

БИОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ НА МИКРООРГАНИЗМЫ

А.В.Игнатенко, Н.В.Гриц

Белорусский государственный технологический университет,
г. Минск

Обеспечение необходимого качества сельскохозяйственного сырья и пищевой продукции в условиях усиливающегося загрязнения окружающей среды ксенобиотиками является одной из важных экологических проблем, стоящих в настоящее время перед пищевой и перерабатывающей промышленностью. Гарантированное обеспечение качества продукции является устойчивой тенденцией развития мирового рынка продуктов питания, условием безопасности здоровья населения, рационального использования сельскохозяйственного сырья.

Анализ частоты обнаружения чужеродных химических веществ в пищевых продуктах, в частности, молоке показывает, что она варьирует от 2 до 40% в зависимости от регионов, при этом концентрации опасных веществ могут изменяться от 1 до 10 ПДК, а в ряде случаев и выше [1,2]. Как известно, стойкие в окружающей среде ксенобиотики имеют тенденцию накапливаться во внешней среде и по пищевым цепям поступать в организм животных и человека, вызывая их заболевания и гибель.

В настоящее время в Европе действует программа по биологическому мониторингу отдельных ксенобиотиков в окружающей среде и продуктах питания. Программа включает как поиск чувствительных биообъектов, так и разработку биотестов для быстрого обнаружения и изучения различных видов ксенобиотиков и их комбинаций.

Цель данной работы - биокалориметрический анализ устойчивости отдельных микроорганизмов к действию ароматических углеводов и оценка возможности использования микрокалориметрии для отбора чувствительных культур клеток для определения ксенобиотиков во внешней среде и пищевых продуктах.

Микроорганизмы рассматриваются как перспективная сфера поиска биомаркеров ввиду их быстрого роста, возможности повышения избирательности клеток к отдельным ксенобиотикам, простоте культивирования и дешевизне применения бактерий в тест-системах.

Получение, преобразование и использование энергии живыми организмами является основной функцией их жизнедеятельности и одновременно одной из первичных и наиболее чувствительных мишеней действия физических и химических факторов окружающей среды на биообъекты. Биоэнергетический анализ воздействия ксенобиотиков на микроорганизмы может быть проведен на основе характеристики теплопродукции клеток. Микрокалориметрия один из универсальных и перспективных методов интегральной оценки жизнедеятельности микроорганизмов. Она применима как в аэробных, так и анаэробных условиях, независимо от физического состояния среды. Это выгодно отличает ее от спектроскопических, электрохимических и других методов, используемых только в простых, прозрачных средах или аэробных условиях. Метод микрокалориметрии полезен для изучения биохимических и физиологических процессов клеток, для оценки действия антибиотиков и ингибирующих веществ на микроорганизмы [3-5].

Материалы и методы

В работе использовали микроорганизмы, часто встречаемые в пищевых продуктах и в составе микрофлоры человека: *L. lactis*, *E. coli*, полученные из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ.

Для выращивания бактерий применяли питательные среды МПБ, МПА, гидролизованное молоко, глюкозо-солевою питательную среду [6] с содержанием глюкозы 10^{-5} М. Концентрацию клеток микроорганизмов в физиологическом растворе

М. Концентрацию клеток микроорганизмов в физиологическом растворе определяли фотометрическим методом по оптической плотности D_{600} и довели до $1 \cdot 10^6$ кл./мл.

В качестве ксенобиотиков применяли ароматические углеводороды: бензол, фенол, толуол, очищенные, как описано в [7]. Для приготовления растворов ароматических углеводородов, плохо растворимых в воде, к 5 мл углеводорода добавляли 5 мл физиологического раствора и встряхивали на качалке в течение 1 часа при комнатной температуре. После этого взвесь центрифугировали при $3000g$ 5 мин для выделения водной фазы, насыщенной углеводородом. Концентрацию ароматических соединений в водной среде определяли спектрофотометрическим методом на длинах волн: 254 нм (бензол), 270 нм (фенол), 261 нм (толуол) [8]. Рабочие концентрации ароматических углеводородов в интервале $10^{-5} M - 10^{-3} M$ готовили из насыщенных водных растворов.

Среды с ксенобиотиками приготавливали путем смешивания питательной среды и водного раствора ксенобиотика изучаемой концентрации в соотношении 4:1.

Исследуемые "суточные" культуры бактерий дважды отмывали после центрифугирования, разводили в физиологическом растворе до $1 \cdot 10^7$ кл./мл и 1 мл вносили к 4 мл среды с тестируемым ксенобиотиком. В качестве контрольных проб использовали образцы, приготовленные аналогичным образом, но без ксенобиотиков. Анализируемые культуры клеток с углеводородами или без них заправляли в рабочую проточную кювету микрокалориметра в объеме 1 мл. В контрольную ячейку вносили 1 мл стерильной питательной среды. Кюветы закрывали пробками, термовыравнивали в течение 15 мин и проводили регистрацию термограмм. Для анализа кинетических зависимостей действия ксенобиотиков на микроорганизмы к $5 \cdot 10^6$ кл./мл добавляли различные концентрации углеводородов, приготовленных в глюкозо-солевой среде и регистрировали изменение теплопродукции клеток в течение 1-2 часов.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения электронной таблицы Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1. приведена термограмма роста клеток *L.lactis*, культивируемых на гидролизованном молоке в отсутствие фенола и при его добавлении в питательную среду. Наблюдалось 2 пика тепловой активности микроорганизма, связанные с ростом численности клеток в процессе их размножения, а также с переключением метаболизма клеток с аэробного типа на анаэробный при расходе кислорода воздуха в калориметрической ячейке. Введение ксенобиотика в питательную среду уменьшало теплопродукцию клеток и сдвигало максимумы их тепловыделения на термограмме. Наблюдаемые изменения указывают на подавление физиологической активности молочнокислого стрептококка, а также уменьшение численности живых клеток в присутствии фенола. Аналогичный характер действия наблюдался и для других изученных ксенобиотиков.

На рис. 2. представлена кинетика изменения относительной мощности тепловыделения клеток *E.coli* в глюкозо-солевой питательной среде в зависимости от концентрации бензола. Изменение теплопродукции клеток зависит как от концентрации ксенобиотика, так и времени его воздействия. Стационарное значение тепловыделения клеток в присутствии бензола устанавливалось в течение 2 часов. В условиях отсутствия размножения микроорганизма на минимальной питательной среде, наблюдаемые изменения тепловыделения клеток обусловлены необратимым нарушением их метаболизма и гибелью.

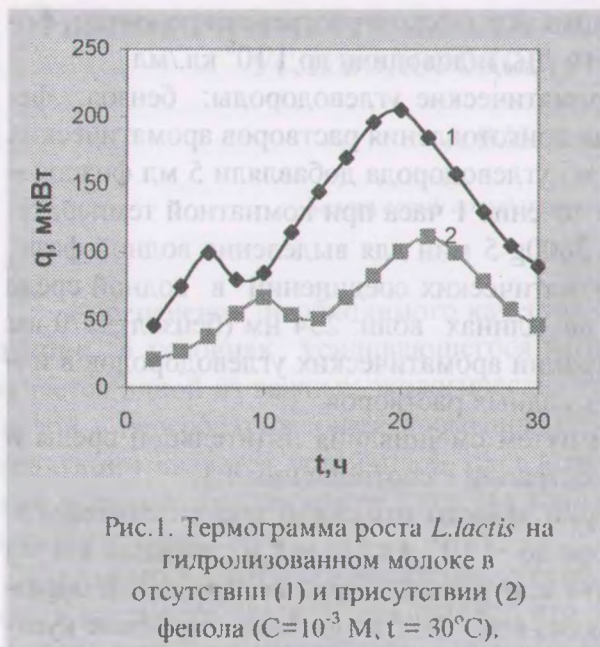


Рис. 1. Термограмма роста *L.lactis* на гидролизованном молоке в отсутствии (1) и присутствии (2) фенола ($C=10^{-3}$ М, $t = 30^{\circ}\text{C}$).

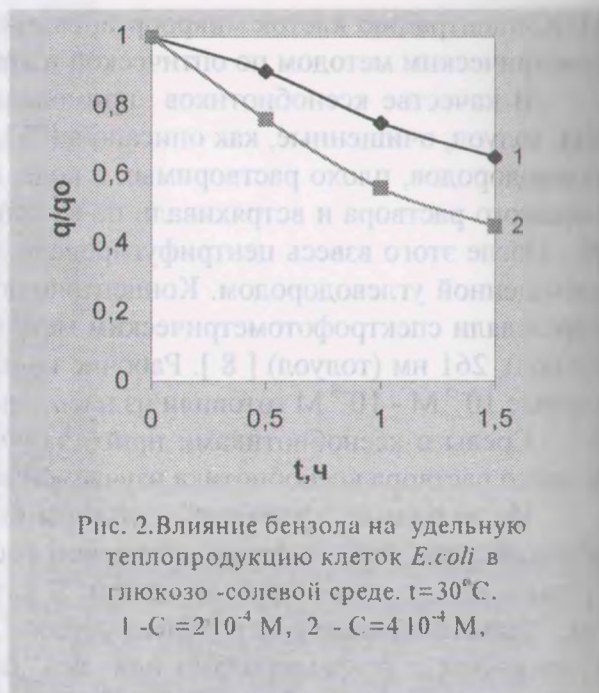


Рис. 2. Влияние бензола на удельную теплопродукцию клеток *E.coli* в глюкозо-солевой среде. $t=30^{\circ}\text{C}$.
1 - $C=2 \cdot 10^{-4}$ М, 2 - $C=4 \cdot 10^{-4}$ М.

Изменение теплопродукции клеток при токсичном действии ксенобиотиков может быть описано зависимостью:

$$q = q_0 \exp(-k C^n t) \quad (1)$$

где k - удельная константа скорости инактивации клеток,
 q, q_0 - удельная теплопродукция клеток в присутствии и отсутствии ксенобиотика,
 C - концентрация ксенобиотика в среде,
 n - стехиометрический коэффициент, характеризующий взаимодействие ксенобиотика с микроорганизмами.

Степень изменения теплопродукции клеток (I) при токсичном действии ксенобиотиков может быть определена выражением:

$$I = (q_0 - q) / q_0 \quad (2)$$

Чувствительность отдельных микроорганизмов к ксенобиотикам можно охарактеризовать значением дозы вещества, уменьшающей степень изменения теплопродукции клеток (I_{50}) на 50% после установления стационарного состояния.

В табл. 1. представлены значения I_{50} , характеризующие влияние изучаемых углеводов на клетки *E. coli* и *L. lactis*. Полученные данные указывают на то, что среди исследуемых бактерий наибольшую чувствительность к ароматическим ксенобиотикам проявляет молочнокислый стрептококк.

В условиях переработки сельскохозяйственного сырья, загрязненного ароматическими углеводородами, это может вызвать нарушение биотехнологических процессов с участием молочнокислых заквасок на основе молочнокислых стрептококков и снизить эффективность производства ферментированных пищевых продуктов. В случае попадания ксенобиотиков в организм человека или животных и воздействии на кишечную микрофлору повышенная чувствительность молочнокислых микроорганизмов к ксенобиотикам может привести к дисбактериозу и желудочно-кишечным заболеваниям.

Характеристика чувствительности (I_{50}) микроорганизмов к отдельным углеводородам

| Наименование микроорганизмов | Наименование углеводородов | | |
|------------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|
| | Фенол, 10^{-3} М | Бензол, 10^{-4} М | Толуол, 10^{-4} М |
| <i>L. lactis</i> | 2,1±0,2 | 3,3 ±0,3 | 3,1±0,4 |
| <i>E. coli</i> | 3,9±0,2 | 4,3±0,4 | 3,5±0,3 |

Проведенная работа показывает, что метод микрокалориметрии может быть полезным инструментом для быстрой оценки чувствительности отдельных микроорганизмов к различным ксенобиотикам и использоваться при отборе наиболее чувствительных штаммов для создания тест-систем для быстрого обнаружения опасных веществ в окружающей среде и пищевых продуктах.

Литература:

1. Мурох В.И., Кирпичная В.К, Меламед Д.Б. Загрязнение пищевых продуктов антибиотиками. -Мн.: БелНИИНТИ, 1991.-38 с.
2. Вышемирский Ф.А., Каранина А.Л. Влияние химизации и интенсификации сельского хозяйства на качество молока и молочных продуктов// Обз.инф.-М.:ЦНИИТЭИ мясомолпрома СССР.-1990, N 11.
3. Ершов Ю.А., Мушкамбаров Н.Н. Кинетика и термодинамика биохимических и физиологических процессов. – М.: Медицина, 1990.-207 с.
4. Анатычук Л.И., Лусте О.Я. Микрокалориметрия.- Львов: Вища школа. Изд-во Львовского ун-та, 1981. –159 с.
5. Игнатенко А.В. Микрокалориметрическое исследование влияния ингибирующих веществ на молочнокислые бактерии // Сб. тр. БГТУ: Химия и технология органических веществ. - Мн., 2000. - вып.8. – с.238 .
6. Белясова Н.А., Гриц Н.В. Микробиология. Учебно-методическое пособие. - Мн.: БГТУ.-1999.-111с.
7. А.Гордон, Р.Форд // Спутник химика. М.: Мир, 1976 -541с.
8. Bohon R.L., Claussen W.F. The solubility of aromatic hydrocarbons in water // j. Am. Chem. Soc., 1951, v. 73, N 4, p.1571.