

JÓZEF GRABOWSKI

Wydział Fizyki Technicznej, Politechnika Poznańska, Poznań

GRZEGORZ WĘGRZYN

Katedra Biologii Molekularnej, Uniwersytet Gdański, Gdańsk

EWA KOTLARSKA

MAGDALENA KWATERSKA

Instytut Oceanologii PAN, Sopot

Wzrost kultury mikroorganizmów w warunkach inhibicji

Wstęp

Procesy biologiczne, chemiczne i fizyczne opisać można równaniami różniczkowymi. Proces wzrostu kultury mikroorganizmów opisuje tzw. krzywa logistyczna określona równaniem [1]:

$$\frac{dN}{dt} = (b - aN)N \quad (1)$$

gdzie a oraz b są stałymi charakteryzującymi daną kulturę mikroorganizmów.

Równanie (1) jest równaniem różniczkowym, pierwszego rzędu, o zmiennych rozdzielonych. Jego rozwiązanie ma postać:

$$N(t) = \frac{K}{1 + \left(\frac{K}{N_0} - 1\right) \exp(-bt)} \quad (2)$$

gdzie

$N(t)$ – ilość komórek (lub gęstość optyczna) kultury mikroorganizmów po czasie t ,

N_0 – ilość komórek (lub gęstość optyczna) kultury w chwili startu,

$K = b/a$ – parametry charakteryzujące kulturę,
 t – czas [h].

Z równania (2) widać, że wraz ze wzrostem czasu t , N dąży do K oraz dla $t = 0$ mamy $N(0) = N_0$. Wzór (2) przedstawia wzrost kultury mikroorganizmów w bioreaktorze o działaniu okresowym (*batch reactor*) w warunkach normalnych, tzn. bez inhibicji wzrostu.

W warunkach inhibicji parametry K oraz b , będą zależą od rodzaju (gatunku) mikroorganizmów oraz rodzaju inhibitora.

Celem pracy jest zbadanie wzrostu bakterii *Vibrio harveyi* (szczep B392) w warunkach inhibicji – dla różnych dawek inhibitora wzrostu: azydku sodu oraz z domieszką EtOH.

Materialy i metody

Bakterie *Vibrio harveyi* (szczep B392) hodowano w pożywce o składzie: 10 g tryptonu, 3 g ekstraktu drożdżowego, 30 g NaCl, 1 ml glicerolu na 1000 ml wody destylowanej.

Hodowlę nocną odmładzano w świeżej pożywce w stosunku 1:100 i następnie hodowano z wytrząsaniem do OD = 0.1 (dla

długości fali 620 nm). Następnie, po dodaniu odpowiedniej dawki inhibitora, rejestrowano wzrost (w warunkach wytrząsania) kultury bakteryjnej, poprzez pomiar OD, do jej maksymalnego wzrostu (czas rzędu 540 min). Kultura bakteryjna bez inhibitora, stanowiła tzw. kulturę kontrolną.

Wyniki wzrostu były średnimi z wzrostu 3 jednakowych kultur.

Symulowano wzrost kultur programem komputerowym bazującym na zależności (2). Poprzez dobór odpowiednich wartości K oraz b dopasowywano krzywą z symulacji do krzywej eksperymentalnej. Uzyskane $K(I)$ wykorzystywano do wyznaczenia toksyczności, zgodnie z jej definicją (gdy chodzi o biomasę końcową):

$$T(I) = \frac{OD(0) - OD(I)}{OD(0)} \quad (3)$$

Dawka – efekt toksyczny dla pojedynczego inhibitora

Problem dawka – efekt toksyczny inhibitora jest szczególnym przypadkiem problemu toksyczność mieszaniny chemicznych (*Toxicity of Chemical Mixtures*). W pracy [2] pokazano, że ze względu na to, że roztwór z pojedynczym inhibitorem jest, w gruncie rzeczy mieszaniną (stężenie 10 mg/l, to np., mieszanina 8 mg/l i 2 mg/l); ogólna zależność na dawka – efekt toksyczny mieszaniny (z dowolną ilością inhibitorów) upraszcza się do zależności dawka – efekt toksyczny charakteryzującej roztwór z pojedynczym inhibitorem. W niniejszej pracy, w przypadku pojedynczego inhibitora, wykorzystano zależność dawka – efekt toksyczny [2–4]:

$$T = \frac{I^{\kappa} / I_0}{1 + \frac{I^{\kappa}}{I_0}} \quad (4)$$

gdzie T jest toksycznością, a κ oraz I_0 parametrami eksperymentalnymi.

Zależność (4) można przekształcić do postaci:

$$\frac{T}{1 - T} = \frac{I^{\kappa}}{I_0} \quad (5a)$$

z której, po obustronnym zlogarytmowaniu, uzyskuje się:

$$\log \frac{T}{1-T} = \frac{1}{\kappa} \log I - \log I_0 \quad (5b)$$

Ze wzoru (5b) drogą regresji liniowej łatwo wyznaczyć A oraz B , skąd uzyskuje się natychmiastowo: κ oraz I_0 .

Toksyczność addytywną dla mieszaniny dwu inhibitorów można obliczyć z zależności (4):

$$T_{12_add} = \frac{T_1 + T_2 - 2T_1T_2}{1 - T_1T_2} \quad (6)$$

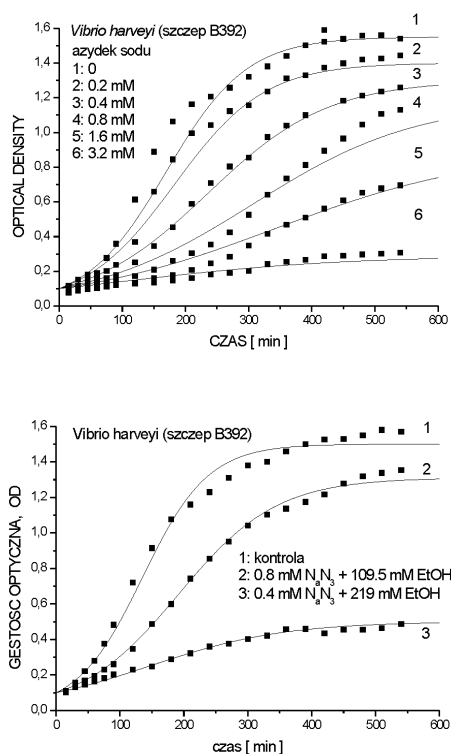
Gdy zmierzona toksyczność mieszaniny jest większa od addytywnej, to mieszanina jest synergistyczna, a gdy jest mniejsza, to jest mieszaniną antagonistyczną.

Wyniki i dyskusja

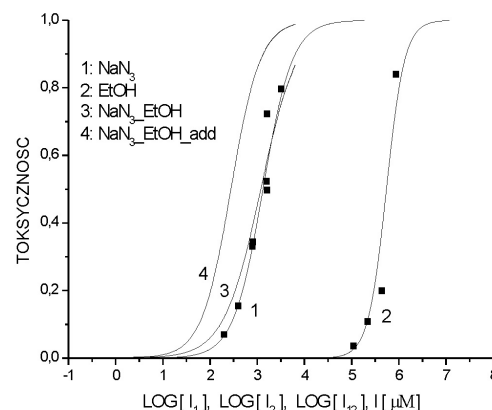
Wyniki zaprezentowano na rys. 1 i 2. Przy sporządzaniu wykresów przedstawionych na rys. 2, wykorzystano zależność (4). Jak widać z rys. 1, wzrost kultury bakteryjnej, w bioreaktorze o działaniu okresowym (batch reaktor), spełnia satysfakcjonująco zależność (2) – w przypadku hodowli mikroorganizmów trudno spodziewać się idealnej zgodności, gdyż każdy wzrost jest praktycznie, nieco różny dlatego, że inokulum nigdy nie jest takie samo.

Przedstawione krzywe ciągle uzyskiwano, drogą symulacji komputerowej, poprzez dobór wartości parametrów K oraz b (patrz zależność (2)) tak, aby rozbieżność pomiędzy symulowaną krzywą wzrostu, a wynikami pomiarowymi (punkty) była minimalna.

Z uzyskanych maksymalnych OD dla danych dawek inhibitora wzrostu (azydki sodu) otrzymano zależności toksyczności od dawek stężenia azydki sodu (Rys. 2).



Rys. 1. Krzywe wzrostu kultur mikroorganizmów *Vibrio harveyi* (szczep B392) w pożywce oraz w warunkach inhibicji (pożywka plus azydek sodu oraz mieszanina azydki sodu z alkoholem etylowym)



Rys. 2. Krzywe dawka – toksyczność dla bakterii *Vibrio harveyi* (szczep B392) dla azydki sodu (1), alkoholu etylowego (2), mieszaniny NaN₃_EtOH (3), a dla porównania zamieszczono krzywą addytywną mieszaniny (4). Procedurę wykreślenia ww. krzywych opisano w pracach [2–4]

W końcu, z zależności (3), było możliwym wykreślenie zależności maksymalnej wartości OD kultury w funkcji stężenia azydki sodu w pożywce.

Tablica 1

Wartości parametrów K oraz b (wg zależności (2), dla których uzyskano krzywe z rys. 1)

Azydek sodu [Mm]	K	b
–	1.55	0.015
0.2	1.45	0.013
0.4	1.35	0.010
0.8	1.10	0.0085
1.6	0.85	0.0065

Z krzywych na rys. 2, wynika, że dla bakterii *Vibrio harveyi* (szczep B392) azydek sodu jest bardziej toksyczny niż alkohol etylowy – krzywa toksyczności jest przesunięta w stronę niższych stężeń. Ponadto krzywa (3) jest przesunięta w stronę wyższych stężeń w stosunku do krzywej addytywnej, co świadczy o antagonizmie tej mieszaniny.

Wyniki pomiarów toksyczności dla pojedynczych inhibitorów i ich mieszanin zebrano w tablicy 2

Tablica 2

Wyniki toksyczności dla pojedynczych inhibitorów i ich dwu mieszanin dla bakterii *Vibrio harveyi* (szczep B392)

Azydek sodu [mM]	EtOH [%]	T_{add}	T_{pom}
0,8	–	–	0,179
1,6	–	–	0,334
–	0,625	–	0,241
–	1,25	–	0,797
0,8	0,625	0,399	0,211
1,6	1,25	0,815	0,491

Wnioski

W pracy zaprezentowano procedurę, pozwalającą na uzyskanie wykresu wzrostu bakterii w funkcji koncentracji inhibitora. Uzyskanie takiej zależności pozwala przewidywać wzrost, czy efekt wyeliminowania bakterii, w warunkach danej koncentracji inhibitora.

Pozwala też różnicować poszczególne inhibitory pod względem efektywności ich potencjalnego zastosowania.

Ponadto w pracy wykorzystano teorię *Grabowskiego* toksyczności mieszaniny toksyn [2–4] do analizy i wykreślenia zależności: *dawka – efekt toksyczny*, dla badanej mieszaniny: azydek sodu – alkohol etylowy. Uzyskane wyniki są dalszą weryfikacją wspomnianej teorii.

Wartość K maleje liniowo w funkcji koncentracji azydku sodu, a wartość b maleje eksponentalnie (Tablica 1).

Z tablicy 2 wynika, że mieszanina azydku sodu i alkoholu etylowego w przypadku bakterii *Vibrio harveyi* B392 jest antagonistyczna, gdyż toksyczność pomiarowa T_{pom} jest mniejsza od toksyczności addytywnej T_{add} .

Dla azydku sodu wartości parametrów krzywej toksyczności otrzymano: $I_0 = 1,478$ mM, $\kappa = 0,717$. Wartość $\kappa < 1$ świadczy, że enzymy komórkowe tworzą uporządkowaną strukturę.

Jeśli przyjąć, że alkohol etylowy nie jest typowym inhibitorem wzrostu, to można podejrzewać, że mamy tu do czynienia z tzw. *potentiation* – które polega na tym, że związek nie będący inhibitorem może wpływać na efekt toksyczności, gdy znajdzie się razem z inhibitorem.

Zgodnie z definicją, efekt toksyczności mieszaniny jest funkcją koncentracji inhibitorów składowych [2]. Stąd pełną informację o charakterze oddziaływania (antagonizm czy synergizm) można uzyskać po zmierzeniu toksyczności miesza-

niny z różnymi stężeniami składowych inhibitorów. Roztwory z inhibitorami lub mieszaninami kilku inhibitorów stanowią podstawę chemoterapii, np. przy zwalczaniu tkanki rakowej. Mieszanina inhibitorów, aby była efektywna i pozbawiona efektów ubocznych, a takim efektem ubocznym jest np. wypadanie włosów u pacjenta poddanego chemoterapii na raka musi być odpowiednio dobrana: odpowiednie inhibitory i ich odpowiednie dawki. Badanie (pomiar) pojedynczych inhibitorów jest niezbędne dla wnioskowania o efekcie mieszaniny [2–4].

Wyniki pracy wskazują na perspektywy stosowania mieszanin inhibitorów do regulacji i modyfikowania szlaków metabolicznych celem ich optymalizacji, co jest istotne dla nauk biologicznych.

LITERATURA

1. *A.J. Lotka*: Elements of Mathematical Biology ; Dover Publications, Inc., New York; 1956.
2. *J. Grabowski*: Toxicity (inhibition) of Chemical Mixtures; Physicochemical Problems of Natural Waters Ecology, 5, 258, Ed. Tadeusz Król, Gdynia (Poland), 2008.
3. *J. Grabowski*: Biological Approach to Mixture Toxicity (Possible Application in Environmental Protection, Pharmacology and Biotechnology); Polish J. of Environ. Stud.; 16, No. 3B, 1, (2006).
4. *J. Grabowski*: Zależność „Dawka – Efekt Toksyczny” Mieszaniny Chemicznej; Ekotoksykologia w Ochronie Środowiska, Praca zbiorowa pod redakcją B. Kołwzan i K. Grabasa, Wyd. Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych, Oddział Śląski, s. 105, 2008.