

Рис. 4. Подбор наиболее технологичного процесса выделения биосурфактантов *Rhodococcus ruber* 1В

Максимальная концентрация сурфактанта *Rhodococcus ruber* 1В, полученная при использовании в качестве экстрагента МТБЭ, составила 9,9 мл/л. В результате подбора наиболее технологичного процесса выделения биосурфактантов *Rhodococcus ruber* 1В, удалось достичь увеличения выхода сурфактанта до 10 мл/л при использовании нативной КЖ (рис. 4).

Исследованные микроорганизмы-продуценты биосурфактантов рекомендуются для разработки технологии получения препаратов биоПАВ производственного назначения.

Литература

1. Desai, J. D. Microbial production of surfactants and their commercial potencial / J. D. Desai, I. M. Banat // Microbiol. Molecular Biol. Rev. – 1997. – Vol. 61. – P. 47–64.
2. Christofi N., Ivshina I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation // J. of Appl. Microbiology. – 2002. – Vol. 93. – P. 915–929.
3. Oleophilic biofertilizer based on a *Rhodococcus* surfactant complex for the bioremediation of crude oil-contaminated soil / I. B. Ivshina [et al.] // Sediment and Water – 2001. – Vol. August. – P. 20–24.

БИОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТОКСИЧНОСТИ ВЕЩЕСТВ

А. В. Игнатенко

*Кафедра биотехнологии и биоэкологии, Белорусский государственный технологический университет, Минск, Беларусь,
e-mail: Leontiev@bstu.unibel.by*

Снижение риска воздействия антимикробных веществ на окружающую среду является одной из важных задач обеспечения нормальной жизнедеятельности живых организмов и безопасности их будущих поколений. Актуальность проблемы контроля качества и безопасности биоцидных веществ обусловлена их широким использованием в медицинской практике для борьбы с патогенными микроорганизмами, а также для защиты техносферы от биоповреждений.

Основное назначение биоцидных препаратов – подавление жизнеспособности вредных микроорганизмов и оказание минимального воздействия на высшие формы живых организмов. Вместе с тем все антимикробные вещества в зависимости от их концентрации и длительности воздействия обладают определенной токсичностью. На практике преимущественно используются препараты 3-го и 4-го класса токсичности: умеренно опасные и малоопасные исходя из их действия на животных. Полная оценка опасности химических веществ на животных возможна только по результатам многолетних наблюдений в реальных условиях применения препаратов, что в большинстве случаев практически неосуществимо. Поэтому опыты на животных по возможности заменяют скрининговыми тестами на более простых живых организмах.

Микроорганизмы являются удобными тест-объектами для скрининговых методов и предварительной проверки веществ на общую токсичность и генотоксичность, поскольку они имеют малые размеры, упрощенное строение, отличаются высокой скоростью размножения.

Для всесторонней характеристики влияния химических веществ на биосистемы, тем более разного уровня сложности, требуется применение различных подходов и батарей тестов. Каждый метод предполагает использование, как правило, отдельных измерительных устройств и методик выполнения измерений. Это значительно усложняет процедуру оценки безопасности веществ и перенос результатов между различными биосистемами, а также значительно увеличивает стоимость анализа.

Биокалориметрия является одним из универсальных подходов для анализа токсичности химических веществ при действии на живые организмы на разных уровнях их организации. Она базируется на фундаментальных принципах биохимического и биофизического единства всех живых организмов, общих принципах их организации и функций. Тепловыделение биообъектов является мерой их жизнеспособности и эффективности функционирования [1].

В отличие от других подходов биокалориметрия – интегральный метод биотестирования, позволяющий охарактеризовать состояния биообъектов в целом, а также изучать воздействие на них как отдельных веществ, так и их комбинаций.

Цель работы – разработать биокалориметрический метод анализа токсичности веществ на клетках микроорганизмов.

В работе использовали бактериальные культуры, хранящиеся в коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии Белорусского государственного технологического университета: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, а также микроорганизмы, выделенные из разрушенного бетона и отнесенные к нитрификаторам 1-го, 2-го рода и тионовым бактериям.

Суточные культуры микроорганизмов получали высевом на скошенный агар чистых коллекционных культур. Посевы инкубировали в термостате при температуре 30 °С в течение суток. Клетки в лог-фазе роста получали разведением суточных культур в свежей питательной среде и культивированием в течение 2–3 ч [2].

В работе применяли современные дезинфицирующе-моющие средства: «Диактин», «Триасан», «Септанес», «Славин», «Стэн», «Инкрасепт-10В», производства ИП «Инкраслав» (РФ/РБ), обладающие вирулицидным, бактерицидным и фунгицидным действием, а также содержащие разные классы антимикробных веществ: четвертичные аммонийные соединения, перекиси, спирты, полигексаметиленгуанидины и их комбинации [3].

Оценку биологической активности антимикробных препаратов проводили с помощью метода диффузии веществ в агар [2], а также методом биокалориметрии.

Концентрацию жизнеспособных микроорганизмов определяли методом посева и культивирования клеток на питательном агаре при температуре 30 °С на протяжении 72 ч, а также методом биокалориметрии [1, 2].

Регистрацию теплопродукции микроорганизмов осуществляли с помощью микрокалориметра МКМ-Ц. Индекс токсичности веществ (ИТ) определяли по подавлению теплопродукции клеток как

$$\text{ИТ} = (\Delta Q / Q_0) 100\%,$$

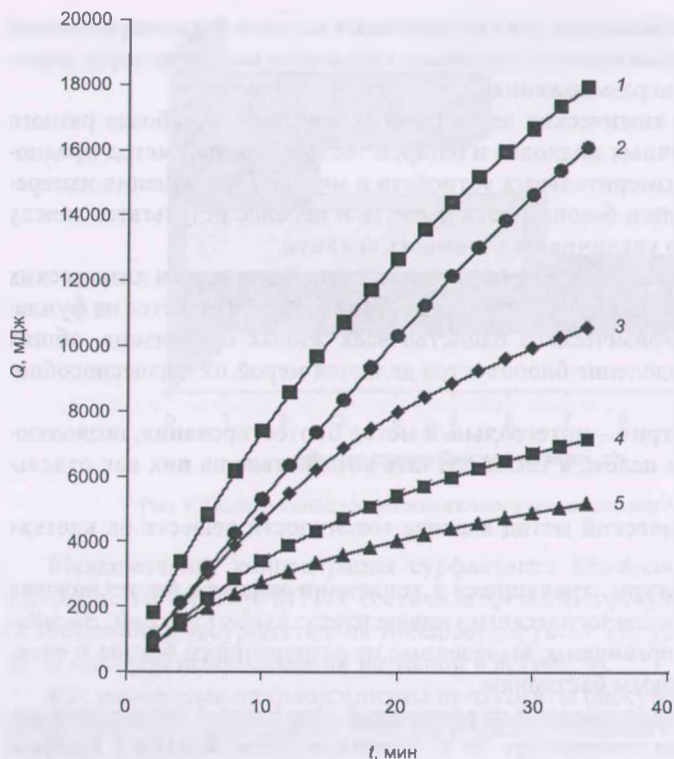
где ΔQ – уменьшение тепловыделения клеток в присутствии биоцидного вещества; Q_0 – тепловыделения микроорганизмов в отсутствие биоцидов. Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

В настоящее время для оценки токсичного действия веществ на микроорганизмы часто используют диско-диффузионные методы анализа [2], длительность которых составляет сутки и более.

В табл. 1 приведены результаты анализа влияния дезинфицирующе-моющих средств: «Диактин», «Инкрасепт-10В», «Септанес», «Триасан», «Стэн», «Славин» на тест-культуры бактерий.

Таблица 1. Характеристика биоцидного действия веществ (C = 0,5%) методом диффузии в агар

Биоцид	Диаметр зон ингибирования роста клеток, см		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Ps. fluorescens</i>
Славин	3,0±0,1	1,8±0,2	2,0±0,3
Триасан	3,0±0,2	3,3±0,2	3,4±0,2
Диактин	3,0±0,2	3,8±0,2	3,0±0,3
Инкрасепт	1,5±0,3	2,8±0,1	1,2±0,1
Септанес	1,6±0,2	4,0±0,3	3,5±0,2
Стэн	2,8±0,2	2,5±0,2	2,5±0,2



Кинетика изменения тепловыделения бактерий *E. coli* (10^7 кл/мл) в присутствии дезинфицирующе-моющих средств ($C = 0,1\%$): 1 – контроль; 2 – «Инкрасепт»; 3 – «Септанес»; 4 – «Триасан»; 5 – «Диактин»

Как известно, вещества, подавляющие развитие микроорганизмов в зоне диаметром 3 см и более, считаются высокотоксичными, а менее 1 см – слаботоксичными. Из табл. 1 видно, что «Триасан», «Диактин», «Стэн» проявляли сильное токсичное действие против всех используемых бактерий, тогда как «Славин», «Инкрасепт», «Септанес» обладали избирательным действием в отношении к отдельным культурам. По степени токсичности биоцидов по данным диффузионного метода их можно расположить в ряд: «Диактин» > «Триасан» > «Септанес» > «Стэн» > «Славин» > «Инкрасепт».

На рис. представлена кинетика изменения общего количества выделенного тепла клетками *E. coli* в присутствии биоцидных веществ. «Инкрасепт» (2) незначительно подавлял тепловыделение клеток *E. coli*, тогда как «Диактин» (5) проявлял сильное бактерицидное действие.

Анализ токсичности изученных биоцидных препаратов, проведенный биокалориметрическим методом для тест-культуры бактерий *E. coli*, показал (табл. 2), что биоциды можно расположить в следующий ряд снижения их токсичного действия: «Диактин» > «Триасан» > «Септанес» > «Стэн» > «Славин» > «Инкрасепт».

Таблица 2. Характеристика токсичности дезинфицирующе-моющих средств для микроорганизмов *E. coli* по данным биокалориметрии

Биоцид	Средняя мощность тепловыделения, мДж/мин	Индекс токсичности для <i>E. coli</i> , %
Контроль	696,4±9,2	–
Септанес	452,7±8,5	44,5±1,4
Диактин	243,5±9,1	75,2±3,8
Триасан	322,3±8,3	61,1±2,4
Инкрасепт	529,4±10,3	34,0±1,1

Полученные результаты хорошо согласуются с методом диффузии веществ в агар. Длительность анализа токсичности веществ биокалориметрическим методом составляет 20 мин, что на два порядка меньше, чем для диффузионного метода. Биокалориметрический метод может быть рекомендован в качестве скринингового для экспресс-оценки биологической активности и безопасности веществ.

Литература

- Игнатенко, А. В. Микробиологические, органолептические и визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия: лаб. практик. / А. В. Игнатенко, Н. В. Гриц – Минск: БГТУ, 2003. – 114 с.
- Белясова, Н. А. Микробиология: Лаб. практик. / Н. А. Белясова – Минск: БГТУ, 2007. – 160 с.
- Инструкции по применению дезинфицирующе-моющих средств «Септанес», «Инкрасепт», «Триасан», «Диактин» для целей дезинфекции и предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения и дезинфекции поверхностей. – Минск: Стандарты, 2000. – 24 с.