

УДК 504.5:661.16

А. В. Игнатенко, доцент (БГТУ)

ПОДХОДЫ И МЕТОДЫ ОЦЕНКИ БЕЗОПАСНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Рассмотрены некоторые подходы и методы контроля окружающей среды и оценки биогенной безопасности химических веществ. С целью разработки скринингового метода контроля токсичности веществ предложен биолуминесцентный метод оценки действия биоцидов на клетки микроорганизмов. Наличие сильной корреляционной связи между результатами тестирования биоцидной активности веществ методом биолуминесценции и диффузии в агар позволяет рекомендовать применение биолуминесцентного метода для экспресс-оценки безопасности веществ для окружающей среды.

Some approaches for environmental control and methods of biogenic safety estimation of chemicals were discussed. With the aim of development of screening methods for toxicity testing of biocides it was proposed to use a bioluminescent method for estimation of biocides action to the cells of microorganisms. A strong correlation between results of biocides activity testing by bioluminescence and diffusion chemicals in agar makes it possible to recommend application of bioluminescent method for express estimation of biocides safety for environment.

Введение. Безопасность окружающей среды является основной потребностью существования человека и сохранения его здоровья. Как известно, опасность различных факторов определяется риском их воздействия на окружающую среду и степенью влияния на жизнедеятельность настоящего и будущего поколений живых организмов.

Все факторы окружающей среды могут быть разделены на четыре основные группы: абиотические (неживая природа); биотические (биосфера); антропогенные (человек, общество,

относящиеся к социосфере); техносферные (включающие продукты информационно-технической деятельности человека). Это позволяет выделить следующие виды безопасности среды: абиогенную (физико-химическая, сейсмическая, природно-климатическая); биогенную (экологическая, биологическая, микробиологическая, генно-инженерная), техногенную, а также отдельные виды антропогенной (социальной) безопасности, связанные с общественной деятельностью человека (рис. 1).



Рис. 1. Классификация видов безопасности среды

Существует ряд подходов для оценки безопасности окружающей среды: экологический, биологический, молекулярно-генетический, физико-химический, техногенный.

Экологический подход рассматривает влияние факторов среды на сообщества особей, популяций, видов. Он выделяет три группы биообъектов (продуценты, консументы и редуценты), взаимосвязанные между собой закономерностями пищевых цепей.

Биологический подход рассматривает воздействие факторов на живые организмы, как на объекты на разных уровнях сложности их организации и с точки зрения влияния на их эволюцию. В данном подходе выделяются такие формы биосистем, как: неклеточные, доклеточные, клеточные и многоклеточные. Они характеризуются на разных уровнях организации биосистем: молекулярно-генетическом, субклеточном, клеточном, тканевом, органном, системно-органном, организменном, популяционно-видовом. Уровни выше популяционно-видового также относятся к биологическому анализу, но более детально рассматриваются в экологическом подходе.

Молекулярно-генетический подход характеризует влияние факторов среды на развертывание и функционирование генетических программ живых организмов, а также характеризует степень опасности различных веществ для будущих поколений.

Физико-химический подход устанавливает взаимосвязь между структурой, свойствами веществ и их биогенной опасностью. Ни один из физических или химических методов не позволяет дать надежную оценку степени опасности отдельных веществ или многокомпонентной среды. Это могут сделать только сами биологические объекты, которые являются интегральными сенсорами качества и безопасности среды.

Можно выделить также техногенный подход, который устанавливает степень воздействия факторов среды на техносферу, а также влияние самой техносферы на окружающую среду и человека.

Все рассмотренные подходы взаимосвязаны и отражают разные стороны проблемы безопасности среды.

Одной из актуальных экологических задач является разработка экспресс-методов контроля биогенной безопасности химических веществ для окружающей среды. Уже известно более 60 млн. наименований ксенобиотиков, созданных человеком, и ежегодно появляется десятки тысяч новых химических соединений, большая часть из которых представляет опасность для человека и окружающей среды.

Агентство по охране окружающей среды (EPA, США) выделило список наиболее опасных загрязнителей, насчитывающий около 1000 наименований, подлежащих первоочередному контролю. Однако на практике контролируется порядка 40–50 веществ, поскольку разработка эффективных методов оценки безопасности веществ и методов контроля за их содержанием в окружающей среде значительно отстает от темпов синтеза новых соединений.

В настоящее время нет универсальных, быстрых, простых и дешевых методов контроля безопасности, которые можно использовать для всех веществ. Существующие схемы оценки безопасности на животных многоэтапны, длительны, трудоемки и не позволяют проконтролировать все соединения. Это вызывает необходимость применения многоуровневого подхода и батарей различных тестов на разных биологических объектах.

Для повышения эффективности анализа безопасности веществ и окружающей среды используют скрининговые экспресс-методы. Они позволяют на предварительном этапе обнаружить потенциальную опасность среды и отобрать подозрительные объекты для последующего их более глубокого анализа по развернутой программе.

Одной из многочисленных групп химических соединений, широко используемых на практике, являются биоциды. К ним относят антимикробные препараты, которые должны вызывать гибель патогенных и технически вредных микроорганизмов, но быть безопасны для человека и окружающей среды [1].

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

Основная часть. Цель работы – поиск скринингового экспресс-метода оценки безопасности биоцидных препаратов и продуктов их превращений.

В качестве объектов исследования токсичности веществ служили бактериальные культуры, хранящиеся в коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*. В работе использовали также микроорганизмы-деструкторы, выделенные из разрушенного бетона и отнесенные к нитрификаторам 1-го, 2-го рода и тионовым бактериям.

Суточные культуры микроорганизмов получали высевом на скошенный питательный агар коллекционных культур [2]. Посев инкубировали сутки в термостате при температуре 30°C. Суспензии клеток в log-фазе роста получали внесением в пробирки с суточной культурой на скошенном агаре по 2–4 мл стерильного питательного бульона. Смывы помещали в термостат на 3 ч, после чего использовали для дальнейшего анализа. Концентрацию жизнеспособных микроорганизмов определяли методом культивирования клеток в питательном агаре при 30°C в течение 72 ч.

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

Ультрафиолетовую обработку антимикробных препаратов ($V = 10 \text{ см}^3$, $C = 0,01\text{--}1,0\%$) проводили в открытых чашках Петри под УФ лампой мощностью 100 Вт в течение 0–10 мин.

Оценку биологической активности антимикробных веществ и продуктов их фотопревращений осуществляли с помощью метода диффузии веществ в агар [2], а также методом биолюминесценции.

Биолюминесцентные измерения проводили на люминометре «SystemSure II» с использованием одноразовых устройств «Ultrasnap™ АТР» (Великобритания). Работа прибора основана на измерении количества аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), присутствующей во всех живых клетках. При введении в тестируемую среду реагентов, включающих люциферин-люциферазный комплекс, в присутствии АТФ возникает биолюминесцентное свечение, регистрируемое люминометром с высокой чувствительностью (10^{-15} М АТФ).

В пробирку вносили по 0,9 мл суспензии тест-культур микроорганизмов и 0,1 мл биоцидов. Образцы инкубировали в течение 10 мин в термостате при 30°C и измеряли интенсивность биолюминесценции, как указано в [4].

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

В начале работы изучили влияние биоцидных веществ на технически вредную микрофлору – нитрификаторы 1-го, 2-го рода и тионовые

бактерии методом диффузии веществ в агар. О токсичности веществ судили по диаметру зон подавления роста микроорганизмов. Чем больше диаметр зоны, тем выше токсичность веществ при их одинаковых концентрациях (рис. 2).

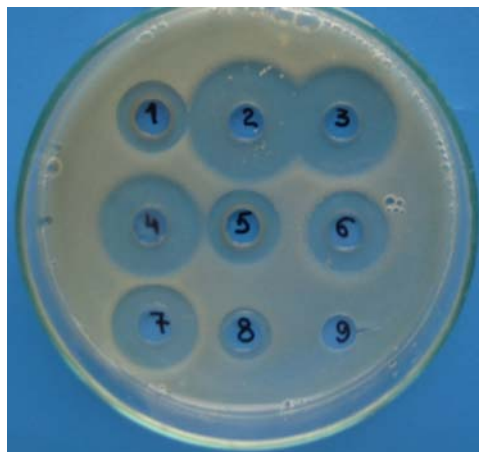


Рис. 2. Диаметры зон подавления роста бактерий нитрификаторов 1-го рода в методе диффузии веществ ($C = 0,1\%$) в агар:

1 – «Славин»; 2 – «Диактин»; 3 – «Септанес»; 4 – «Триасан»; 5 – «Инкрасепт-10В»; 6 – «Стэн»; 7 – «Хлоргексидин»; 8 – «Септомирин»; 9 – контроль

Из рис. 2 следует, что наиболее токсичным биоцидом по отношению к коррозионно-активным бактериям-деструкторам бетонов является препарат «Диактин», а наименьшей активностью обладал препарат «Септомирин».

Биоциды, применяемые для обработки поверхностей на открытом воздухе, могут подвергаться действию ультрафиолетового излучения Солнца. Для проверки фотоустойчивости биоцидов, а также выяснения возможности образования более токсичных продуктов, растворы биоцидов подвергали облучению ультрафиолетовой лампы и изучали активность продуктов их фотопревращений методом диффузии веществ в агар на трех тест-культурах микроорганизмов.

В табл. 1, 2 приведены результаты влияния изученных препаратов и продуктов их фотопревращений на бактерии *E. coli*, *B. subtilis*, *Ps. fluorescens*.

Из табл. 1 видно, что «Триасан», «Диактин», «Стэн» проявляли универсальное токсичное действие против всех используемых тест-культур бактерий, тогда как «Славин», «Инкрасепт», «Септанес» обладали избирательным действием к отдельным культурам. Как известно, вещества, подавляющие развитие микроорганизмов в зоне 3,0 см и более, считаются высокотоксичными, а менее 1–2 см – слаботоксичными.

Таблица 1

Анализ токсичности биоцидных препаратов (C = 0,5%) методом диффузии веществ в агар

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

Таблица 2

Анализ токсичности продуктов УФ-облучения биоцидных препаратов (C = 0,5%) методом диффузии веществ в агар

Биоциды после УФ-обработки	Диаметр зон ингибирования роста клеток, см		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>Ps. fluorescens</i>
1. Славин	2,5 ± 0,3	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1
2. Триасан	1,8 ± 0,1	2,0 ± 0,2	2,0 ± 0,2
3. Диактин	3,3 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,2 ± 0,3
4. Инкрасепт	1,9 ± 0,2	2,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2
5. Септанес	1,5 ± 0,1	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,3
6. Стэн	2,2 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,3 ± 0,2

По степени токсичности биоцидных препаратов для тест-культур микроорганизмов по данным диффузионного метода их можно расположить в ряд:

«Диактин» ≈ «Триасан» > «Септанес» > «Стэн» > «Славин» > «Инкрасепт».

Из табл. 2 следует, что биоцидные препараты «Диактин», «Инкрасепт» проявляли повышенную устойчивость к УФ-обработке, тогда как препараты «Триасан» и «Славин» быстро теряли свою активность в процессе облучения по отношению ко всем тест-культурам.

Степень токсичности УФ-облученных биоцидов для тест-культур бактерий по данным диффузионного метода уменьшалась в ряду:

«Диактин» > «Инкрасепт» > «Стэн» > «Септанес» > «Триасан» > «Славин».

Анализ токсичного действия изученных биоцидных препаратов на культуру бактерий *E. coli* биолюминесцентным методом показал (рис. 3), что биоциды можно расположить в ряд снижения их токсичного действия:

«Диактин» > «Триасан» > «Септанес» > «Стэн» > «Славин» > «Инкрасепт».

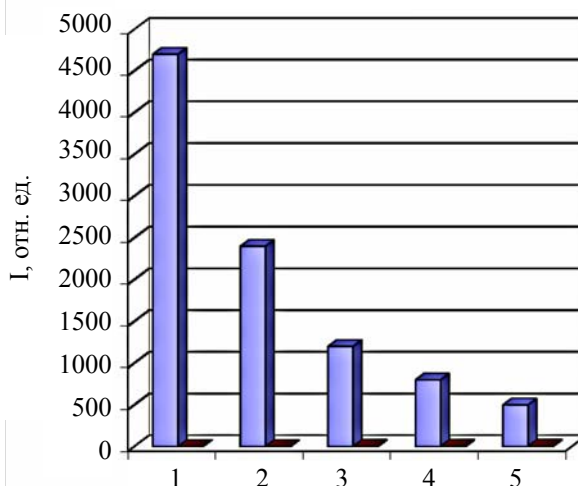


Рис. 3. Биолюминесцентная оценка эффективности подавления клеток *E. coli* ($N = 10^7$ кл/см³) биоцидными веществами:

1 – контроль; 2 – «Инкрасепт»; 3 – «Септанес»; 4 – «Триасан»; 5 – «Диактин» (C = 0,1%)

Заключение. Полученные результаты хорошо согласуются с диффузионным методом. Длительность анализа токсичности веществ биолюминесцентным методом на тест-культурах микроорганизмов – 2 мин, что на три порядка меньше, чем для диффузионного метода. Биолюминесцентный метод может быть рекомендован в качестве скринингового для экспресс-оценки биологической активности и безопасности веществ для окружающей среды.

Литература

- Игнатенко, А. В. Анализ влияния биоцидных веществ на поверхностную микрофлору / А. В. Игнатенко // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия, технология орган. в-в и биотехнология. – 2009. – Вып. XVII. – С. 162–165.
- Белясова, Н. А. Микробиология. Лабораторный практикум / 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.
- Инструкция по применению лабораторной системы «System SURE II». – Великобритания: Huyeina LLC. – 2004. – 59 с.

Поступила 26.03.2010