

ный эффект. При этом pH раствора йода на дистиллированной воде несколько сдвинут в кислую сторону, и при сочетанном применении нейтрального анолита с йодом наблюдается подавление бактерицидной активности последнего.

На основании проведенных исследований и полученных результатов установлено:

- сочетание нейтрального анолита (Сах=0,12 мг/мл) с уксусной кислотой в со-

отношении 1000:1 обеспечивает 100%-ное обеззараживание суспензий микроорганизмов: (*E. coli* и *St. aureus*) при плотности 200 млн. микробных тел /мл и экспозиции 2 мин;

- сочетание нейтрального анолита (Сах=0,12 мг/мл) с уксусной кислотой (1000:1) обеспечивает 100%-обеззараживание контаминированных (*E. coli*, *St. aureus*) бязевых тест-объектов при экспозиции 5 мин.

РЕЗЮМЕ

В статье приведены результаты исследований новых дезинфицирующих препаратов на основе униполярно электрохимически активированных растворов хлоридов. Установлено, что сочетание нейтрального анолита с уксусной кислотой в соотношении 1000:1 обеспечивает 100%-ное обеззараживание суспензий микроорганизмов *E. coli* и *St. aureus*.

SUMMARY

The results of examining the new disinfectants on a base of unipolar electrochemical activated chloride solutions are presented in the paper. It was found that the combinative application of the neutral anolite and acid vinegar being used at a rate of 1000:1 resulted in 100% destruction of *E. coli* and *St. aureus* suspensions.

Литература

1. Поляков А.А. Ветеринарная дезинфекция, 3-е изд. М.: Колос, 1964.
2. Ярных В.С. Применение аэрозолей для дезинфекции воздуха и поверхностей в животноводческих и птицеводческих помещениях. Дисс., М., 1957.
3. Закомырдин А.А. Бактерицидность аэрозолей некоторых дезинфицирующих средств, применяемых в растворах. Тр ВНИИВС, 1960., Т. XVI
4. Боченин Ю.И. К вопросу о поверхностных явлениях при аэрозольном способе дезинфекции. Тр. ВНИИВС, 1969., Т. 32.
5. Ковалев В.М. Дезинфекция моющей спецодежды по поводу сибирской язвы. Тр. Центр, научно-исследовательского дезинфекционного института, 1957, Вып. 10
6. Соколова Н.Ф. Проверка эффективности рекомендованных способов обеззараживания спецодежды и рук для лиц, обслуживающих бруцеллезных животных. Тр. Центр, научно-исследовательского дезинфекционного института, 1957, Вып. 10.

УДК 614.9:577.352.32:577.352.334:579.23:314:579.6: 614.4:616-002:547.292

К.Ш. Досанов

Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩЕГО СРЕДСТВА «ДЕЗОКСОН-1»

Микобактерии широко распространены в природе. Особый интерес среди них представляют патогенные микобактерии – возбудители туберкулеза человека и животных. Возбудители туберкулеза, длительное время сохраняются во внешней среде и весьма устойчивы к воздействиям физических факторов и химических средств [1].

Одним из эффективных препаратов для санации различных объектов (помещений, инвентаря) является препарат «Дезоксон-1», имеющий большое практическое значение, однако механизм его действия изу-

чен недостаточно.

Целью настоящих исследований является сравнительное изучение структурно-функциональных изменений сапрофитного и патогенного штаммов микобактерий при воздействии препарата «Дезоксон-1».

Материалы и методы.

В экспериментах использовали сапрофитный штамм микобактерий М. шт.В-5 и патогенный штамм М. bovis-8.

Микобактерии выращивали на питательных средах Сотона, Гельберга, Левенштейна-Йенсена.

Выживаемость микобактерий после

Таблица 1.
Динамика гибели микобактерий при воздействии 0,01%-ного раствора препарата «Дезоксон-1»

№ п/п	Наименование штаммов	Количество колоний микобактерий							
		Контроль		Экспозиция в (минутах)					
		Количество колоний	%	5		30		60	
				Количество колоний	%	Количество колоний	%	Количество колоний	%
1	М. В-5	210	100	114	54,2	50	23,8	0	0
2	М. bovis-8	158	100	62	39,2	23	14,8	2	1,2

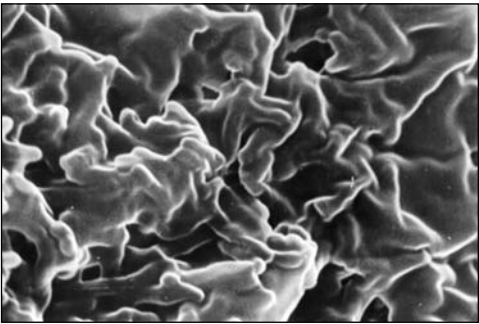


Рис. 1 Поверхность М. В-5, сканограмма, увеличение x 7000.

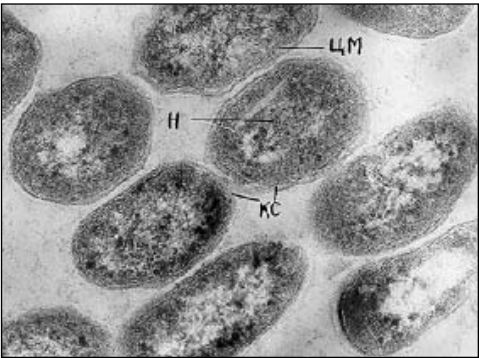


Рис. 2. Поверхность М. bovis, сканограмма, увеличение x 7000

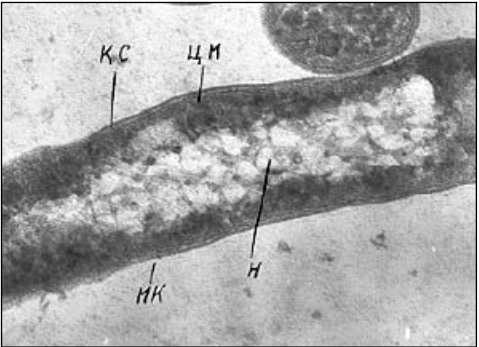


Рис. 3. Ультраструктура микобактерии М. В-5 в норме (контрольный препарат).

воздействия «Дезоксона-1» определяли методом серийных разведений с последующим высевом на плотные питательные среды и прямым подсчетом выросших колоний [2].

Для изучения структурных изменений микобактерий при воздействии препарата «Дезоксон-1» использовали общепринятые методы сканирующей и трансмиссивной электронной микроскопии.

Фиксацию, обезвоживание и заливку микобактерий осуществляли общепринятым методом [3].

Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-4802 (Швеция). Полученные срезы монтировали на опорные сеточки и просматривали на электронном микроскопе «Hitachi-12» (Япония).

Для сканирующей электронной микроскопии препараты микобактерий готовили по методике И. П. Павловой с соавт. [4]. Препараты просматривали в сканирующем электронном микроскопе «Hitachi-800» (Япония).

Для изучения влияния дезинфицирующего препарата на функциональное состояние клетки, были получены мембранные препараты микобактерий, для чего клетки выращивали в жидкой среде Сотона. Выращенную бактериальную массу гомогенизировали с помощью гомогенизатора типа Поттера-Эльвея в буферном растворе 0,04 М Трис-НСl с 0,001 М MgSO₄. Для разрушения микобактерий их предварительно замораживали и затем продавливали через узкую щель пресса типа Хьюза.

Мембранные препараты микобактерий получали методом дифференциального центрифугирования [5].

В качестве экзогенных субстратов для оценки активности ферментов в полученных препаратах использовали НАДН-, малат-, лактат- и сукцинат натрия.

Оксидазную активность ферментов в мембранных препаратах микобактерий определяли полярографическим методом на приборе LP-7 (Респ. Чехия) на ячейке Х.Ф. Шольца и Д.Н. Островского [6]. Дегидрогеназную активность определяли спектро-

Таблица 2.

Влияние препарата «Дезоксон-1» на оксидазные активности *M. B-5* и *M. bovis-8*

№ п/п	Виды микобактерий	Концентрация «Дезоксона-1», (мкл/мл)	Субстраты							
			НАДН		Малат		Лактат		Сукцинат	
			нМ/мин. на мг белка	%	нМ/мин. на мг белка	%	нМ/мин. на мг белка	%	нМ/мин. на мг белка	%
1	<i>M. B-5</i>	0	114	100	9	100	14	100	11	100
		10	118	103,5	10	111,1	14	100	-	-
		20	74	64,9	6	16,6	11	78,5	7	63,6
		40	39	34,2	4	44,4	5	35,7	3	27,2
2	<i>M. bovis-8</i>	0	121	100	11	100	15	100	12	100
		10	116	95,8	12	109	12	80	-	-
		20	81	67	3	26,2	7	46,6	9	75
		40	38	31,4	2	18,1	4	26,6	1	8,3

фотометрически [6] на спектрофотометре «Beckman-35» (США). Белок определяли по методу Лоури с соавторами [7].

Результаты исследований.

Проведено изучение *in vitro* динамики гибели микобактерий *M. B-5* и *M. bovis-8* при воздействии препарата «Дезоксон-1». Результаты исследований представлены в таблице 1.

Из данных таблицы 1 видно, что примерно половина популяций микобактерий погибли после 5-минутного контакта с 0,01%-ным раствором «Дезоксона-1», после 60-минутного контакта препарата с микобактериями при этой концентрации не осталось жизнеспособных микобактерий *M. B-5*. В то же время у микобактерии штамма *M. bovis-8* остались жизнеспособными около 1%.

Полученные данные динамики гибели микобактерий при воздействии препарата «Дезоксон-1» использованы для определения времени начального (T_{10}), сублетального (T_{50}) и летального его действия (T_{90}) на микроорганизмы.

Результаты исследования микобактерий до воздействия препарата «Дезоксон-1» на сканирующем электронном микроскопе показали, что колонии быстрорастущего сапрофита *M. B-5* имеют общее для всех клеток покрытие. Клетки не просматриваются, колонии имеют слоистое строение, где отдельные участки располагаются в виде лепестков цветка (рис. 1).

Исследование колонии культуры патогенной микобактерии *M. bovis-8* показало, что клетки покрыты мощным покровом. На периферии покрова видны лишь очертания отдельных клеток закрытых общим покровом (рис. 2).

При воздействии бактерицидных концентраций препарата «Дезоксон-1» на микобактерии *M. B-5* и *M. bovis-8* отмечали локальное разрушение поверхностного покрова микроколоний, клеточной стен-

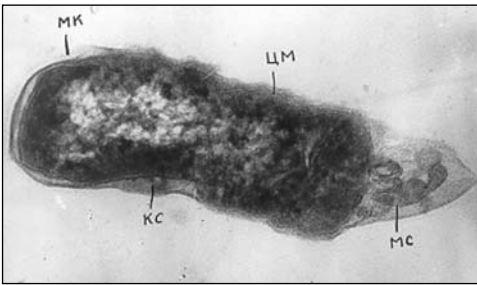


Рис. 4. Ультраструктура микобактерии *M. Bovis-8* в норме (контрольный препарат)

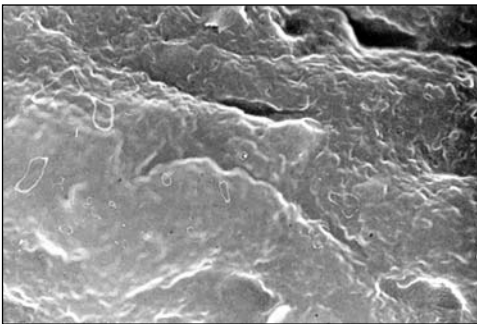


Рис. 5. Результат воздействия бактерицидной концентрации «Дезоксона 1» на *M. B5*



Рис. 6. Результат воздействия бактерицидной концентрации «Дезоксона 1» на *M. bovis-8*

Влияние препарата «Дезоксон-1» на дегидрогеназные активности *M. B-5* и *M. bovis-8*

№ п/п	Виды микобактерий	Концентрация «Дезоксона-1», (мкл/мл)	Субстраты							
			НАДН		Малат		Лактат		Сукцинат	
			нМ/мин. на мг белка	%	нМ/мин. на мг белка	%	нМ/мин. на мг белка	%	нМ/мин. на мг белка	%
1	<i>M. B-5</i>	0	178	100	18	100	12	100	15	100
		1,0	103	57,8	10	55,5	14	116,6	17	113,3
		2,0	74	41,5	4	22,2	6	50	3	20
2	<i>M. bovis-8</i>	0	26	100	5	100	6	100	4	100
		5	20	76,9	5	100	5	100	5	125
		10	15	56,6	2	40	4	66,6	4	100
		20	12	4,6	2	40	1	16,6	2	50

ки и цитоплазматической мембраны клеток (рис. 5, 6).

Изучение ультраструктуры сапрофитного штамма микобактерий (*M. B-5*) показало в нем наличие трехслойной клеточной стенки, состоящей из двух осмиофильных и между ними осмиофобного слоя. Цитоплазматическая мембрана имела трехслойную структуру. В цитоплазме клеток обнаруживали рибосомы и полирибосомы. В центральной части располагался осмиофильный фибриллярный нуклеид. В отдельных участках цитоплазмы выявлялись электронно-прозрачные вакуоли (рис. 3).

На ультратонких срезах до воздействия «Дезоксона-1» на микобактерии *M. bovis-8* (контроль) выявляется четко выраженная трехслойная клеточная стенка. Ее наружный осмиофильный слой толщиной 3-8 нм ограничивает каждую клетку. Наружный слой имел вид бахромчатой каймы. Цитоплазматическая мембрана микобактерии имеет трехслойное строение, толщина ее 9-10 нм. Два осмиофильных слоя разделены осмиофобным слоем такой же толщины. Цитоплазма *M. bovis-8* равномерной плотности, осмиофильная, заполнена рибосомами и более крупными – полирибосомами. В цитоплазме расположены включения, чаще по полюсам клетки и различные конфигурации мембранной структуры. Нуклеоид занимает значительное пространство в центральной части клетки и представлен осмиофобной зоной, содержащей осмиофильные фибриллы ДНК, толщиной 1-3 нм (рис. 4).

Начальное действие (T_{10}) «Дезоксона-1» на микобактерии *M. B-5* и *M. bovis-8* видимых структурных изменений не вызвало.

При летальном действии (T_{90}) препарата «Дезоксон-1» на микобактерии *M. B-5* отмечали локальные разрушения клеточной стенки и цитоплазматической мемб-

раны. Отхождение клеточной стенки от цитоплазматической мембраны в цитоплазме обнаруживали электроннопрозрачные участки. Полирибосомы и рибосомы четко не выявлялись, в отдельных участках наблюдалась полимеризация нуклеоида (рис. 5).

При летальном (T_{90}) действии препарата «Дезоксон-1» наблюдали аналогичные структурные изменения в микобактериях *M. bovis-8* (рис. 6).

В дальнейшем проводили исследования влияния препарата «Дезоксон-1» на окислительно-восстановительные ферменты микобактерий *M. B-5* и *M. bovis-8*. Результаты экспериментов действия препарата «Дезоксон-1» на микобактерии *M. B-5* и *M. bovis-8* представлены в таблице 2.

Из данных таблицы 2 видно, что при воздействии «Дезоксона-1» на оксидазы мембранных препаратов изученных видов микобактерий *M. B-5* и *M. bovis-8* происходило угнетение НАДН-, малат-, лактат- и сукцинатоксидаз в концентрации препарата от 20 мкл/мл до 40 мкл/мл. Однако более низкая концентрация «Дезоксона-1» (10 мкл/мл) вызывала некоторую стимуляцию НАДН-, малатоксидаз микобактерий *M. B-5* и *M. bovis-8*.

Следующим этапом исследования явилось изучение действия препарата «Дезоксон-1» на активность ферментов НАДН-, малат-, лактат- и сукцинат-дегидрогеназ микобактерий *M. B-5* и *M. bovis-8*.

Результаты проведенных экспериментов представлены в таблице 3.

Данные таблицы 3 показывают, что наиболее высокая ферментативная активность дегидрогеназ наблюдалась при добавлении субстрата НАДН, как у *M. B-5* и *M. bovis-8*. При этом отмечалась сравнительно высокая дегидрогеназная активность в мембранных препаратах *M. B-5*.

При воздействии препарата «Дезок-

сон-1» в более высоких концентрациях, отмечается резкое угнетение дегидрогеназной активности. Однако при добавлении «Дезоксона-1» в низких концентрациях 1 мкл/мл отмечено некоторое увеличение активности лактат- и сукцинатдегидрогеназ М.В-5.

Таким образом, изучение действия препарата «Дезоксон-1» на микобактерии М. В-5 и М. bovis-8 показало, что по устойчивости к испытанному препарату эти микроорганизмы близки. Электронно-микроскопическое исследование также показало схожесть их морфологии и структуры. Однако установлено, что ферментативная активность, как оксидаз, так и дегидрогеназ ниже в мембранных препаратах М. bovis-8, по сравнению с М.В-5. Препарат «Дезоксон-1» вызывает аналогичные структурно-функциональные изменения в микобактериях М.В-5 и М. bovis-8. Более чувствительно к воздействию «Дезоксона-1» дегидрогеназы, по сравнению с оксидазами. При воздействии низкой концентрации «Дезоксона-1» на лактат- и сукцинатдегидрогеназы микобактерии наблюдается стимуляция активности.

Как известно, в состав препарата «Дезоксон-1» входят перекись водорода, уксусная кислота и хинозол. По данным М.В. Гусева с соавторами [8], при разложении перекиси водорода, образуются атомарный кислород и другие токсичные для клеток гидроксильные радикалы, которые мо-

гут привести к утрате способности клеток формировать колонии, повреждению белков, нуклеиновых кислот, клеточных мембран. На наш взгляд, активные формы кислорода и токсические радикалы при воздействии на микобактерии вызывают перекисное окисление ненасыщенных жирных кислот, окисление SH-групп и триптофановых остатков в белках, что приводит к разрушению клеточной стенки, цитоплазматической мембраны клетки. В дальнейшем они могут реагировать с ионами металлов и приводят к повреждениям нуклеиновых кислот, белков и других биополимеров, угнетению активности жизненно важных ферментов.

Выводы

1. По структурно-морфологической организации штаммы микобактерий М. В-5 и М. bovis-8 имеют характерные для микобактерий клеточный покров, клеточную стенку и мембрану, состоящую из двух осмиофильных и, расположенного между ними, одного осмиофобного слоя.

2. Препарат «Дезоксон-1» вызывал у сапрофитного штамма М. В-5 и патогенного штамма М. bovis-8 аналогичные структурные изменения, в частности – разрушение поверхностного покрова, клеточной стенки и цитоплазматической мембраны.

3. Препарат «Дезоксон-1» в концентрации 20-40 мкл/мл угнетал оксидазную и в концентрации 2-20 мкл/мл – дегидрогеназную активность микобактерий.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты изучения структурных и функциональных изменений штаммов микобактерий М. В-5 и М. bovis-8 при воздействии дезинфицирующего средства «Дезоксон-1». Определена зависимость активности оксидаз и дегидрогеназ в мембранных препаратах микобактерий при различных концентрациях препарата «Дезоксон-1»

SUMMARY

Results of studying of structural and functional changes of a strains Mycobacteria: М. В-5 and bovis-8 are presented at influence of a disinfectant «Dezoxon-1». Oxidase and dehydrogenase activity in membrane preparations of М. В-5 and bovis-8 at various concentration of a «Dezoxon-1» are determined.

Литература

- Щепилов Н.Н., Кисленко В.Н., Выживаемость возбудителей туберкулеза во внешней среде. Сибирский вестник с.-х. науки, 1973, № 5, с. 77-79.
- Куликовский А.В. Методические приемы по изучению структурно-функциональных изменений микроорганизмов при воздействии дезинфицирующих средств. Проблемы ветеринарной санитарии. М. 1976, т. 33, с. 131-137.
- Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих. Изд-во Мир. М. 1975, 324 с.
- Павлова И.Б., Тарабукина Н.П., Методические рекомендации по приготовлению препаратов монослойных культур некоторых видов дерматофитов для изучения в световом и электронном микроскопах. М. 1983, 4 с.
- Гельман Н.С., Лукоянова М.А., Островский Д.Н. Мембраны бактерий и дыхательная цепь. М., Наука, 1972, 189 с.
- Шольц Х.Ф., Островский Д.Н. Ячейка для амперометрического определения кислорода. Методы современной биохимии. М., Наука, 1975, с. 52-58.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L. e.a. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, v.193, No 1, p. 265-275.
- Гусев М.В., Минеева Л.А. Микробиология. М. Изд-во МГУ, 1992, 447 с.