

5. Samoju O., Fonio A., Vince O. // Acta Phisiol. 1962. V. 21. P. 295–300.
6. Боярчик В.А., Лутов А.Г. // Гигиена труда. 1966. № 3. С.55–56.
7. Oda H., Tsubone H., Suzuki A. // Environm. Res. 1981. V.25, № 2. P.294–301.
8. Omura T., Sato R. // J. Biol. Chem. 1964. V. 239. P. 2370–2377.
9. Vasukochi I., Masters B.S. // J.Biol. Chem. 1976. V. 251. P. 5337–5344.
10. Habig W.E., Fabat E.I., Jacoby W.B. // J. Biol. Chem. 1974. V. 240. P. 7130–7139.
11. Костюк В.А., Потапович А.И., Лунец Е.Ф. // Вопр. мед. химии. 1984. Т. 30, № 4. С. 125–127.
12. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. // Современные методы в биохимии. М.: Медицина, 1977. С. 66–68.
13. Lowry O.H., Rosenbrought N.I., Farrg A.L., Randall R.L. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193, № 1. P. 266–275.
14. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Мн.: Вышэйшая школа, 1973. 319 с.
15. Поберезкина Н.Б., Задорина О.В., Андрущенко П.И., Хмелевский Ю.В. // Укр. биохим. журн. 1992. Т. 64, № 6. С. 64–70.

БИОКАЛОРИМЕТРИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ КСЕНОБИОТИКОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОТОПЛАСТОВ И КЛЕТОК БАКТЕРИЙ

А. В. Игнатенко, Н. А. Белясова, Н. В. Гриц

*Белорусский государственный технологический университет,
г. Минск, Беларусь*

В настоящее время проблема своевременного обнаружения ксенобиотиков в окружающей среде и продуктах питания, оказывающих общетоксическое, мутагенное или канцерогенное действие, становится одной из наиболее актуальных.

Для регулирования поступления отходов хозяйственной деятельности человека в окружающую среду необходимы надежные и чувствительные методы контроля содержания опасных веществ в различных средах. Наиболее перспективным для этих целей может быть использование методов биотестирования [1]. Широкое распространение при биотестировании ксенобиотиков получают клеточные культуры микроорганизмов. Простота, хорошая изученность генетического аппарата и метаболизма многих микроорганизмов, высокая скорость их размножения и чувствительность, а также экономичность позволяют использовать их как для обнаружения ксенобиотиков, так и для изучения механизмов их действия.

Основными проблемами биотестирования являются выбор наиболее чувствительных микроорганизмов, поиск маркерных функций и экспресс-методов регистрации влияния ксенобиотиков на биологические объекты и изучение механизмов их действия.

При разработке новых методов экологического мониторинга особое внимание уделяется поиску наиболее чувствительных и удобных для использования биообъектов. Одно из перспективных направлений клеточного биотестирования может быть связано с применением в качестве тест-объектов протопластов клеток. Их можно использовать как для непосредственного обнаружения ксенобиотиков, так и для конструирования штаммов микроорганизмов с аналитически ценными свойствами. В настоящее время протопласты в основном применяются в биотехнологии как модели генетических исследований у бактерий, дрожжей, растительных клеток и для получения производственных штаммов и модифицированных культур растений [2, 3].

Протопласты как тест-объекты имеют ряд преимуществ по сравнению с клетками. Отсутствие клеточной стенки, затрудняющей проникновение внутрь крупных молекул, и способность к ее регенерации может быть одной из маркерных функций для обнаружения мутагенов.

Целью данной работы была проверка возможности использования биокалориметрического метода для биотестирования ксенобиотиков на примере оценки влияния фенола на протопласты и клетки бактерий.

В работе использовали штаммы бактерий *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Культуры клеток выращивали в жидкой полноценной пептонно-дрожжевой среде (Tetr), содержащей в 1 л дистиллированной воды 1,5 г сухого питательного бульона, 3 г дрожжевого экстракта, 6 г пептона ферментативного, pH 7,2. Агаризованную среду готовили добавлением 0,7 % или 1,5 % агар-агара. Среды стерилизовали автоклавированием 30 мин при 0,1 МПа. В качестве сред для культивирования протопластов использовали среду Tetr с добавлением осмотического стабилизатора (10 М сахароза). Для получения протопластов использовали культуры бактерий, выращенные в жидкой среде Tetr при 37 °С в течение 16–18 часов в стационарных условиях. К 4 мл суточной культуры бактерий добавляли 36 мл свежей среды Tetr и инкубировали при 37 °С в течение 2–4-х часов для перевода клеток в логарифмическую стадию роста. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 5000 мин⁻¹ и обрабатывали лизоцимом [2] в концентрации 1–2 мг/мл 60 мин при 30 °С. Удаление лизоцима проводили разведением суспензии в среде

Tetr в соотношении 1:10 и 15-минутным центрифугированием при 3000 мин⁻¹.

Оценку эффективности образования протопластов осуществляли путем высева разведенной в гипертонической среде и дистиллированной воде суспензии протопластов на среды Tetr, содержащие и не содержащие осмотический стабилизатор. Выход протопластов (P) определяли по формуле:

$$P = (N_0 - N_1)/N_0 \cdot 100 \%, \quad (1)$$

где N_0 – общее число клеток; N_1 – число клеток, не подвергшихся действию лизоцима. Кроме того, эффективность образования протопластов определяли биокалориметрическим методом [4]. Выход протопластов составил 90 %.

Удельную скорость тепловыделения (метод кинетических сдвигов) микроорганизмов находили по изменению теплопродукции клеток (протопластов):

$$\mu = (\ln q_2 - \ln q_1)/\Delta t, \quad (2)$$

где q_1 , q_2 – мощность тепловыделения клеток в начальный и последующий моменты времени. Биокалориметрические измерения проводили с помощью микрокалориметра МКМ-Ц (Украина). Подготовку прибора и образцов к измерениям осуществляли, как описано в [4].

Для оценки возможности обнаружения ксенобиотиков биокалориметрическим методом изучали влияние фенола на бактерии родов *Bacillus* и *Clostridium*. Исследовали начальные изменения общего количества выделенного тепла клетками микроорганизмов при добавлении субстрата глюкозы или ксенобиотика фенола. Добавка глюкозы оказывала активирующее влияние на клетки, и уровень их теплопродукции возрастал. При воздействии 0,6 % фенола на *Clostridium butyricum* наблюдалась также активация метаболизма клеток. Поскольку фенол не является субстратом данных микроорганизмов, природа активации тепловыделения, по-видимому, связана с разобщением метаболических путей и снижением эффективности преобразования энергии. В этом случае клетки находятся в стрессовом состоянии и пытаются восстановить возникшие нарушения, чтобы адаптироваться к новым условиям среды. Если возможности адаптации клеток недостаточны, это выражается в ингибирующем или токсичном действии ксенобиотиков.

В случае влияния фенола на *Bacillus subtilis* отмечено снижение уровня теплопродукции клеток по сравнению с исходными микроорганизмами. Для выяснения механизма этого явления требуется дополнительный анализ удельной скорости тепловыделения клеток.

Для оценки возможности использования протопластов в качестве тест-объектов проведено сравнительное изучение влияния фенола на бактерии *Bacillus*, *Clostridium* и их протопласты. Полученные результаты представлены в табл. 1. Теплопродукция протопластов возрастала по сравнению с исходным тепловыделением состоянием клеток. Это указывает на то, что после снятия клеточной оболочки протопласты находятся в стрессовом состоянии.

При воздействии фенола на протопласты *Clostridium butyricum* наблюдалось увеличение мощности их теплопродукции, как и для исходных клеток, но удельная скорость тепловыделения снижалась. Для протопластов *Bacillus subtilis* наблюдалось уменьшение, как уровня теплопродукции, так и удельной скорости их тепловыделения. Протопласты клостридий, как и исходные клетки, были более устойчивы к фенолу, по сравнению с бациллами. Поскольку протопласты клеток не способны размножаться, то все наблюдаемые изменения мощности и удельной скорости тепловыделения в присутствии фенола связаны с изменением их метаболической активности. Так для протопластов *Clostridium butyricum* наблюдаемые изменения тепловыделения указывают на ингибирующее действие фенола. Для протопластов *Bacillus subtilis* отмеченный характер поведения свидетельствует о токсичном действии 1 % раствора фенола.

Таблица 1

Теплопродукция клеток и протопластов бактерий родов *Bacillus* и *Clostridium* при воздействии фенола (1 %) в среде Tetr

Вид бактерий, их состояние	Мощность теплопродукции, мкВт/мл		Удельная скорость тепло- выделения, мкВт/мин*мл	
	без фенола	с фенолом	без фенола	с фенолом
<i>Clostridium butyricum</i> :				
- клетки	510,0	1070,0	13,0	21,8
- протопласты	2100,0	3500,0	40,5	15,3
<i>Bacillus subtilis</i> :				
- клетки	3760,0	3750,0	13,1	18,9
- протопласты	4370,0	4180,0	29,4	-8,8

Таким образом, биокалориметрический метод позволяет быстро идентифицировать состояние клеток, обнаружить присутствие ксенобиотиков в анализируемой среде и оценить характер их действия по уровню тепловыделения клеток и скорости его изменения.

Показатель удельной скорости тепловыделения проявляет большую чувствительность к присутствию ксенобиотика по сравнению с общим уровнем тепловыделения протопластов и клеток. Метод кинетических сдвигов позволяет за 30 мин оценить характер влияния ксенобиотиков на метаболизм протопластов и клеток.

Особенности поведения клеток зависят как от дозы ксенобиотика, так и от состояния клеток. В целом протопластирование увеличивало чувствительность тест-объектов к фенолу в 2–3 раза и изменяло характер воздействия ксенобиотика.

Чувствительность современных микрокалориметров позволяет регистрировать изменение мощности теплопродукции на уровне 1 мкВт/мл, что соответствует изменению потребления субстратов в присутствии ксенобиотиков на уровне 10^{-7} М. Это указывает на достаточно высокую чувствительность биокалориметрического метода. Учитывая другие достоинства биокалориметрии, такие как универсальность и возможность анализа как жидких, так и твердых сред, это делает ее незаменимым инструментом при биотестировании ксенобиотиков в окружающей среде и продуктах питания, а также позволяет изучать свойства и механизмы воздействия ксенобиотиков на живые организмы.

1. Булетов А.И. Справочник инженера-эколога нефтедобывающей промышленности по методам анализа загрязнений окружающей среды. М.: ОАО «Изд-во Недра», 1999.
2. Стенько А.С. Протопласты как модель генетических исследований у микроорганизмов // Молекул. биология. Киев. 1982, вып.32. С. 7–16.
3. Рыбчин В.Н. Основы генетической инженерии: Учеб. пособие для вузов. Мн.: Выш. шк., 1986. 186 с.
4. ГОСТ 27930-88. Молоко и молочные продукты. Биокалориметрический метод определения общего количества бактерий.