

ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ КУЛЬТУРЫ ИНFUЗОРИЙ *PARAMECIUM CAUDATUM* ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИЛЬТРАТОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР РОДА *ACINETOBACTER*

Исследовано воздействие фильтратов, содержащих метаболиты бактерий, выделенных из многолетне мерзлых пород, на физиологические параметры инфузорий *Paramecium caudatum*. Показано, что фильтраты, полученные при разных температурах культивирования бактерий, оказывают, в основном, угнетающий эффект на исследуемые показатели.

Ключевые слова: бактерии, метаболиты, мерзлые породы, гидробионты.

При проведении геологоразведочных работ, воздействии других антропогенных и естественных процессов на многолетне – мерзлые породы в экосистемы вносятся микроорганизмы, не характерные для данной геологической эпохи, что приводит к появлению в экосистемах новых микробных компонентов. Их влияние на современные организмы практически не изучено [1,2]. Исследование взаимоотношения между организмами разных уровней организации может представлять большой интерес [3].

Целью нашей работы было изучение физиологических параметров инфузорий (*Paramecium caudatum*) при воздействии на них разных доз фильтратов бактериальных культур, полученных при двух температурах – +36°C и +4°C.

Бактерии культивировали на среде ГРМ при двух температурах +36°C и +4°C. Смывы бактерий со среды производили дистиллированной водой в объеме 5 мл. Плотность бактериальной взвеси 10⁸ мкл/мл. Взвеси микробных клеток в дистиллированной воде инкубировали в термостате при выше указанных температурах в течение 5 дней, после чего производили фильтрацию через бактериальный фильтр «Millipore» с размером пор 0.22 мкм. Фильтраты добавляли в питательную среду инфузорий в дозах 5 мкл., 10 мкл., 20 мкл., 30 мкл. Изучали следующие показатели: плотность культуры инфузорий, поведенческие реакции инфузорий – двигательную активность и хемотаксис. Плотность культуры учитывали на 3, 5, 7 и 9 день наблюдения, поведенческие реакции на 3-й и 9-й день [4].

Использовали следующие бактериальные штаммы: *Acinetobacter spp.*, *Acinetobacter junii*, идентифицированные по 16S ribosomal RNA gene. Первичный сравнительный анализ полученных de novo последовательностей с последовательностями базы данных GenBank проводили с помощью программы Blast [5]. Редактирование последова-

тельности, выявление открытой рамки считывания и компьютерное транслирование проводили с помощью программы BioEdit. Оба штамма выделены из кернов скважины, пробуренной в районе Тарко-Сале. Штамм *Acinetobacter junii* выделен из кернов содержащих отторфованный суглинок с глубины 4.2 м. с возрастом порядка 5000 лет. Штамм *Acinetobacter spp.* выделен из керна с глубины 20 м. с возрастом породы порядка 20000 лет.

Во все сроки эксперимента при добавлении фильтрата *Acinetobacter junii* во всех используемых дозах, полученных при +36°C, наблюдалось достоверное снижение плотности культуры инфузорий по сравнению с контролем (табл.1). Изменение двигательной активности инфузорий в указанные сроки наблюдений достоверно не отличается от контроля. При исследовании хемотаксиса инфузорий отмечается достоверное снижение этого показателя на 9 сутки. Наиболее выраженное снижение данного показателя наблюдается при использовании более высоких доз фильтратов.

Фильтрат *Acinetobacter junii*, полученный при температуре +4°C. оказывает аналогичное воздействие на изменение плотности инфузорий. Наблюдается достоверное снижение данного показателя при использовании различных доз по сравнению с контролем (табл.1): доза фильтрата в 5 мкл. оказывает более выраженное угнетающее действие с 5 по 9 сутки эксперимента, чем его более высокие дозы. Оценка двигательной активности свидетельствует о снижении данного показателя по сравнению с контролем на 3 сутки при использовании дозы в 20 мкл и на 9 сутки при добавлении в среду инфузорий фильтрата бактерий в дозе 5 мкл. В остальных случаях не выявлено достоверного изменения исследуемого показателя по сравнению с контролем (табл.1). На 9 сутки наблюдается снижение ($P < 0,05$) хемотаксиса инфузорий при действии доз в 5 мкл., 10 мкл. и 20 мкл.

Таблица 1. Физиологические параметры инфузорий на 9 сутки эксперимента при воздействии фильтратов бактериальных культур, полученных при разных температурах культивирования

Вариант эксперимента	Доза, мкл	Фильтраты, полученные при +36 °С			Фильтраты, полученные при +4 °С		
		Плотность	Двиг. активность	Хемотаксис	Плотность	Двиг. активность	Хемотаксис
Контроль		44,00±1,1	14,23±0,5	9,83±0,5	44,00±1,1	14,23±0,5	9,83±0,5
Фильтрат <i>Acinetobacter junii</i>	5	22,67±0,8*	10,00±0,0*	9,40±0,3*	17,07±2,5*	7,33±1,1*	6,40±0,9*
	10	22,20±1,6*	11,27±0,4*	4,53±0,6*	25,13±0,1*	12,00±0,4	11,73±0,3*
	20	23,67±0,9*	11,47±0,2*	3,13±0,1*	23,60±0,5*	10,80±0,1	12,00±0,3*
	30	20,40±2,7*	10,13±1,6	4,73±0,8*	23,27±0,6*	10,00±0,0	10,00±0,0
Фильтрат <i>Acinetobacter spp.</i>	5	21,67±0,8*	8,20±0,8*	7,67±0,6*	23,73±0,5*	8,27±0,6*	5,40±0,3*
	10	25,00±0,0*	10,40±0,2*	9,80±0,1*	20,87±0,9*	8,60±0,7*	8,40±0,1*
	20	23,07±0,4*	7,80±0,4*	9,40±0,3*	22,00±0,5*	9,60±0,2*	5,80±0,1*
	30	23,07±0,5*	10,00±0,0*	11,33±0,3	22,53±0,6*	9,60±0,3*	6,87±0,1*

Примечание: * – статистически достоверные различия ($P < 0,05$) с контролем

Фильтрат *Acinetobacter spp.*, полученный при температуре +36°С., во всех используемых дозах достоверно снижает плотность культуры инфузорий по сравнению с контролем (табл. 1) во все сроки наблюдения. Оценка двигательной активности свидетельствует о снижении данного показателя по сравнению с контролем во все регистрируемые сроки эксперимента. Аналогичная картина наблюдается при изучении хемотаксиса культуры инфузорий.

Фильтрат *Acinetobacter spp.*, полученный при температуре +4°С., снижает плотность культуры инфузорий по сравнению с контролем во все сроки наблюдений, независимо от используемой дозы. Аналогичные результаты получены при изучении двигательной активности и хемотаксиса инфузорий.

Таким образом, метаболиты бактерий, содержащихся в среде культивирования могут оказы-

вать влияние на одноклеточных гидробионтов. В большинстве случаев они подавляют размножение инфузорий *Paramecium caudatum* (показатель «плотность культуры»). Метаболиты бактерий, выращенных при разных температурах, могут обладать разной физиологической активностью. В большинстве случаев они снижают показатели двигательной активности и хемотаксиса, но выраженность воздействия может быть разной, вплоть до стимуляции (повышения) этих физиологических показателей, что особенно заметно проявляется при использовании в эксперименте фильтратов, полученных при культивировании бактерий при низких температурах. Обнаруженное угнетение физиологических показателей у простейших может быть звеном в направлении поиска бактериальных метаболитов, подавляющих патогенные формы подобных организмов.

14.09.2011

Список литературы:

1. Brushkov A.V., Katayama T., Fukuda M., Moriizumi J., Nakamura T., Asano K., Tanaka M., Beget J., Tomita N. A late quaternary ice wedge from the Fox Permafrost Tunnel in central Alaska is a time capsule for gas and bacteria // SIM News. Magazine of the Society for Industrial Microbiology, 2006. Vol. 56, №1. – P. 10-16.
2. Гнатченко Л.Н., Петухова Г.А., Субботин А.М. Последствия воздействия реликтовых микроорганизмов и их внеклеточных метаболитов на инфузорий (*Paramecium caudatum*). //Материалы международной конференции «Проблемы экологии: чтения памяти проф. М.И. Кожова». – Иркутск, 2010. – С. 399.
3. Brouchkov A.V., Melnikov V.P., Sukhovei Yu.G., et al. Relict microorganisms of criolitozone as possible objects of gerontology //Advances in gerontology, vol.1, №1, P.39-44
4. Голубкова Э. Г. Проведение токсикологических экспериментов с использованием парамеций / Э. Г. Голубкова. – Петрозаводск, 1990. – 16с.
5. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

Сведения об авторах: **Субботин А.М.**, ведущий научный сотрудник Учреждения Российской Академии Наук Тюм НЦ СО РАН, кандидат биологических наук, г. Тюмень, ул. Малыгина, 86

Гнатченко Л.Н., аспирант кафедры экологии и генетики ИМЕНИТ ТюмГУ

Петухова Г.А., профессор кафедры экологии и генетики ИМЕНИТ ТюмГУ, доктор биологических наук, г. Тюмень, ул. Пирогова, 3