

**БИОТЕСТИРОВАНИЕ АНТИБИОТИКОВ В МЯСОМОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ**

The article is devoted to the problem of the antibiotics testing in meat and dairy products. It is proposed a simple and sensitive method for antibiotics estimation based on mobility testing of microalgae *Euglena gracilis*.

В условиях возрастающего в последнее время загрязнения окружающей среды проблеме безопасности продуктов питания отводится большое внимание. Одним из биологически опасных видов загрязнения являются антибиотики. К ним относятся биологически активные вещества, вырабатываемые отдельными микроорганизмами для борьбы друг с другом и с другими видами организмов. Особенностью действия данных веществ является проявление биологической активности в малых концентрациях (ПДК 0,01–0,1 мг/кг) и высокая специфичность по отношению к отдельным функциям жизнедеятельности организмов [1]. Антибиотики находят широкое применение в медицине, ветеринарии, растениеводстве и пищевой промышленности для борьбы с инфекционными заболеваниями и сохранности пищевой продукции. Существует два основных источника попадания антибиотиков в продукты животноводства: через загрязненное остаточными количествами молоко и мясо животных, подвергавшихся лечению антибиотиками, а также в результате развития микроорганизмов, продуцирующих данные вещества. Наиболее широкое применение в медицине и животноводстве получили антибиотики пенициллин, тетрациклин, стрептомицин. По наблюдениям лабораторий различных стран, частота встречаемости остаточных количеств антибиотиков в проверяемой продукции животноводства может варьировать от 2 до 25%, а уровни концентраций – от 1 до 100 ПДК. Последствия действия антибиотиков на биотехнологические процессы переработки молока и мяса хорошо известны и наносят значительный экономический ущерб перерабатывающим предприятиям. Не менее важно также влияние остаточных количеств данных препаратов на здоровье человека и животных. Частое потребление продукции, содержащей антибиотики, может вызвать дисбактериоз кишечника в результате подавления полезной молочнокислой микрофлоры и приобретения патогенными микроорганизмами плазмид устойчивости к антибиотикам.

Своевременное обнаружение остаточных количеств антибиотиков в пищевых продуктах является одной из актуальных задач испытательных и сертификационных лабораторий. Существующие методы анализа антибиотиков могут быть разделены на физико-химические и биологические. Низкие ПДК предполагают использование высокочувствительных методов их

анализа. Наибольшей чувствительностью обладают хроматографические, масс-спектрометрические, флуориметрические, микрокалориметрические методы анализа, однако их использование требует дорогостоящего оборудования и высокого уровня квалификации обслуживающего персонала, поэтому находит ограниченное применение. Большей доступностью, низкой стоимостью при высокой чувствительности обладают биологические методы анализа. Наиболее чувствительными и селективными являются методы иммуноферментного биосенсорного анализа [2]. Однако они разработаны еще не для всех видов антибиотиков и промышленно выпускаются лишь за рубежом. Более широкое распространение у нас в стране получили микробиологические методы анализа. Метод диффузии в агар, использующий чувствительные штаммы микроорганизмов против отдельных антибиотиков, отличается простотой и высокой производительностью, однако длительность анализа составляет сутки. Более быстрой является редуктазная проба, с помощью которой остаточные количества антибиотиков в пищевых продуктах определяются в течение 2–5 часов [3]. Вместе с тем, на показания редуктазной пробы может влиять присутствие других микроорганизмов, размножающихся за время наблюдений.

Одним из перспективных методов обнаружения присутствия чужеродных веществ в пищевых продуктах может быть тестирование их влияния на подвижность микроорганизмов. Хемотаксис клеток служит простым и чувствительным методом оценки поведенческих реакций микроорганизмов, связанным с метаболизмом клеток и характеризующим их интегральную биологическую активность [4].

Цель данной работы – исследование влияния антибиотиков на подвижность микроорганизмов для разработки экспресс-метода определения антибиотиков в составе мясомолочной продукции.

В качестве тест-объекта в работе использовали клетки микроводоросли *Euglena gracilis* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Культивирование клеток микроводоросли осуществляли в среде Лозина – Лозинского при температуре 20°C и естественном освещении. Пересев культуры клеток в свежую среду осуществляли через каждые 3 суток для поддержания их в состоянии логарифмического роста. Определение количества клеток микро-

водородосли осуществляли в камере Горяева с помощью микроскопа. Подсчитанное количество клеток находилось в интервале  $10^3$ – $10^4$  кл./мл.

В качестве антибиотиков использовали промышленно выпускаемые препараты: бензилпенициллин натриевую соль, стрептомицин сульфат, тетрациклин дегидрат во флаконах.

Измерение рН растворов выполняли на рН-метре-121. Значение рН для среды Лозино – Лозинского было 7,0, для молочной сыворотки – рН 5,4, для мясной вытяжки – рН 6,2.

Исследования проводились на образцах, искусственно загрязненных антибиотиками в диапазоне концентраций 0,0001–1000 ед./г. Для этого препараты антибиотиков вносили в молочную сыворотку или мясную вытяжку, полученные из проверенных чистых мясомолочных продуктов. Мясную вытяжку готовили следующим образом: к 10 г мясного фарша добавляли 30 мл дистиллированной воды, выдерживали при перемешивании 30 мин и фильтровали через стеклянный фильтр. Молочную сыворотку готовили в соответствии с [5].

Для наблюдения за подвижностью клеток микроводородосли *Euglena gracilis* использовали микроскоп производства БелОМО, объектив-микромметр, капилляры, зажимы, цифровой таймер с точностью отсчета 0,1 с. Для автоматизации измерений на окуляр микроскопа помещали фотонасадку с фотодиодом ФД-256. После усиления с помощью микросхемы К140УД8А сигнал регистрировался на самописце КСП-4.

В анализируемую жидкость (4 мл) добавляли 0,5 мл антибиотика соответствующей концентрации и 0,5 мл микроводородосли *Euglena gracilis*, выдерживали в течение 15 мин, заполняли капилляры и измеряли подвижность клеток с помощью микроскопа при увеличении 20x10. В качестве контроля использовали образцы с добавлением 0,5 мл чистой среды Лозина – Лозинского и 0,5 мл клеток.

Для увеличения точности показаний измерения проводили на 9 клетках микроводородосли. Результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Абсолютное значение скорости ( $v$ ) движения микроводородосли рассчитывали по формуле

$$v = S / t, \quad (1)$$

где  $t$  – время пробега клеток между фиксированными метками, с;  $S$  – путь пробега, мкм.

Среднее значение скорости ( $V$ ) находили из соотношения

$$V = \sum v_i / n, \quad (2)$$

где  $n$  – число наблюдаемых клеток.

Среднеквадратичную ошибку среднего определяли по формуле

$$\text{СКО} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (v_i - V)^2}{n(n-1)}}. \quad (3)$$

Полученные значения СКО не превышали 10%.

Влияние ксенобиотиков на клетки *Euglena gracilis* характеризовали изменением относительного значения скорости

$$B = (V / V_k) \cdot 100(\%), \quad (4)$$

где  $V_k$  – средняя скорость движения клеток в контрольном образце.

Ингибирующий ( $IC_{50}$ ) эффект действия антибиотиков определяли величиной концентраций, которые соответствовали 50%-ному изменению относительной подвижности клеток. Порог обнаружения ( $C_{\min}$ ) характеризовали величиной концентрации антибиотика, вызывавшей изменение относительной подвижности на 20%.

Результаты исследований подвижности микроорганизмов *Euglena gracilis* в питательной среде, молочной сыворотке и мясной вытяжке в присутствии антибиотиков представлены в таблице и на рисунке.

Чувствительность клеток микроводородосли *Euglena gracilis* к антибиотикам в искусственной питательной среде находилась в интервале 0,001–0,1 мг/л. Наиболее сильное действие на подвижность микроорганизмов оказывал бензилпенициллин (см. таблицу).

На рисунке приведен график изменения относительной подвижности клеток микроводородосли в зависимости от логарифма концентрации антибиотика бензилпенициллина. Как видно из рисунка, зависимость носит линейный характер и может быть описана уравнением

$$B = -a \cdot \lg C + b,$$

где  $a$ ,  $b$  – экспериментально найденные константы.

Аналогичные зависимости получены и для других антибиотиков, что позволило рассчитать для них значения  $C_{\min}$  (см. таблицу).

Сравнительный анализ подвижности микроводородосли *Euglena gracilis* в искусственной питательной среде, мясной вытяжке и молочной сыворотке показывает, что клетки сохраняют высокую чувствительность к антибиотикам и в сложных средах. В случае молочной сыворотки она оказалась даже выше, чем в искусственной питательной среде, что, видимо, связано с различием рН среды образцов.

Влияние антибиотиков на подвижность микроводоросли *Euglena gracilis*

Вещество	Концентрация, ед./мл	B, %			C <sub>min</sub> , ед./мл			IC <sub>50</sub> , ед./мл		
		Среда	Сыворотка	Вытяжка	Среда	Сыворотка	Вытяжка	Среда	Сыворотка	Вытяжка
Контроль	–	100	100	100	–	–	–	–	–	–
Бензилпеницилин	1,0	50	50	55						
	0,1	70	60	60						
	0,01	75	70	75	0,001	0,0001	0,001	1,0	1,0	5,0
	0,001	80	75	80						
Стрептомицин	1000	40	30	45						
	100	45	35	50						
	10	50	50	60	0,002	0,001	0,003	10	10	100
	1,0	55	60	60						
	0,1	65	65	65						
Тетрациклин	1000	45	40	50						
	100	50	50	55						
	10	70	60	60	0,10	0,07	0,08	100	100	1000
	1,0	60	65	65						
	0,1	80	70	70						

Чувствительность теста на подвижность превышает показания стандартного редуктазного метода определения антибиотиков в молоке с использованием термофильного стрептококка [3].

Однако процедура анализа антибиотиков предложенным методом значительно проще и быстрее, чем редуктажным методом. Это позволяет использовать данный метод для тестирования мясомолочной продукции.

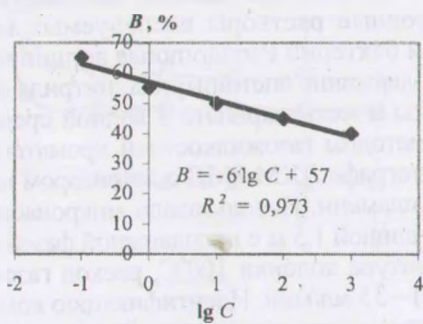


Рисунок. Зависимость относительной подвижности клеток *Euglena gracilis* от логарифма концентрации антибиотика бензилпенициллина в питательной среде Лозина – Лозинского ( $T = 20^\circ\text{C}$ )

В изученной области концентрации антибиотиков клетки микроводоросли сохраняли жизнеспособность, следовательно действие антибиотиков на данные микроорганизмы носит ингибирующий, а не токсичный характер. При смене питательной среды клетки быстро восстанавливали исходную активность.

Для оценки устойчивости микроводоросли *Euglena gracilis* к антибиотикам определяли значение  $IC_{50}$  в искусственной питательной среде, молочной сыворотке и мясной вытяжке (см. таблицу). Увеличение устойчивости клеток микроводоросли к антибиотикам отмечалось в случае мясной вытяжки. Это может быть связано с различием химического состава образцов и защитным действием отдельных химических веществ.

Таким образом, в работе предложен быстрый, простой и чувствительный метод количественного определения антибиотиков в мясомолочной продукции, основанный на измерении подвижности клеток микроводоросли *Euglena gracilis*, позволяющий в течение 15–20 мин обнаружить присутствие антибиотиков в концентрации 0,001 ед./мл с относительной погрешностью 10%.

## Литература

- Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Высш. школа, 1979. – 455 с.
- Knecht B. G. e.c. Automated Microarray System for the Simultaneous Detection of Antibiotics in Milk // Anal. chem. – 2004. – V. 76 – № 1. – P. 646–654.
- ГОСТ 23454-79. Молоко. Методы определения ингибирующих веществ.
- Розанцев Э. Г., Черемных Е. Г. Биотестирование или биологическая оценка безопасности в настоящем и будущем // Экология и промышленность России. – 2003. – Т. 13. – № 3. – С. 44–56.
- Горбатова К. К. Биохимия молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 1997. – 288 с.