

этого консерванта в пюре. В результате испытаний в лабораторных и производственных условиях установлена эффективная доза сорбиновой кислоты, предупреждающая развитие возбудителей порчи – 0,08 – 0,1%.

Микробиологическая оценка качества сублимированных продуктов (плодов, пюре, соков) показала, что уровень их обсеменённости по МАФАМ не превышал 5×10^2 КОЕ в 1 г. продукта, но плесневые грибы составляли значительную величину – до 5×10^4 . В связи с этим проект стандарта дополнили показателем “плесневые грибы”. Изменён также норматив по БГКП, их присутствие не допускается в 0,01 г.

Все предложенные по исследованным продуктам нормативы микробиологических показателей согласованы с органами здравоохранения Республики Молдова. Результаты выполненных исследований представляют практический интерес, так как стали основанием для внесения в стандарты нормативов, ориентированных на их соблюдение на предприятиях с нормальным санитарным и технологическим уровнями производства.

Литература:

1. Куликовский А. В. *Итоги разработки микробиологических критериев в рамках программы ФАО/ВОЗ по пищевой стандартизации (Комиссия “Кодекс Алиментариус”) “Вопросы питания”, 1983, № 5.*
2. Синел Г. Дж. *Микробиологические нормы для пищевых продуктов с точки зрения санитарии и гигиены. “Fleischwirtschaft”, 1985, 65, № 6*
3. *Microbiological Specifications for Foods Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Rome, 1985*

* * *

БИОСОРБЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК-ДЕСТРУКТОРОВ КСЕНОБИОТИКОВ

А.В.Игнатенко, Н.В.Гриц

Белорусский государственный технологический университет, г.Минск

Своевременное обнаружение и надежный контроль за содержанием ксенобиотиков во внешней среде, а также разработка технологий утилизации вредных отходов производства являются одними из основных путей предотвращения попадания опасных веществ в пищевые продукты.

Среди различных способов обнаружения ксенобиотиков перспективны бактериальные тесты, позволяющие быстро получить интегральную оценку степени опасности анализируемой среды для биологических объектов [1]. При разработке методов биологического тестирования ксенобиотиков как правило стараются отобрать наиболее чувствительные виды микроорганизмов и их штаммов для снижения порога обнаружения токсичных веществ. Однако, ксенобиотики редко присутствуют в чистом виде и, как правило, находятся в составе смеси различных компонентов, затрудняющих проведение анализов. Одним из таких мешающих факторов являются токсичные тяжелые металлы, присутствие которых в продуктах питания вредно для здоровья населения [2]. Загрязнение сточных вод высокими концентрациями тяжелых металлов нарушает технологические процессы их очистки активным илом, а также приводит к невозможности определения в

сточных водах общего содержания органических веществ методом измерения биохимического потребления кислорода (БПК) [3].

Использование в составе тест-систем на ксенобиотики микроорганизмов, устойчивых к присутствию тяжелых металлов позволит устранить влияние данных веществ на показания БПК и правильно определить степень загрязненности среды ксенобиотиками.

Целью настоящей работы было изучение сорбционных свойств и физиологической активности бактерий-деструкторов ароматических углеводов, обладающих повышенной жизнеспособностью в присутствии ионов тяжелых металлов.

Материалы и методы

Для выделения культуры микроорганизмов, устойчивых к отдельным тяжелым металлам, использовали локальные сточные воды предприятия ОАО «Мотовело», содержащие повышенные концентрации хрома и никеля. На первой стадии методом многократного пересева в среду для получения бактерий-деструкторов ксенобиотиков (ЭКБ-среда [4]), модифицированную добавками $5 \cdot 10^{-3}$ М Ni^{2+} , Cr^{6+} и $2 \cdot 10^{-3}$ М фенола, была выделена элективная культура бактерий, сохраняющих ростовую активность и способность деградировать ароматический углеводород в присутствии тяжелых металлов. На второй стадии выделения, используя метод многократного пересева разведений в среду МПА, получена чистая культура бактерий, которая по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам идентифицирована как *Pseudomonas putida*. Выращенная чистая культура микроорганизмов, трижды отмытая физиологическим раствором, использовалась для изучения ее сорбционных свойств.

Для изучения кинетики связывания тяжелых металлов клетками микроорганизма готовили растворы солей Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{6+} в концентрациях: $5 \cdot 10^{-5}$ М, $1 \cdot 10^{-4}$ М, $5 \cdot 10^{-4}$ М.

К 10 мл чистой культуры бактерии в физиологическом растворе, содержащем $1 \cdot 10^7$ кл./мл, вносили 10 мл раствора соли анализируемого тяжелого металла, выдерживали при периодическом встряхивании при $t=20^\circ\text{C}$ и через интервалы времени 0,5 ч, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 4 ч, 8 ч, 24 ч отбирали по 2 мл раствора, центрифугировали при 8000g в течение 10 мин. и определяли содержание тяжелых металлов в надосадочной жидкости.

Концентрацию анализируемых металлов в водной среде определяли фотометрическими методами: Fe^{2+} - по реакции с сульфосалициловой кислотой, Zn^{2+} - с помощью сульфарсазена, содержание Cr^{6+} - по реакции с дифенилкарбазидом, Ni^{2+} - с помощью диметилглиоксима / 5-7 /.

Теплопродукцию клеток микроорганизма изучали с помощью микрокалориметра МКМ-Ц. В рабочую кювету прибора вводили 1 мл образца, содержащего 0,5 мл отмытой культуры клеток *Pseudomonas putida* с концентрацией $1 \cdot 10^7$ кл./мл и 0,5 мл ЭКБ - среды с 10^{-5} М фенола и тяжелым металлом в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М. В контрольную кювету вносили рабочий образец, прогретый при $t=95^\circ\text{C}$ в течение 10 мин. и охлажденный до 30°C . После 10 минутного термостатирования в микрокалориметре проводили запись термограмм анализируемой культуры.

Результаты и их обсуждение

На рис.1 представлена кинетика связывания ионов тяжелых металлов Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{6+} клетками *Pseudomonas putida* в физиологическом растворе. Процесс сорбции тяжелых металлов микроорганизмами выходил на стационарную стадию в течение 2 часов и в последствии не изменялся в течение суток. Такой характер поведения указывает на одностадийный механизм связывания ионов тяжелых металлов поверхностью клеток. Как следует из рис.1. кинетика связывания тяжелых металлов клетками в физиологическом растворе хорошо описывается уравнением изотермы сорбции Ленгмюра:

$$A = A_{\text{макс}} \cdot KC / (KC + 1), \text{ где} \quad (1)$$

K – константа сорбции тяжелых металлов клетками;

$A_{\text{макс}}$ - максимальная удельная концентрация связывания ионов тяжелых металлов в расчете на клетку;

A - удельная концентрация связывания ионов тяжелых металлов в расчете на клетку, определяемая по формуле:

$$A = (C_0 - C)/N_0 \tag{2}$$

N_0 - концентрация клеток бактерий в растворе;

C_0 - начальная концентрация ионов тяжелых металлов в растворе;

C - равновесная концентрация ионов тяжелых металлов в растворе.

Для нахождения параметров сорбции тяжелых металлов клетками выражение (1) приводили к виду (3):

$$1/A = 1/(A_{\text{макс}} \cdot K \cdot C) + 1/A_{\text{макс}} \tag{3}$$

и определяли искомые параметры методом наименьших квадратов с использованием программного обеспечения Microsoft Excel. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1

Параметры сорбции ионов тяжелых металлов Fe^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{6+} клетками *Pseudomonas putida* в физиологическом растворе, $t=20^\circ\text{C}$, $\text{pH } 6,7$.

Параметры сорбции	Ионы тяжелых металлов			
	Fe^{2+}	Zn^{2+}	Ni^{2+}	Cr^{6+}
$K, (\text{мг/л})^{-1}$	0,2160,02	0,02060,005	0,6660,07	0,8960,09
$A_{\text{макс.}} (\text{мг/кл.})$	$(2,360,2) \cdot 10^{-11}$	$(561) \cdot 10^{-12}$	$(1,960,3) \cdot 10^{-10}$	$(1,360,3) \cdot 10^{-10}$

По величине константы сорбции тяжелых металлов можно судить о характере и силе их связывания с клетками. Наибольшие значения указанной константы отмечены для никеля и хрома, что указывает на более прочное связывание данных металлов с клетками бактерии по сравнению с железом и цинком.

Величина $A_{\text{макс}}$ характеризует максимальную сорбционную способность микроорганизма по отношению к отдельным металлам и указывает на наличие специфических центров связывания на поверхности клеток. Наибольшая сорбционная емкость клеток *Pseudomonas putida* отмечена в случае связывания никеля и хрома, для которых $A_{\text{макс}}$ на 1-2 порядка выше, чем для железа и цинка. Это может быть связано с тем, что данная культура микроорганизма была адаптирована к хромово-никелевым стокам, не- содержащим высоких концентраций железа и цинка.

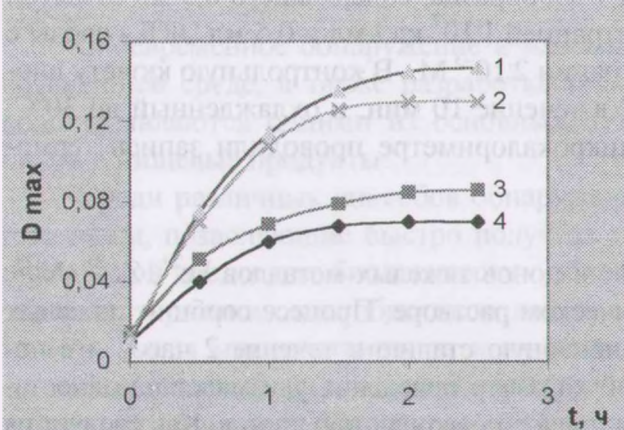


Рис.1 Кинетика сорбции ионов тяжелых металлов ($1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$) клетками *Pseudomonas putida* ($N_0=1 \cdot 10^7 \text{ кл./мл}$).
1- Cr^{6+} , 2- Ni^{2+} , 3- Fe^{2+} , 4- Zn^{2+}

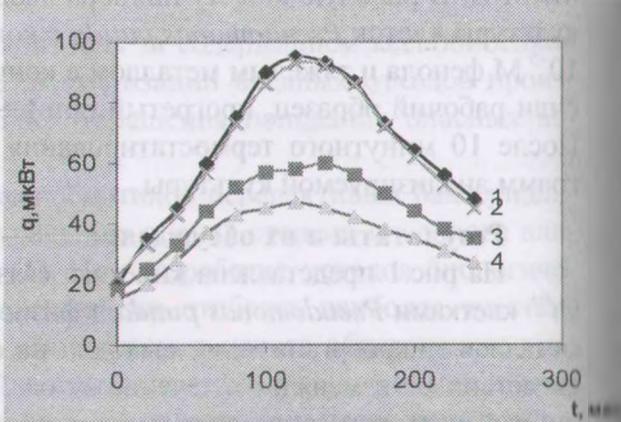


Рис.2. Термограммы культивирования клеток *Pseudomonas putida* в ЭКБ-среде с $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ фенола в присутствии ионов тяжелых металлов ($1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$).
1 - контроль,
2- Cr^{6+} , 3- Fe^{2+} , 4- Zn^{2+} , $t = 30^\circ\text{C}$.

Для оценки жизнеспособности клеток *Pseudomonas putida*, подвергнутых воздействию тяжелых металлов, проверена их способность к образованию колоний на питательном агаре. Количество колониеобразующих единиц не изменялось после 2-х часового выдерживания клеток в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ М ионов никеля и хрома и снижалось на 30% и 46% для железа и цинка по сравнению с питательной средой не содержащей указанных металлов.

Изучение влияния ионов тяжелых металлов на тепловыделение клеток *Pseudomonas putida* в ЭКБ-среде с фенолом показало (рис. 2), что в присутствии $1 \cdot 10^{-3}$ М железа и цинка теплопродукция клеток уменьшалась на 32% и 47% соответственно и незначительно изменялась в случае хрома и никеля. Наличие корреляции между методом посева на чашках и тепловыделением клеток позволяет с помощью метода микрокалориметрии быстро оценивать жизнеспособность клеток-деструкторов ксенобиотиков в условиях дополнительного загрязнения среды тяжелыми металлами.

Таким образом, проведенное исследование показало, что культура клеток, адаптированная к высоким концентрациям тяжелых металлов, обладает к ним повышенной селективностью и высокой сорбционной емкостью. Это защищает клетки от токсичного действия тяжелых металлов. Использование метода микрокалориметрии позволяет быстро оценивать жизнеспособность клеток-деструкторов ксенобиотиков в присутствии повышенных концентраций ионов тяжелых металлов.

Литература:

1. Фомченков В.М. и др. Прикладная биохимия и микробиология, 2000, т. 36, № 6, с. 656-60.
2. Трахтенберг И.М., Колесников В.С., Луковенко В.П. Тяжелые металлы во внешней среде: современные гигиенические и токсические аспекты- Мн.: Навука и тэхніка, 1994.- 285с.
3. Голубовская Э.К. Биологические основы очистки воды.- М.: Высшая школа, 1978.
4. Белясова Н.А., Гриц Н.В. Микробиология. Учебно-методическое пособие. - Мн.: БГТУ.-1999.-111с.
5. Сборник методик выполнения измерений, допущенных к применению в деятельности лабораторий экологического контроля предприятий и организаций Республики Беларусь. - Мн.: Экология, 1998.-290 с.
6. Унифицированные методы анализа вод/ П. ред. Лурье Ю.Ю.-М.: Химия, 1979.- 376 с.
7. Липецкий А.В., Куш В.Н. / Методы определения тяжелых металлов в загрязненных природных и разбавленных сточных водах. - М.: Колос, 1987.- 68 с.