

WPŁYW WYBRANYCH NIEJONOWYCH ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO-CZYNNYCH NA NIEKTÓRE WŁASNOŚCI FIZJOLOGICZNE SZCZEPU PSEUDOMONAS PUTIDA MT-2

W pracy określono wpływ związków powierzchniowo-czynnych typu pluroników i tetroników na intensywność poboru tlenu i metabolizm cukrów u szczepu Pseudomonas putida mt-2. Badane preparaty związków powierzchniowo-czynnych obniżyły intensywność poboru tlenu przez komórki bakteryjne. Adaptacja tych komórek do pluroniku lub tetroniku zwiększyła intensywność poboru tlenu w procesie oddychania. Obecność badanych związków powierzchniowo-czynnych w podłożu nie wpływała na sposób metabolizmu glukozy, laktozy, maltozy i sacharozy natomiast przyspieszała rozkład skrobi.

Związki chemiczne mogą wywołać zmiany cech u mikroorganizmów narażonych na ich ekspozycję [1, 2, 3, 4, 5]. Zmiany te mogą mieć charakter okresowy i wykształcone są na czas oddziaływania preparatu, bądź też trwale pozostają nawet po jego usunięciu. Efekty oddziaływania związane są ściśle z rodzajem związku oraz dawką i czasem ekspozycji [6, 7]. Niektóre substancje mogą stać się czynnikami modyfikującymi cechy komórki dopiero po dłuższym czasie ich działania. Bezpośredni kontakt różnych związków chemicznych i drobnoustrojów zdarza się bardzo często w środowisku naturalnym zwłaszcza w wodach powierzchniowych, zanieczyszczonych ściekami. Zanieczyszczenia chemiczne mogą wywoływać różne skutki. Do najczęściej sygnalizowanych należą zmiany jakościowe dokonujące się w biocenozie. Polegają one głównie na selekcji i eliminacji gatunków wrażliwych oraz preferowaniu rozwoju gatunków opornych, zaadaptowanych do wykorzystania określonych zanieczyszczeń jako źródeł węgla i energii. Ostatnio zwraca się uwagę na działanie związków chemicznych inicjujące zmienność cech komórki. Wśród szeregu substancji wprowadzanych do środowiska dość znaczną część stanowią związki powierzchniowo-czynne. Różnorodność występowania tych związków oraz oddziaływanie na organizmy wodne skłoniły autora do podjęcia badań nad wpływem niejonowych związków powierzchniowo-czynnych na Pseudomonas putida mt. 2.

Metodyka badań

Szczep ten otrzymano z Department of Biochemistry and Soil Science University College of North Wales. Bakterie z rodzaju Pseudomonas stanowią mikroflorę wód powierzchniowych.

W badaniach stosowano podłoże mineralne według Śiškinej i Trocenko [8], o składzie: KH_2PO_4 — 1,56 g; Na_2HPO_4 — 2,13 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ — 0,5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,2 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ — 0,01 g; H_2O destylowana — 1000 ml; pH 7 — 7,2. Pod-

łoże to wzbogacono mikroelementami według Norris i Ribbons [9]. W zależności od wymagań eksperymentu do tak przygotowanego podłoża wprowadzono dodatkowe związki chemiczne jak glukoza, laktoza, maltoza, sacharoza, skrobia, badane surfaktanty lub też substraty dla analizowanych reakcji enzymatycznych.

W badaniach stosowano dwa niejonowe związki powierzchniowo-czynne: jeden typu pluroników i drugi typu tetroników stosowane w produkcji środków piorących i myjących. Badany związek z grupy pluroników określany jako 400/80 posiadał średnią masę cząsteczkową wynoszącą 2180. Średnia masa cząsteczkowa ugrupowania hydrofobowego odpowiadała 400. Zawartość procentowa tlenu etylenu 80,8%.

Przyjęty do badań tetronik określany symbolem 2300/20 posiadał następującą charakterystykę: średnia masa cząsteczkowa kopolimeru wynosiła 2900 z czego 2300 stanowiło masę ugrupowania hydrofobowego.

Tlenek etylenu stanowił 20% masy cząsteczkowej. Zarówno preparat z grupy pluroników jak i tetroników syntetyzowano w Instytucie Technologii Organicznej i Tworzyw Sztucznych Politechniki Wrocławskiej.

Wpływ badanych związków powierzchniowo-czynnych na funkcje życiowe

Intensywność oddychania określano techniką manometryczną w aparacie Warburga według metodyki podanej przez Umbreit i innych [10]. Wyrażano ją poprzez ilość pobranego tlenu w ciągu 120 minut przez komórki szczepu Pseudomonas putida mt-2 w obecności badanych związków powierzchniowo-czynnych. Związki 2300/20 i 400/80 stanowiły jedyny substrat oddychania lub towarzyszyła im glukoza.

Metabolizm glukozy, laktozy, maltozy i sacharozy sprawdzano na płynnym podłożu mineralnym według Śiškinej i Trocenko [8] wzbogaconym mikroelementami według Norris i Ribbons [9]. Do przy-

gotowanego podłoża dodawano sterylne roztwo-
ry cukrów tak aby ich stężenie w podłożu wynosiło
5 g/l, związki powierzchniowo-czynne w ilości 3
i 10 g/l oraz błękit bromotymolowy jako wskaźnik.
Kontrolę stanowiło podłoże mineralne z badanym
cukrem bez związku powierzchniowo-czynnego.
Próby zaszczipione w trzech powtórzeniach inku-
bowano w termostacie o temperaturze 30°C przez
72 godz. Kontrolę procesu metabolizowania pro-
wadzono poprzez obserwację wzrostu, zmiany
barwy podłoża (wytwarzanie kwasu) oraz obecno-
ści gazu w rurekach fermentacyjnych.

Metabolizm wielocukrów sprawdzano na podłożu
mineralnym ze skrobią. W tym celu do podłoża
podstawowego wg Śiškiniej i Trocenko dodawano
skrobię tak, by otrzymać jej stężenie 0,5 g/l. Po-
dobnie jak poprzednio do podłoża dodawano
jeden z badanych związków powierzchniowo-czyn-
nych w stężeniach 3 i 10 g/l. Próby kontrolne
zawierały skrobię jako jedyne źródło węgla i ener-
gii. Zaszczepione próby inkubowano przez 12 dni
w termostacie o temperaturze 30°C w warunkach
hodowli stacjonarnej. Kontrolę procesu biodegra-
dacji skrobi prowadzono oznaczając jej ilość co
drugi dzień według metodyki podanej przez Szcze-
klika [11]. Równocześnie dokonywano pomiaru
aktywności amylazowej komórek inkubowanych
w powyższych warunkach.

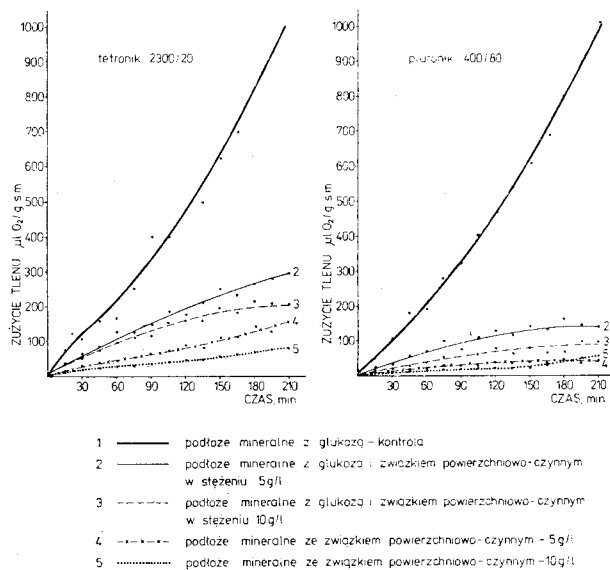
Ze stacjonarnych hodowli szczepu *Pseudomonas*
putida mt—2 w obecności badanych związków
powierzchniowo-czynnych odbierano co drugi
dzień przez dwa tygodnie po 20 ml hodowli i odwi-
rowywano zawiesinę bakterii przy szybkości 8000
obrotów/minutę. Otrzymany osad trzykrotnie prze-
mywano 0,9% roztworem NaCl i rozcieńczano by
otrzymać dla dziesięciokrotnego rozcieńczenia
ekstynkcję $E_{550}=0,6$. Tak przygotowana zawiesina
komórek bakteryjnych posłużyła następnie do oz-
naczenia aktywności amylazowej.

W tym celu do 1 ml zawiesiny bakterii dodawano
1 ml roztworu substratu (skrobia — 1 g/l) i inku-
bowano w łaźni wodnej o temperaturze 30°C
przez 10—12 minut. Następnie dodano 1 ml 0,01
N J_2 i uzupełniano wodą destylowaną do 10 ml.
Natychmiast odczytywano ekstynkcję przy długo-
ści fali $\lambda=660$ nm wobec próby zawierającej
0,01 N J_2 z wodą destylowaną. Otrzymane wyniki
odnoszono do krzywej standardowej i odczytywa-
no zawartość skrobi. Jako aktywność jednostkową
przyjęto taką aktywność, która powodowała w wa-
runkach testu rozłożenie 1 g skrobi do produktów
nie dających barwy z jodem.

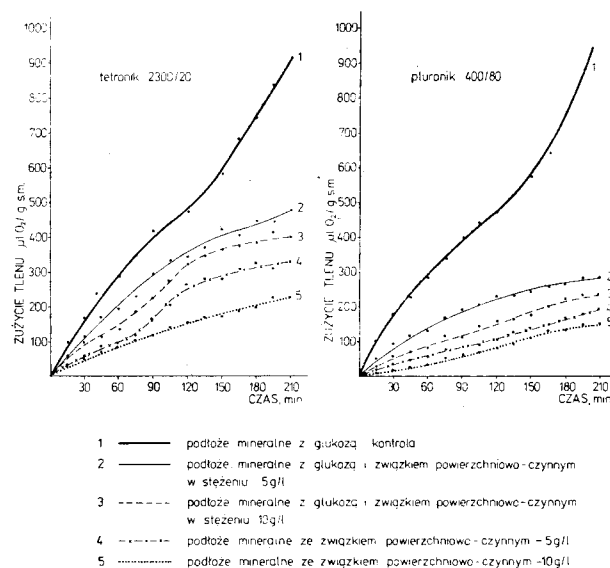
Wyniki badań

Pomiary intensywności oddychania *Pseudomonas*
putida mt—2 przeprowadzono metodą manome-
tryczną Warburga. W tym celu założono hodowle
szczepu, zawierającego w podłożu przy obecności
lub braku glukozy badane związki powierzchniowo-
czynne typu pluroników 400/80 i tetroników 2300/
20 w stężeniach 5 i 10 g/l. Kontrolę procesu sta-
nowiły hodowle z glukozą jako jedynym źródłem
węgla. Hodowle prowadzono w kolbach o pojem-
ności 500 ml zachowując ciągle natlenianie po-
wietrzem przechodzącym przez płuczki z 10%

roztworem KOH. Zestawy hodowlane umieszczone
były w termostacie o temperaturze 30°C. Każdy
z wariantów hodowli prowadzono w trzech po-
wtórzeniach. Co drugi dzień dokonywano pomiaru
zmętnienia hodowli z użyciem spektrofotometru
Specol, a po upływie pięciu dni dokonywano po-
miaru intensywności poboru tlenu przez bakterie.
Ilość pobranego tlenu w ciągu 120 minut określa-
no techniką manometryczną w aparacie Warburga
według metodyki podanej przez Umbreit [10]. Ba-
dania te prowadzono dla nieadaptowanych i ada-
ptowanych komórek szczepu *Pseudomonas putida*
mt—2. Adaptację prowadzono inkubując bakterie
przez okres pięciu dni na płynnym podłożu mine-
ralnym zawierającym badane związki powierzch-
niowo-czynne. Intensywność poboru tlenu przez
adaptowane i nieadaptowane komórki szczepu
Pseudomonas putida mt—2 inkubowane w różnych
warunkach ilustrują rys. 1 i 2.



Rys. 1 Pobór ilości tlenu przez nieadaptowane komórki szczepu *Pseudomonas putida* mt—2 w obecności badanych związków powierzchniowo-czynnych



Rys. 2 Pobór ilości tlenu przez adaptowane komórki szczepu *Pseudomonas putida* mt—2 w obecności badanych związków powierzchniowo-czynnych

Stwierdzono, iż komórki bakteryjne inkubowane na podłożach zawierających badane preparaty pobierały mniejsze ilości tlenu aniżeli inkubowane w warunkach kontrolnych. Przy zastosowaniu wyższego stężenia związków powierzchniowo-czynnych efekt ten był bardziej wyraźny. Zaobserwowano, że najmniejszą aktywność oddechową wykazały hodowle zawierające pluronik czy tetronik jako jedyne źródło węgla i energii. Mniejsze ilości tlenu pobierały komórki inkubowane na podłożu zawierającym pluronik 400/80. Po adaptowaniu komórek bakterii obserwowano wzrost intensywności procesu oddechowego we wszystkich próbach zawierających w podłożu związek powierzchniowo-czynny i to zarówno przy obecności jak i bez glukozy.

Na podstawie otrzymanych wyników należy stwierdzić, iż badane preparaty obniżały intensywność poboru tlenu przez komórki szczepu *Pseudomonas putida* mt—2. Adaptacja komórek do związków powierzchniowo-czynnych podwyższała intensywność procesu oddychania. We wszystkich próbach, zawierających związki powierzchniowo-czynne, stwierdzono wzrost intensywności poboru tlenu.

Podczas analizowania wpływu badanych związków powierzchniowo-czynnych przetestowano 100 kolonii szczepu *Pseudomonas putida* mt—2 wywodzących się z jednej macierzystej. Przygotowane podłoża zaszczepiono zawiesinami z poszczególnych kolonii. Inkubowano następnie w termostacie o temperaturze 30°C przez okres siedmiu dni. Po upływie tego czasu określano różnice w sposobie metabolizowania cukrów.

Wyniki przedstawiające metabolizm glukozy, laktozy, maltozy i sacharozy u *Pseudomonas putida* mt—2 przy obecności badanych związków powierzchniowo-czynnych w podłożu ilustruje tabela 1. Obecność związków powierzchniowo-czynnych w podłożu nie wywoływała zasadniczo zmian w sposobie metabolizowania czterech wybranych cukrów. Przedłużenie czasu oddziaływania do 12 dni nie wpłynęło również na widoczne zmiany.

Odmienne wyniki otrzymano podczas określania wpływu badanych związków powierzchniowo-czynnych na metabolizm skrobi. Ilość skrobi stwierdzoną w supernatancie hodowli szczepu *Pseudomonas putida* mt—2 w obecności badanych związków powierzchniowo-czynnych przedstawiono w tabeli 2. Obserwowano zwiększenie się tempa biodegradacji skrobi wówczas, gdy do podłoża dodawano tetronik 2300/20. Efekt ten był wyraźniejszy przy zastosowaniu wyższego stężenia badanego preparatu. W ostatnim dniu eksperymentu, w próbce zawierającej tetronik 2300/20 w stężeniu 3 g/l obniżenie się ilości skrobi w stosunku do próby kontrolnej o 225 mg a przy zastosowaniu stężenia 10 g/l o 165 mg. W próbach z dodatkiem pluroniku 400/80 nie stwierdzono zwiększonego tempa biodegradacji skrobi.

Jak wykazały dalsze badania zwiększone tempo biodegradacji skrobi związane było również z podwyższeniem się aktywności amylazowej komórek szczepu *Pseudomonas putida* mt—2 (tabela 3). Hodowla bakteryjna inkubowana w obecności tetroniku 2000/20 wykazywała wyższą aktywność

Tabela 1
METABOLIZM CZTERECH CUKRÓW U SZCZEPU *PSEUDOMONAS PUTIDA* MT-2 INKUBOWANEGO W OBECNOŚCI ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO-CZYNNYCH

Rodzaj podłoża hodowanego	Rodzaj testowanego cukru	Ilość namnożonych kolonii	Ilość kolonii zakwaszających podłoże	Ilość kolonii wytwarzających gaz
Podłoże mineralne z glukozą	GLUKOZA	99	99	0
Podłoże mineralne z glukozą i pluronikiem 400/80 3 g/l		98	98	0
Podłoże mineralne z glukozą i pluronikiem 400/80 10 g/l		96	96	0
Podłoże mineralne z glukozą i tetronikiem 2300/20 3 g/l		98	98	0
Podłoże mineralne z glukozą i tetronikiem 2300/20 10 g/l		99	99	0
Podłoże mineralne z sacharozą		SACHAROZA	97	97
Podłoże mineralne z sacharozą i pluronikiem 400/80 3 g/l	100		100	0
Podłoże mineralne z sacharozą i pluronikiem 400/80 3 g/l	100		100	0
Podłoże mineralne z sacharozą i tetronikiem 2300/20 3 g/l	100		100	0
Podłoże mineralne z sacharozą i tetronikiem 2300/20 10 g/l	100		100	0
Podłoże mineralne z laktozą	LAKTOZA		100	0
Podłoże mineralne z laktozą i pluronikiem 400/80 3 g/l		100	0	0
Podłoże mineralne z laktozą i pluronikiem 400/80 10 g/l		100	0	0
Podłoże mineralne z laktozą i tetronikiem 2300/20 3 g/l		100	0	0
Podłoże mineralne z laktozą i tetronikiem 2300/20 10 g/l		100	0	0
Podłoże mineralne z maltozą		MALTOZA	100	0
Podłoże mineralne z maltozą i pluronikiem 400/80 3 g/l	100		0	0
Podłoże mineralne z maltozą i pluronikiem 400/80 10 g/l	100		0	0
Podłoże mineralne z maltozą i tetronikiem 2300/20 3 g/l	100		0	0
Podłoże mineralne z maltozą i tetronikiem 2300/20 10 g/l	100		0	0

Tabela 2
ROZKŁAD SKROBI STWIERDZANY W SUPERNATANCIE HODOWLI SZCZEPU *PSEUDOMONAS PUTIDA* MH-2 W OBECNOŚCI ZWIĄZKÓW POWIERZCHNIOWO-CZYNNYCH

Czas inkubacji (dni)	Podłoże mineralne ze skrobią	Ilość skrobi mg/l			
		Podłoże mineralne ze skrobią i pluronikiem 400/80 3g/l	Podłoże mineralne ze skrobią i pluronikiem 400/80 10 g/l	Podłoże mineralne ze skrobią i tetronikiem 2300/20 3 g/l	Podłoże mineralne ze skrobią i tetronikiem 2300/20 10 g/l
0	44,5±2,5 ^{x)}	510±	510±0	450±0	455±5
2	445 ±5	490±0	500±10	455±5	440±0
4	445 ±5	470±0	480±10	455±5	280±0
6	435 ±5	480±10	490±0	270±10	200±10
8	445 ±5	490±0	480±10	230±20	180±0
10	435 ±5	490±10	480±10	205±5	177±7,5
12	430 ±0	490±10	475±15	205±15	175±5

^{x)} wyniki jako średnia sześciu oznaczeń z uwzględnieniem średniego odchylenia od średniej

Tabela 3

**AKTYWNOŚĆ AMYLAZOWA SZCZEPU PSEUDOMONAS PUTIDA MT-2
PO INKUBACJI NA PODŁOŻU ZAWIERAJĄCYM ZWIĄZKI
POWIERZCHNIOWO-CZYNNE**

Czas inkubacji	Polożenie mineralne ze skrobią	Podłoże mineralne ze skrobią i pluronikiem 400/80 3 g/l	Podłoże mineralne ze skrobią i pluronikiem 400/80 10 g/l	Podłoże mineralne ze skrobią i tetronikiem 2300/20 3 g/l	Podłoże mineralne ze skrobią i tetronikiem 2300/20 10 g/l
		jedn. akt. x 10 ⁻⁴ /g suchej masy	jedn. akt. x 10 ⁻⁴ /g suchej masy	jedn. akt. x 10 ⁻⁴ /g suchej masy	jedn. akt. x 10 ⁻⁴ /g suchej masy
0	3,6±0,3 ^{xx}	4,3±0,3	3,6±0,3	3,6±0,7	4,3±0,3
2	3,0±0,3	3,0±0,2	3,6±0,3	6,0±0,7	6,3±0
4	3,6±1,0	3,6±0,3	3,6±1,6	5,6±1,0	6,3±1,0
6	5,0±0,3	5,6±1,0	5,6±0,7	6,6±1,3	6,0±0,7
8	3,6±0,3	3,6±0,3	4,3±0,3	6,0±0,7	7,0±0,3
12	3,6±0,3	4,0±0,7	6,0±0	6,6±0,7	6,3±0

x — średnie odchylenie od średniej
xx — jednostka aktywności przypadająca na 1 g suchej masy

amylazową w czasie całego okresu trwania eksperymentu w porównaniu z próbą kontrolną. Różnice w oddziaływaniu badanych stężeń tego preparatu były nieznaczne. Związek powierzchniowo-czynny typu pluroników nie wywoływał istotnego stymulującego działania na aktywność amylazową. Na podstawie otrzymanych wyników można stwierdzić, że badane preparaty w różny sposób wpływały na metabolizm cukrów. Nie zmieniały one zasadniczo sposobu metabolizowania glukozy, maltozy i sacharozy natomiast modulowały metabolizm skrobi przyspieszając jej rozkład.

Podsumowanie

Obecność pluroniku 400/80 lub tetroniku 2300/20 powodowała silne obniżenie respiracji mierzonej ilością pobranego tlenu w procesie oddychania. Efekt ten zmniejszała wcześniejsza adaptacja komórek bakterii do badanych związków powierzchniowo-czynnych.

Wpływ adaptacji bakterii do związków powierzchniowo-czynnych na zwiększenie aktywności dysymilacyjnej stwierdziła również w swoich badaniach Rzechowska [12]. Potwierdzeniem oddziaływania związków powierzchniowo-czynnych typu pluroników lub tetroników na komórki bakterii są badania nad zmiennością metabolizowania skrobi. Przyspieszony jej rozkład powodowany był między innymi zwiększoną aktywnością amylazy w obecności badanych preparatów. Jak wynika z otrzymana-

nych danych dostając się do zbiornika wodnego badane związki powierzchniowo-czynne mogą wywołać zmiany cech mikroorganizmów go zamieszkujących. Zjawisko to jest niepożądane albowiem prowadzić może do zachwiania równowagi biologicznej ekosystemu. Zmienność cech mikroorganizmów może mieć również pozytywne skutki jeśli będzie się kierować tym procesem. Można bowiem indukować preparatami chemicznymi powstawanie komórek o poszukiwanych cechach. Znalazłoby to zastosowanie w procesie oczyszczania ścieków.

LITERATURA

- TORE AUNE 1979: Carcinogenicity of chemical compounds and their detection in several bacterial short-term tests NIPH Annals 2. 1. SSN, 0332—5652.
- ATSUO NAKATA, YAMAGUCHI MARIKO, IZUTANI KAZUKO, AMEMURA MIKSUKO 1973: Escherichia coli mutants deficient in the production of alkaline phosphatase isoenzymes. J. Bacteriol. 134. 1, 278—294.
- J. D. ELMORE, J. L. WONG, A. D. LUAMBACH, U. N. STREIPS 1977: Vinyl chloride mutagenicity via the metabolites chloroxirane and chloroacetaldehyde monomer hydrate. Biochim. et Biophys. Acta 442. 3, 405—419.
- G. J. RUBAN, 1976: Izmienie Aspergillus flavus Lk ex Fr pod dieistviem pentachlorofenolata natria. Mikologia i fitopatologia 10, 4, 326—327.
- J. SINGH, B. RANGANATHAN, 1974: Effect of some chemical mutagens on proteolytic activity in Lactobacilli. Acta Microbiol. Polon. Ser. B., 6, 1, 5—20.
- CH. AUREBACH, 1976: Mutation Research Problems, results, perspectives. London, Chapman and Hall.
- R. SUSMUTH, F. LINGENS, 1976: Mutagenic and inactivating effects of methyl alkylmethylsulfonates on Escherichia coli. Mutat. Res. 36, 3, 275—281.
- W. N. SISKINA, I. A. TROCENKO, 1974: Svoistva novogo stamma Hyphomicrobium ispolzuiusiego odnouglerodnyie soedinenia. Mikrobiologia, Wyp. 5, 765—776.
- J. R. NORRIS, D. W. RIBBONS, 1970: Methods in microbiology Vol. 3A Academic Press, London and N.I.
- W. W. UMBREIT, R. H. BURRIS, IFF. STANFFER, 1964: Manometric techniques Burgess Publishing Company.
- E. SZCZEKLIK, 1974: Enzymologia kliniczna PWN Warszawa.
- E. RZECHOWSKA, 1976: Studies on the biodegradation of nonionic surfactants applied in the polyester fibre industry. Acta Microbiol. Polon. 25, 4, 353—360.