг/мл							
	УЗ** 0,5год	УЗ** 1год.	УЗ** 2год.	УЗ** 3год.	УЗ** 4год.	УЗ** 5год.	УЗ** 6год.	УЗ** 7год.
Опромінення ЕМП з частотою 61,1 ГГц упродовж 1 год + УЗ з частотою 60 кГц	51,1 $\pm 16,8$	53,2 $\pm 17,4$	61,9 $\pm 9,6$	57,8 $\pm 12,9$	45,6 $\pm 4,8$	47,9 $\pm 5,4$	36,7 $\pm 1,2$	36,0 $\pm 1,8$
УЗ з частотою 60 кГц + опромінення ЕМП з частотою 61,1 ГГц упродовж 1 год	46,2 $\pm 4,7$	41,8 $\pm 10,8$	34,5 $\pm 4,7$	20,8 $\pm 16,8$	34,8 $\pm 3,6^*$	33,0 $\pm 4,9$	32,4 $\pm 5,0$	34,7 $\pm 6,6$
Опромінення ЕМП з частотою 42,2 ГГц упродовж 1 год + УЗ з частотою 60 кГц	205,4 $\pm 11,5^*$	130,3 $\pm 28,8^*$	173,6 $\pm 34,2^*$	194,0 $\pm 10,8^*$	196,4 $\pm 2,4^*$	183,8 $\pm 13,2^*$	165,2 $\pm 34,8^*$	161,8 $\pm 4,8^*$
УЗ з частотою 60 кГц + опромінення ЕМП з частотою 42,2 ГГц упродовж 1 год	45,3 $\pm 1,8$	60,1 $\pm 8,4^*$	60,7 $\pm 16,8$	66,7 $\pm 22,8$	67,3 $\pm 11,4$	60,0 $\pm 4,8^*$	60,1 $\pm 9,0^*$	67,9 $\pm 11,4$
УЗ з частотою 60 кГц	38,7 $\pm 11,4$	46,8 $\pm 15,6$	53,2 $\pm 11,4$	40,7 $\pm 14,0$	36,5 $\pm 3,6$	29,9 $\pm 4,8^*$	20,8 $\pm 16,2$	20,2 $\pm 6,6^*$
Опромінення ЕМП з частотою 61,1 ГГц упродовж 1 год	95,8 $\pm 16,2^*$ (без застосування УЗ)							
Опромінення ЕМП з частотою 42,2 ГГц упродовж 1 год	228,8 $\pm 5,6^*$ (без застосування УЗ)							
Контроль культур	41,7 $\pm 1,2$ (без застосування фізичних чинників)							

Примітка. - * різниця статистично значима (p<0,05) відносно контролю;
 ** - тривалість дії УЗ з частотою 60 кГц у годинах

У таблиці представлені середні показники активності α -амілази *C.d.gravis*, які отримані при дослідженні музейних штамів, залежно від способу послідовної дії на них міліметровими електромагнітними хвилями певного частотного діапазону та УЗ низької частоти різної тривалості за часом дії.

З даних таблиці видно, що дія лише одного фізичного чинника на біооб'єкти (ультразвукова чи електромагнітна) викликала в продуцентів різні ефекти. Так, обробка низькочастотним УЗ патогенних коринебактерій упродовж 0,5 – 4 годин не викликала зміни активності досліджуваного ферменту, а більш тривала дія УЗ призводила до зниження на 28 – 56 % здатності продуцентів розщеплювати крохмаль. По-іншому реагували штами на застосування електромагнітних хвиль. Опромінення їх у частотному діапазоні 61,0 ГГц упродовж 1 години призводило до підвищення амілазної активності у 2,3 раза, а дія ЕМП у частотному діапазоні 42,2 ГГц – у 5,5 раза ($p < 0,05$).

Комбінований вплив зазначених факторів на продуценти ензиму призводив до зниження стимулювальної дії електромагнітного опромінення і залежав від послідовності застосування чинників. Більш високі показники активності ферменту зафіксовані при початковому опроміненні біооб'єктів електромагнітними хвилями з подальшим впливом УЗ. Зворотне застосування чинників призводило до зниження інтенсивності ферментативного розщеплення субстрату. Так, опромінення штамів у частотному діапазоні 61,0 ГГц упродовж 1 години з подальшим впливом УЗ 60 кГц упродовж 0,5-5 годин зумовлювало від 10% до 60% (залежно від часу обробки УЗ) вищу активність α -амілази, ніж при першочерговому застосуванні УЗ.

Опромінення мікробної суспензії міліметровими хвилями з частотою 42,2 ГГц з подальшим ультразвуковим впливом підвищувало активність ензиму в середньому в 3 рази порівняно зі зразками, спочатку обробленими УЗ, а потім електромагнітними хвилями цієї частоти.

Висновки

1. Монофакторне застосування ультразвуку зумовлює зменшення амілазної активності коринебактерій порівняно зі штамми, неопроміненіми фізичними чинниками;

2. Монофакторний вплив електромагнітних хвиль міліметрового частотного діапазону 42,2 ГГц на коринебактерії викликає в них підвищення активності ферменту в 5,5 раза, а при частотному діапазоні 61,1 ГГц – у 2,3 раза;

3. Комбінований вплив електромагнітного випромінювання та ультразвукових коливань низьких частот на збудників дифтерії призводить до певного підвищення активності α -амілази, але меншого, ніж від монофакторної дії міліметрових хвиль.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні змін метаболічних процесів

для розуміння адаптивних реакцій мікроорганізмів під впливом різноманітних фізичних чинників.

Робота виконана в рамках НДР ДУ «ІМ ім. І.І. Мечникова АМНУ» «Вплив електромагнітних полів у широкому діапазоні частот на біологічні властивості збудників дифтерії та кашлюку», № держреєстрації 0103U001403 і «Застосування електромагнітних полів (ЕМП) для посилення утворення окремих метаболітів та підвищення стабільності біологічних властивостей їх продуцентів», № держреєстрації 0107U001639.

Література

1. Балаклиец Н.И. Экология и микроорганизмы / Н.И. Балаклиец, П.А. Тагаев. – Харьков: ХОО «НЭО «ЭкоПерспектива», 2008. – 176 с., 16 ил.
2. Барабай В.А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы / В.А. Барабай. – К: Фитосоцицентр, 2006. – 424 с.
3. Бойко М.М. Вивчення впливу ультразвуку на кінетику вилучення біологічно активних речовин з рослинної сировини / М.М. Бойко, О.І. Зайцев // Укр. ж. клін. та лаб. мед. – 2008. – Т. 3, № 3. – С. 53-55.
4. Борзова Н.В. Глюкоамілаза мікроорганізмів. Біосинтез, властивості, механізм дії та практичне застосування / Н.В. Борзова, О.В. Гудзенко, Л.Д. Варбанець // Біотехнологія. – 2009. – Т. 2, № 1. – С. 9-23.
5. Гельман В.Я. Медицинская информатика: практикум / В.Я. Гельман. – [2-е изд.]. – СПб.: Питер, 2002. – 480 с.
6. Зубченко В.С. Вплив ультразвукової обробки на стійкість напоїв бродіння / В.С. Зубченко, О.П. Вітряк, В. Ткаченко // Харчова промисловість. – 2008. – № 7. – С. 51-53.
7. Исаенко Е.Ю. Ультразвуковая дезинтеграция *Bordetella pertussis* на различных стадиях развития субпопуляций / Е.Ю. Исаенко, Н.Ю. Шкодовская: сб тез. 12-й Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых [«Биология – наука XXI века»], (10-14 ноября 2008 г.). – Пущино, 2008. – С. 265-266
8. Казначеев В.П. Биосистема и адаптация / В.П. Казначеев. – Новосибирск: Сибирское отделение АМН СССР, 1991. – 73 с.
9. Калініченко С.В. Вплив електромагнітних полів на біологічні властивості токсиноутворюючих коринебактерій: дис...канд. мед. наук: 03.00.07 / Калініченко Світлана Вікторівна. – Харків, 2006. – 166 с.
10. Колб В.Г. Клиническая биохимия: Пособие для врачей-лаборантов / В.Г. Колб, В.С. Камышников. – Минск: Изд-во «Беларусь», 1976. – 312 с.
11. Колпакова С.Д. Исследование особенностей динамики развития бактериальной популяции в условиях слабого стационарного магнитного поля / С.Д. Колпакова, Г.А. Колпакова // Вестник СамГУ (Естественнонаучная серия). – 2005. – № 5 (39). – С. 179-187.

12. Корж О.П. Основы эволюции: [навчальний посібник для студентів вищих навчальних закладів] / О.П. Корж. – Суми: Університетська книга, 2006. – 381 с.
13. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: [учебник для мед. вузов] / А.И. Коротяев, С.А. Бабишев. – СПб.: СпецЛит, 2000. – 591 с.
14. Лабораторные методы исследования в клинике: [Справочник]; Под ред. проф. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987 – 368 с.
15. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – К.: Морион, 2000. – 188 с.
16. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т. 1. – 367 с.
17. Ленинджер А. Основы биохимии / А. Ленинджер. – М.: Мир, 1985. – Т. 2. – 368 с.
18. Смердов А.А. Вплив УВЧ-опромінення на інтенсивність обмінних процесів у насінні / А.А. Смердов, С.І. Волков, А.А. Ландар // Вісн. Полтав. держ. аграр. академії. – 2008. – № 2. – С. 172-174.
19. Стандартизація приготування мікробних суспензій: Інформаційний лист про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006 К.: (Укрмедпатентінформ), 2006. – 10 с. – (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформаційний лист).
20. Тамбиев А. Х. Миллиметровые волны и фотосинтезирующие организмы / под ред. Ю.В. Гуляева, А.Х. Тамбиева. – М.: Радиотехника, 2003. – 175 с.
21. Georgescu P. Metode biochimice de diagnostic si cercetare / Chimist Petre Georgescu, Pr. Eugeniu Paunescu. – Bucuresti: Editura medicala, 1960. – 489 p.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ α -АМИЛАЗЫ КОРИНЕБАКТЕРИЙ

Т.И. Антушева

Резюме. Изучено изменение амилолитической активности музейных штаммов коринебактерий дифтерии в зависимости от влияния ультразвуковых колебаний низкой частоты и миллиметровых волн электромагнитного излучения в частотных диапазонах 61,1 ГГц и 42,2 ГГц. Выявлено повышение активности α -амилазы после воздействия миллиметровыми волнами (в большей степени при облучении частотой 42,2 ГГц). При сочетанном воздействии ультразвуковых колебаний и миллиметровых волн активность α -амилазы уменьшалась по сравнению с монофакторным влиянием электромагнитных волн, но все же оставалась выше контрольных образцов. Применение только ультразвуковых колебаний не вызывало повышения активности α -амилазы.

Ключевые слова: амилолитическая активность, α -амилаза, коринебактерии дифтерии, ультразвук, миллиметровые волны.

THE INFLUENCE OF PHYSICAL FACTORS ON THE ACTIVITY α -AMYLASE OF CORYNEBACTERIA

T.I. Antusheva

Abstract. A change of the amylolytic activity of *Corynebacterium diphtheriae* museum strains, under the influence of low-frequency ultrasonic vibrations (US) and millimeter-waves of electromagnetic radiation (EMR) in the frequency ranges 61.1 GHz and 42.2 GHz has been studied. An increase of the α -amylase activity has been established after a monofactor action by millimeter waves of the frequency ranged used (to a greater extent under the influence of 42.2 GHz). The level of the α -amylase activity was lower under a combined action of US and EMR waves than after using only EMR. Using only us did not cause an increased activity of α -amylase.

Key words: amylolytic activity, α -amylase, *Corynebacterium diphtheriae*, ultrasound, millimeter waves.

SI "Institute of Microbiology and Immunology of Ukraine's AMS named after I.I. Mechnikov" (Kharkiv)

Рецензент – проф. С.С. Дейнека

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 4 (60). – P. 77-81

Надійшла до редакції 11.07.2011 року