

ALICJA KOŚMIDER, KAMILA MYSZKA, KATARZYNA CZACZYK

OGRANICZONA DOSTĘPNOŚĆ SKŁADNIKÓW ODŻYWCZYCH W ŚRODOWISKU JAKO INDUKTOR WZROSTU OPORNOŚCI DROBNOUSTROJÓW NA CZYNNIKI ANTYMIKROBIOLOGICZNE

Streszczenie

W dostępnej literaturze pojawiają się doniesienia świadczące o tym, że ograniczona dostępność składników pokarmowych w środowisku wzrostu drobnoustrojów indukuje ich oporność na czynniki antymikrobiologiczne. Celem przeprowadzonych doświadczeń była weryfikacja tej hipotezy badawczej.

Określono wpływ ograniczonej dostępności składników pokarmowych w medium hodowlanym, na oporność drobnoustrojów *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* na działanie wybranych środków dezynfekcyjnych: formaldehydu, nadtlenu wodoru oraz IV-rzędowych soli amoniowych.

Wyznaczenie minimalnych stężeń hamujących wzrost drobnoustrojów w 90 % (wskaźnik MIC_{90%}, ang. *minimal inhibitory concentration*) i minimalnych stężeń bójczych (wskaźnik MBC, ang. *minimal bactericidal concentration*) badanych środków dezynfekcyjnych wykonano metodą zawieszinową. Analizę zmian profilu białek ogólnych drobnoustrojów przeprowadzono metodą elektroforezy jednokierunkowej w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).

Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdzono wpływu ograniczonej dostępności składników pokarmowych w pożywce oraz czasu trwania hodowli na wzrost oporności drobnoustrojów poddanych działaniu wybranych środków dezynfekcyjnych. Najskuteczniejsze działanie bójcze wobec *Enterococcus faecalis* wykazały IV-rzędowe sole amoniowe, a w przypadku komórek *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* ekspozycja na formaldehyd. Stwierdzono także, że hodowla komórek *Pseudomonas aeruginosa*, prowadzona na podłożu o ograniczonej dostępności składników pokarmowych, indukowała zmiany profilu białek ogólnych tych drobnoustrojów.

Słowa kluczowe: stres głodowy, oporność, MIC, MBC

Wprowadzenie

Zmniejszenie wrażliwości drobnoustrojów inkubowanych w warunkach głodowych na środki antymikrobiologiczne może stanowić zagrożenie i może być przyczyną

Mgr inż. A. Kośmider, dr inż. K. Myszką, dr hab. inż. K. Czaczyk, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań

wielu komplikacji w leczeniu zatruc pokarmowych i innych schorzeń. Ograniczona dostępność składników pokarmowych w środowisku wzrostu jest bezpośrednim induktorem zmian morfologicznych i fizjologicznych mikroorganizmów, chroniących komórki przed degradacyjnym wpływem substancji toksycznych [13]. Pod wpływem szoków środowiskowych inhibicja szeregu szlaków metabolicznych różnych drobnoustrojów np. *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Vibrio* spp., kształtuje ich wysoką oporność na czynniki antymikrobiologiczne [17]. Efektem stresu głodowego wywołanego u drobnoustrojów jest zahamowanie wzrostu i syntezy ściany komórkowej bakterii [7, 9]. Faza zastoju stanowi okres przygotowawczy, w trakcie którego bakterie przebudowują swój aparat enzymatyczny [7, 8, 9]. Zwolnieniu tempa wzrostu towarzyszą zmiany morfologiczne. Bakterie Gram-ujemne np. *Escherichia coli* w stadium żyjących lecz nie dających się hodować mikroorganizmów (ang. *viable but nonculturable* - VBNC), przybierają postać kulistą i mają mniejsze wymiary niż aktywne fizjologicznie komórki wegetatywne [5, 11, 17]. Bakterie Gram-dodatnie przy deficytowej dostępności składników pokarmowych w pożywce nie kurczą się, ale wskutek asymetrycznego podziału komórki mogą przybierać formy o zdecydowanie mniejszych wymiarach [5]. U drobnoustrojów poddanych stresowi głodowemu stwierdzono także zmiany fizjologiczne, objawiające się wzmożoną sekrecją egzopolisacharydów oraz zmianami konformacyjnymi błonowych kwasów tłuszczowych [5, 13, 17]. Zdaniem badaczy zmiany te są reakcją adaptacyjną drobnoustrojów na stres środowiskowy i warunkują one komórkową oporność przed autolizą wywołaną przez środki dezynfekcyjne [5]. W warunkach stresu głodowego drobnoustroje zdolne są także do syntezy specyficznych białek stresowych i genów głodzenia [3, 6, 15].

W celu skutecznego usuwania aktywnych mikroorganizmów z powierzchni użytkowych, ważne jest obliczenie wartości klasycznych wskaźników MIC_{90%} i MBC w warunkach imitujących naturalne nisze ekologiczne. Skuteczną strategią jest także lepsze zrozumienie natury składników komórkowych i ich funkcji w oporności drobnoustrojów w warunkach głodowych na czynniki toksyczne.

Celem przeprowadzonych badań było określenie wpływu ograniczonej dostępności składników pokarmowych w medium hodowlanym na oporność drobnoustrojów *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* na działanie wybranych środków dezynfekcyjnych, takich jak: formaldehyd, nadtlenek wodoru i IV-rzędowe sole amoniowe.

Material i metody badań

Przedmiotem badań były 3 szczepy bakterii chorobotwórczych: *Enterococcus faecalis* ATCC 7080, *Proteus vulgaris* ATCC 6380 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

W badaniach użyto następujących środków dezynfekcyjnych: formaldehydu (POCH, Gliwice), nadtlenu wodoru (STANDARD, Lublin) i chlorku didecylodimetyloamoniowego (kationowa QAC) (Jodex, Poznań)

Warunki prowadzenia hodowli

Hodowle mikroorganizmów prowadzono na pożywkach płynnych do namnażania *Enterococcus faecalis*: pepton K (BTL, Łódź) (15 g/l), ekstrakt mięsny (BTL, Łódź) (4,5 g/l), glukoza (Chempur, Piekary Śląskie) (7,5 g/l), azydek sodu (POCH, Gliwice) (0,2 g/l), chlorek sodu (Chempur, Piekary Śląskie) (7,5 g/l) [4], *Proteus vulgaris*: gotowa pożywka do namnażania *Enterobacteriaceae* wg Mossela [12], *Pseudomonas aeruginosa*: gotowa pożywka ABGP wg Schuberta [16]. Jako podłoże stałe do wzrostu drobnoustrojów zastosowano agar wzbogacony (BTL, Łódź) (30 g/l) z glukozą (Chempur, Piekary Śląskie) (10 g/l) [17]. Hodowle prowadzono w warunkach dynamicznych (100 obr./min). Jako optymalne warunki hodowli przyjęto podstawowy skład pożywek do namnażania drobnoustrojów i temp. 37 °C. Badając wpływ stresu głodowego na komórki bakterii, zawartość składników pokarmowych w medium hodowlanym zredukowano 10-krotnie. Hodowle prowadzono przez 144 h, przeszczepiając co 48 h 10 % hodowli drobnoustrojów do świeżych pożywek o optymalnym i 10-krotnie zredukowanym składzie. Oznaczeń dokonywano po 48 h i 144 h hodowli, odpowiadającym odpowiednio fazie wzrostu logarytmicznego drobnoustrojów oraz fazie stacjonarnej.

Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów

Liczbę badanych mikroorganizmów w warunkach optymalnego i głodowego środowiska wzrostu określano metodą płytkową Kocha. Z kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych wykonywano posiewy, przenosząc po 1 ml zawiesiny do dwóch równoległych płytek Petriego. Zawartość płytek Petriego zalewano ok. 15 ml upłynionego podłoża. Płytki Petriego inkubowano przez 24 h w temp. 37 °C, następnie dokonywano odczytu wyników.

Wyznaczenie wskaźników MIC₉₀ % i MBC

Wskaźniki MIC₉₀% i MBC badanych preparatów dezynfekcyjnych określano metodą zawiesinową. Do wyznaczenia wskaźników MIC₉₀% i MBC [%]: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 2; 3; 5 i 7 roztworów formaldehydu, następnie [%]: 0,5; 1; 2; 3; 5; 7; 8 i 10 roztworów nadtlenu wodoru oraz [%]: 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 3; 5; 7 roztworów IV-rzędowych soli amoniowych, drobnoustroje poddano 15 min ekspozycji na działanie tych preparatów dezynfekcyjnych.

Do probówek zawierających 9 ml płynnej pożywki namnażającej wprowadzano po 1 ml badanego środka dezynfekcyjnego o odpowiednim stężeniu i hodowlę testowanego szczepu bakteryjnego o gęstości $10^7 - 10^8$ jtk/ml. Po 15 min wykonywano posiew metodą płytkową Kocha. Wyznaczenia wskaźników MIC_{90%} i MBC dokonywano po 24 h inkubacji prób w temp. 37 °C.

Elektroforetyczna identyfikacja zmian profilu białek ogólnych (SDS-PAGE)

Do oceny zmian profilu białek ogólnych wytypowano drobnoustroje *Pseudomonas aeruginosa* i poddawano je 15 min ekspozycji na działanie 2 % wodnego roztworu nadtlenu wodoru. Hodowle bakterii prowadzono w warunkach dynamicznych na podłożu płynnym przeznaczonym do namnażania komórek *Pseudomonas aeruginosa* przez 144 h. Osad komórek poddawano lizie 8 M roztworem mocznika. Zawartość wyekstrahowanych białek komórkowych w próbach oznaczano spektrofotometrycznie metodą Bradforda [2]. Rozdziału wyizolowanych biopolimerów dokonywano techniką jednokierunkowej elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) przy napięciu 100 V wg Laemmli [10]. W doświadczeniach zastosowano 12 % żel poliakrylamidowy. Czas trwania rozdziału wynosił 1,5 h. Jako wzorzec zastosowano mieszaninę białek o znanej masie cząsteczkowej (Sigma, USA). Wizualizację rozdzielonych na żelach poliakrylamidowych białek komórkowych prowadzono techniką wybarwiania pasm solami srebra [1].

Wyniki i dyskusja

W pierwszym etapie pracy zbadano wpływ ograniczonej dostępności składników odżywczych w pożywce, jako potencjalnego induktora wzrostu oporności komórek *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa*, na wybrane czynniki antymikrobiologiczne. W tab. 1., 2. i 3. przedstawiono wyniki tych badań.

Po przeprowadzeniu eksperymentów, mających na celu wyznaczenie wskaźników MIC_{90%} i MBC badanych środków dezynfekcyjnych, stwierdzono, że bakterie *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* inkubowane na pożywkach o optymalnej i 10-krotnie zredukowanej zawartości składników pokarmowych, poddane 15 min ekspozycji na działanie wybranych stężeń roztworu formaldehydu, nie wykazały znaczących różnic wzrostu oporności w warunkach głodowych. Nie zaobserwowano również wpływu czasu trwania hodowli na zmianę wartości wskaźników MIC_{90%} i MBC, które wahały się w granicach 0,5-2 %.

Wyznaczone wskaźniki MIC_{90%} i MBC nadtlenu wodoru, z wykorzystaniem drobnoustrojów *Enterococcus faecalis* w 48 h hodowli, w warunkach optymalnej i ograniczonej zawartości składników pokarmowych cechowały się zbliżoną wartością. Podobne wartości wskaźnika MIC_{90%} dla tego drobnoustroju zanotowano także w 144 h

Tabela 1

Wartości współczynników MIC_{90%} i MBC formaldehydu w zależności od dostępności składników pokarmowych w pożywce hodowlanej.
 Values of MIC_{90%} and MBC of formaldehyde depending on the availability of nutrients in the culture medium.

Środek dezynfekcyjny Disinfectant	Czas hodowli [h] Time of incubation [h]	Dostępność składników pokarmowych w pożywce Availability of nutrients in the culture medium											
		optymalna optimal						10-krotnie zredukowana tenfold reduced					
Formaldehyd Formaldehyde	[h]	MIC _{90%}			MBC			MIC _{90%}			MBC		
		<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>
		48	1	0,5	2	2	0,5	2	1	0,5	0,5	2	0,5
144	0,5	0,5	0,5	2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2	0,5	0,5	

E. faec.-*Enterococcus faecalis*; *P. vulg.*-*Proteus vulgaris*; *P. aerug.*-*Pseudomonas aeruginosa*

Tabela 2

Wartości współczynników MIC_{90%} i MBC nadtlenu wodoru w zależności od dostępności składników pokarmowych w pożywce hodowlanej.
 Values of MIC_{90%} and MBC of hydrogen peroxide depending on the availability of nutrients in the culture medium.

Środek dezynfekcyjny Disinfectant	Czas hodowli [h] Time of incubation [h]	Dostępność składników pokarmowych w pożywce Availability of nutrients in the culture medium											
		optymalna optimal						10-krotnie zredukowana tenfold reduced					
Nadtlenek wodoru Hydrogen peroxide	[h]	MIC _{90%}			MBC			MIC _{90%}			MBC		
		<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>
		48	2	x	10	2	x	x	2	2	7	3	3
144	0,5	x	x	2	x	x	2	8	2	3	10	3	

E. faec.-*Enterococcus faecalis*; *P. vulg.*-*Proteus vulgaris*; *P. aerug.*-*Pseudomonas aeruginosa*;
 x - nie wyznaczono (określana wartość nie znalazła się w badanym przedziale stężeń preparatu)
 x - not determined (the value being determined was not comprised by the studied concentration range of the preparation)

Tabela 3

Wartości współczynników MIC_{90%} i MBC IV-rzędowych soli amoniowych w zależności od dostępności składników pokarmowych w pożywce hodowlanej.

Values of MIC_{90%} and MBC of quaternary ammonium compounds depending on the availability of nutrients in the culture medium.

Środek dezynfekcyjny Disinfectant	Czas hodowli [h] Time of incubation [h]	Dostępność składników pokarmowych w pożywce Availability of nutrients in the culture medium											
		optymalna optimal						10-krotnie zredukowana tenfold reduced					
IV-rzędowe sole amoniowe Quaternary ammonium compounds	[h]	MIC _{90%}			MBC			MIC _{90%}			MBC		
		<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>	<i>E. faec.</i>	<i>P. vulg.</i>	<i>P. aerug.</i>
		48	x	x	3	0,3	x	x	x	x	x	0,3	0,2
144	x	x	0,5	0,3	x	x	x	x	x	0,3	0,1	0,1	

E. faec.- *Enterococcus faecalis*; *P. vulg.*- *Proteus vulgaris*; *P. aerug.*- *Pseudomonas aeruginosa*;

x - nie wyznaczono (określana wartość nie znalazła się w badanym przedziale stężeń preparatu)

x - not determined (the value being determined was not comprised by the studied concentration range of the preparation)

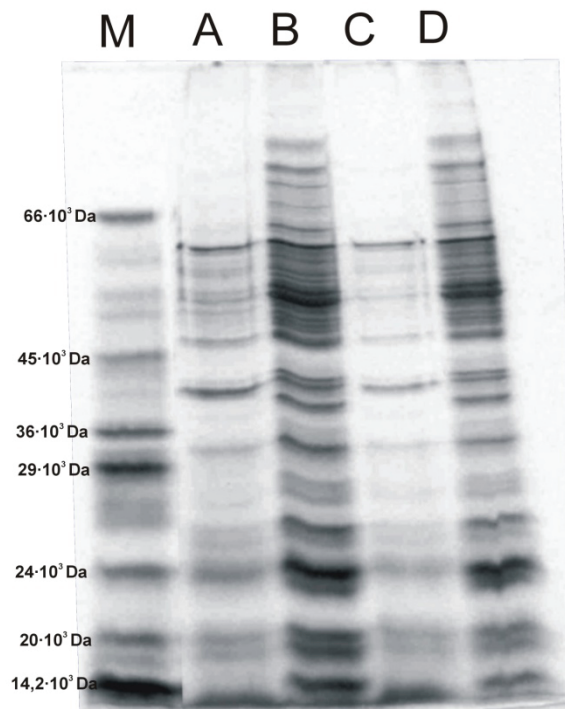
trwania procesu. Widoczne różnice w stopniu wrażliwości badanych komórek na zastosowany środek dezynfekcyjny odnotowano podczas wyznaczenia wskaźnika MBC w fazie stacjonarnej. Całkowite zamieranie komórek *Enterococcus faecalis*, prowadzonych w warunkach optymalnego wzrostu, odnotowano po użyciu 2 % roztworu nadtlenu wodoru. Bakterie poddane stresowi głodowemu wykazywały mniejszą wrażliwość i moment całkowitej inaktywacji badanych komórek zaobserwowano po zastosowaniu 3 % roztworu preparatu. Analizując wartości wskaźników MIC_{90%} i MBC komórek *Proteus vulgaris* stwierdzono wyższą oporność drobnoustrojów w warunkach optymalnych. Zastosowane stężenia roztworów nadtlenu wodoru nie spowodowały wyraźnej inhibicji wzrostu komórek *Proteus vulgaris*. W przeprowadzonych eksperymentach odnotowano wpływ czasu trwania hodowli *Proteus vulgaris* w warunkach głodowych na wzrost oporności komórek na działanie nadtlenu wodoru. Zastosowanie tego środka dezynfekcyjnego w stężeniach w zakresie 1- 3 % oraz 8 % spowodowało 90 % inhibicję wzrostu odpowiednio 48 h i 144 h hodowli badanych drobnoustrojów. Widoczne różnice wrażliwości na zastosowany środek dezynfekcyjny odnotowano także przy wyznaczeniu wskaźnika MBC. Całkowite zamieranie 48 h hodowli *Pro-*

teus vulgaris prowadzonej w warunkach głodowych wzrostu zaobserwowano przy użyciu 3 % roztworu nadtlenu wodoru, a w 144 h hodowli – po zastosowaniu 10 % roztworu badanej substancji dezynfekującej. Nadtlenek wodoru zastosowany na komórki *Pseudomonas aeruginosa* okazał się całkowicie nieskuteczny w przypadku hodowli o optymalnej podaży składników odżywczych. W żadnym z przeprowadzonych eksperymentów zastosowane stężenia nadtlenu wodoru nie działały bakteriobójczo na komórki inkubowane w warunkach optymalnej zawartości źródeł węgla i azotu przez 144 h. Ekspozycja drobnoustrojów *Pseudomonas aeruginosa* inkubowanych w warunkach głodowych przez 144 h na działanie 3 % roztworu nadtlenu wodoru spowodowało całkowitą eradykację tych mikroorganizmów. W powyższym wariancie doświadczenia, wartość wskaźnika MIC_{90%} wyniosła 2.

W większości przeprowadzonych eksperymentów nie zanotowano inhibicji wzrostu drobnoustrojów w optymalnych i głodowych warunkach środowiska przy ekspozycji badanych drobnoustrojów na działanie zastosowanych stężeń IV-rzędowych soli amoniowych. W żadnym z przeprowadzonych doświadczeń nie zaobserwowano działania bójczego tego środka na mikroorganizmy *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* w warunkach optymalnych. W przypadku komórek *Enterococcus faecalis* wskaźnik MBC wyniósł 0,3. Stosując warunki głodowe hodowli, oporność drobnoustrojów *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* obniżyła się i całkowita inaktywacja komórek następowała już przy zastosowaniu 0,1 – 0,3 % stężenia IV-rzędowych soli amoniowych. W przypadku komórek *Enterococcus faecalis* wartość wskaźnika MBC pozostała na poziomie 0,3.

W większości przeprowadzonych doświadczeń nie stwierdzono znaczącego wzrostu oporności komórek, inkubowanych przy 10-krotnie zredukowanej podaży związków chemicznych w pożywce, na zastosowane stężenia badanych środków dezynfekujących. W niniejszej pracy wydłużenie czasu trwania hodowli nie spowodowało wzrostu oporności komórek na zastosowane czynniki toksyczne. Odmienne rezultaty uzyskali Pichereau i wsp. [14], badając stopień wrażliwości komórek *Enterococcus faecalis*, inkubowanych przy ograniczonym dostępie źródeł węgla w pożywce, na środki przeciwdrobnoustrojowe. Zdaniem tych badaczy, warunki głodowe środowiska wzrostu są induktorem silnej krzyżowej ochrony w komórkach, przeciwdziałaniu takich substancji toksycznych, jak etanol i sole kwasów żółciowych. Zwiększoną oporność drobnoustrojów pozyskanych z naturalnych nisz ekologicznych zaobserwowano także wśród innych grup mikroorganizmów np. podczas badań przeprowadzonych przez Państwowy Zakład Higieny (PZH) [18] z wykorzystaniem grzybów *Candida albicans*, wyizolowanych ze środowiska szpitalnego i ekspozowanych na działanie takich środków dezynfekcyjnych, jak: chloramina, aldehyd glutarowy, formaldehyd i pochodne fenolu. Większość zastosowanych szczepów przez PZH, wyizolowanych ze środowiska szpitalnego, tolerowało wysokie stężenia środków dezynfekcyjnych, w porównaniu

ze szczepem laboratoryjnym *Candida albicans*. Ponadto niektóre szczepy *Candida albicans* wyizolowane od chorych pacjentów lub kolonizujących urządzenia medyczne, odznaczały się wyższą przeżywalnością po bezpośredniej ekspozycji na wybrane stężenia środków dezynfekcyjnych niż szczepy laboratoryjne.



Rys. 1. Wpływ dostępności składników pokarmowych w pożywce na profil zewnątrzkomórkowych białek komórek *Pseudomonas aeruginosa* (A - inkubowanych w warunkach głodowych, B - inkubowanych w warunkach optymalnych, C - inkubowanych w warunkach głodowych i poddanych ekspozycji na działanie środka dezynfekcyjnego, D - inkubowanych w warunkach optymalnych i poddanych ekspozycji na działanie środka dezynfekcyjnego, M - marker ciężaru cząsteczkowego).

Fig. 1. Effect of availability of nutrients in the culture medium on the extra-cellular protein profile of *Pseudomonas aeruginosa* cells (A - incubated under starvation conditions, B - incubated under optimal conditions, C - incubated under starvation conditions and treated by a disinfectant, D - incubated under optimal conditions and treated by a disinfectant, M - molecular weight marker).

W przedstawionych badaniach stwierdzono, że zastosowane środki dezynfekcyjne nie spowodowały w większości przypadków narastania oporności badanych drobnoustrojów w warunkach głodowych. Dobór odpowiedniego środka ma więc kluczowe znaczenie w walce z mikroflorą patogenną. Brak zmniejszenia wrażliwości wynikać może także z faktu, że drobnoustroje narażone na subletalne warunki bytowania znacz-

nie wydłużają czas generacji. Takie prawidłowości zaobserwowano w hodowli *Escherichia coli* prowadzonej na pożywce zawierającej jako źródło węgla i energii laktozę w stężeniu 90 mg/l [9]. Średnie tempo wzrostu badanych mikroorganizmów w tych warunkach inkubacji wynosiło 53 min. Zmniejszenie stężenia laktozy w podłożu hodowlanym do poziomu 9 mg/l, wydłużyło okres międzypodziałowy komórek do 550 min. Na skutek zahamowania wzrostu i biosyntezy ściany komórkowej, działanie środka antymikrobiologicznego w postaci penicyliny stało się nieskuteczne [9]. Zastosowany w niniejszej pracy 144 h czas inkubacji, prawdopodobnie nie spowodował jeszcze wykształcenia pełnych mechanizmów narastania oporności drobnoustrojów. W celu sprawdzenia tej hipotezy przeprowadzono analizę białek ogólnych wybranej grupy drobnoustrojów, poddanej stresowi głodowemu w stacjonarnej fazie wzrostu.

W drugim etapie badań oceniano wpływ ograniczonej dostępności składników odżywczych w środowisku wzrostu na zmiany profilu białek ogólnych *Pseudomonas aeruginosa* po ekspozycji na 2 % roztwór nadtlenu wodoru. Wpływ optymalnej i ograniczonej dostępności składników pokarmowych w środowisku wzrostu na zmiany profilu białek ogólnych komórek *Pseudomonas aeruginosa* przedstawiono na rys. 1. Równoczesny rozdział mieszaniny białek wzorcowych i wyekstrahowanych białek komórkowych umożliwił przeprowadzenie analizy porównawczej względnych mas cząsteczkowych.

Wielu autorów wykazuje indukcję genów kodujących specyficzne białka pozwalające przetrwać drobnoustrojom stres głodowy i inne niekorzystne czynniki hodowlane [3, 6, 15]. Zmiany w profilach ogólnych białek *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, powodowane oddziaływaniem na komórki ciepła, soli kwasów żółciowych i chlorku sodu, stwierdzono w badaniach przeprowadzonych przez Rince i wsp. [15]. Warunki stresowe środowiska wzrostu indukowały powstanie aż 167 nowych białek, z czego 6 makromolekuł określono jako podstawowe białka stresowe GSP (ang. *general stress proteins*). Odmienne wyniki uzyskano w niniejszej pracy. Nie stwierdzono biosyntezy przez badane mikroorganizmy nowych białek w warunkach stresu głodowego. Zauważono jednak różnice efektywności biosyntezy ogólnych białek wytwarzanych przez badane drobnoustroje w warunkach optymalnej i zredukowanej dostępności składników pokarmowych. Intensywność barwy rozdzielonych na żelu poliakrylamidowym biopolimerów o względnej masie cząsteczkowej mieszczącej się w zakresie $14,2 \cdot 10^3$ – $36 \cdot 10^3$ Da, wskazuje na wyraźne ograniczenie biosyntezy tych związków przez komórki *Pseudomonas aeruginosa* w warunkach głodowych. W powyższym wariantcie doświadczenia nie stwierdzono biosyntezy przez badane mikroorganizmy wysokocząsteczkowych białek o względnej masie cząsteczkowej powyżej $66 \cdot 10^3$ Da. Ekspozycja komórek *Pseudomonas aeruginosa*, hodowanych przy ograniczonym dostępie składników odżywczych w środowisku wzrostu, na działanie 2 % roztworu nadtlenu wodoru indukowała zmniejszenie wydajności biosyntezy związków o masie cząsteczkowej

mieszczącej się w zakresie $24 \cdot 10^3 - 66 \cdot 10^3$ Da. Takich zależności nie zaobserwowano u drobnoustrojów inkubowanych przy optymalnej zawartości źródeł węgla i azotu w pożywce i narażonych na działanie danej substancji dezynfekującej.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki świadczą o tym, że warunki głodowe, którym poddane zostały drobnoustroje, nie spowodowały znaczących różnic we wzroście oporności w porównaniu z hodowlą prowadzoną w warunkach o optymalnej podaży składników pokarmowych. Stwierdzono, że proces nabywania oporności przez badane mikroorganizmy jest okresem długim, o czym świadczą zmiany intensywności biosyntezy białek ogólnych przez drobnoustroje poddane stresowi głodowemu i ekspozycji na zastosowany środek dezynfekcyjny po 144 h hodowli.

Wnioski

1. Nie stwierdzono wpływu ograniczonej dostępności składników pokarmowych w pożywce na wzrost oporności drobnoustrojów poddanych działaniu wybranych stężeń środków dezynfekcyjnych.
2. W większości wariantów eksperymentów wydłużenie czasu trwania hodowli mikroorganizmów na podłożu o zredukowanej zawartości substancji odżywczych nie wpłynęło na wzrost oporności komórek na zastosowane środki dezynfekcyjne. Spośród przebadanych substancji antymikrobiologicznych, najefektywniejsze działanie hamujące wzrost testowanych drobnoustrojów (redukcja o 90 %) odnotowano po zastosowaniu wodnych roztworów formaldehydu.
4. W przeprowadzonych doświadczeniach całkowite zamieranie komórek *Enterococcus faecalis* w badanym płynie hodowlanym następowało po zastosowaniu IV-rzędowych soli amoniowych. Najskuteczniejsze działanie bakteriobójcze względem komórek *Proteus vulgaris* i *Pseudomonas aeruginosa* wykazano w przypadku wodnych roztworów formaldehydu.
5. Hodowla komórek *Pseudomonas aeruginosa*, prowadzona na podłożu o ograniczonej dostępności składników pokarmowych, indukowała zmiany w profilu białek ogólnych. Po narażeniu badanych komórek na działanie wodnego roztworu nadtlenu wodoru stwierdzono ograniczenie biosyntezy biopolimerów o względnej masie cząsteczkowej mieszczącej się w zakresie $24 \cdot 10^3 - 66 \cdot 10^3$ Da.

Badania prowadzono w ramach projektu badawczego MNiSW N N312 3265 33. Praca była prezentowana podczas XIII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Łódź, 28 - 29 maja 2008 r.

Literatura

- [1] Blum H., Beier H., Gross H., J.: Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electroporesis*, 1987, **8** (1), 93-99.
- [2] Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.
- [3] Brzostek K.: Mechanizmy regulacji czynników wirulencji *Yersinia enterocolitica*. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43** (1), 7-38.
- [4] Burbianka M.: *Mikrobiologia żywności*. PZWL, Warszawa 1983.
- [5] Dahm H., Strzelczyk E.: Żyjące lecz nie dające się hodować bakterie. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43**, 251-265.
- [6] Giard J.C., Hartke A., Flahaut S., Boutibonnes P., Auffray Y.: Glucose starvation response in *Enterococcus faecalis* JH2-2: survival and protein analysis. *Res. Microbiol.*, 1997, **148**, 27-35.
- [7] <http://www.ietu.katowice.pl/wpr/Aktualnosci/Czestochowa/Referaty/Smylla.pdf>
- [8] Jones T., Gill C. O., McMullen. L.M.: The behavior of log phase *Escherichia coli* at temperatures below the minimum for sustained growth. *Food Microbiol.*, 2002, **19**, 83-90.
- [9] Kunicki-Goldfinger W.J.H.: *Życie bakterii*. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2001.
- [10] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **222**, 680-685.
- [11] Lange R., Hengge-Aronis R.: Growth phase-regulated expression of *bolA* and morphology of stationary-phase *Escherichia coli* cells are controlled by the novel sigma factor σ^S . *J. Bacteriol.*, 1991, **173**, 4474-4481.
- [12] Mossel D.A.A.: The examination of foods for *Enterobacteriaceae* using a test of the type generally adapted for the detection of salmonellae. *J. Appl. Bacteriol.*, 1963, **24**, 444-452.
- [13] Myszka K., Czaczyk K.: Ograniczona dostępność składników odżywczych w środowisku wzrostu jako induktor zmian metabolicznych u bakterii heterotroficznych. *Post. Mikrobiol.*, 2006, **45** (2), 87-95.
- [14] Pichereau V., Hartke A., Yanick A.: Review. Starvation and osmotic stress induced multiresistances influence of extracellular compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **55**, 19-25.
- [15] Rince A., Flahaut S., Auffray Y.: Identification of general stress genes in *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **55**, 87-91.
- [16] Schubert R.: The use of arginine brilliantgreen glucose peptone broth (ABGP Medium) as a primary culture medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *Zbl. Bakt. Hyg. B*, 1989, **187**, 266-268.
- [17] Siegle D.A., Kolter R.: MiniReview. Life after log. *J. Bacteriol.*, 1992, **174** (2), 345-348.
- [18] Tadeusiak B.: Wrażliwość na środki dezynfekujące szczepów *Candida albicans* izolowanych ze środowiska szpitalnego. *Roczn. PZH*, 1998, **49**, 73-86.
- [19] Trojanowska K., Giebel H., Gołębiowska B.: *Mikrobiologia żywności*. Wyd. AR w Poznaniu, Poznań 1996.

LIMITED AVAILABILITY OF NUTRIENTS IN ENVIRONMENT AS INDUCER OF INCREASE IN THE RESISTANCE OF MICRO-ORGANISMS AGAINST ANTIMICROBIAL FACTORS

Summary

In the reference literature available, there are reports that the limited availability of nutrients in the culture medium of micro-organisms induces their resistance against antimicrobial factors. The objective of the conducted experiments was to verify this research hypothesis.

The effect was determined of the limited availability of nutrients in a culture medium on the resistance of *Enterococcus faecalis*, *Proteus vulgaris*, and *Pseudomonas aeruginosa* against the action of three selected disinfection agents: formaldehyde, hydrogen peroxide, and quaternary ammonium salts.

A suspension method was applied to determine MIC_{90%} (*minimal inhibitory concentration*), i.e. minimal concentration levels inhibiting the growth of micro-organisms in 90% disinfection agents studied, and MBC (*minimal bactericidal concentration*), i.e. minimal, bactericidal concentration levels. The analysis of changes in the profile of total proteins of micro-organisms was performed using a single-direction electrophoresis method under denaturing conditions (known as SDS-PAGE method, i.e. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis).

Based on the experiments accomplished it was found that neither the limited availability of nutrients in the culture medium nor the time of incubation had any impact on the increase in the resistance of micro-organisms treated by the three selected disinfectants. The quaternary ammonium salts proved to have the most effective bactericidal activity against *Enterococcus faecalis*, whereas in the case of *Proteus vulgaris* and *Pseudomonas aeruginosa* cells - the formaldehyde agent. It was also found that the incubation of *Pseudomonas aeruginosa* cells grown in a medium with a limited availability of nutrients induced changes in the profile of general proteins of this micro-organism.

Key words: starvation stress, resistance, MIC, MBC ☒