

АНАЛИЗ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ АКТИВНОГО ИЛА МЕТОДОМ ОПТИКО-РЕДУКТАЗНОЙ ПРОБЫ

Антропогенное загрязнение водной среды ксенобиотиками, приводит к нарушению работы городских очистных сооружений в результате способности ила накапливать большое количество загрязнителей, приводящих к его инаktivации [1–3].

Биотестирование на основе редуктазной пробы рассматривается как простой, быстрый и эффективный способ визуального контроля биологической активности ила, клетки которого способны восстанавливать редокс-краситель метиленовый синий (МС) [2–4]. Чем больше живых микроорганизмов находится в среде и выше их активность, тем быстрее восстанавливается краситель МС (рис. 1).

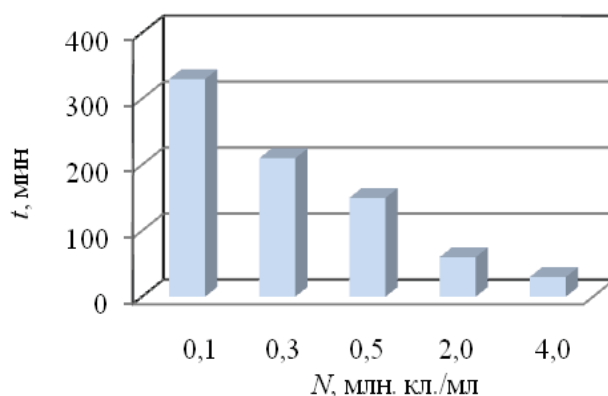


Рисунок 1 – Время обесцвечивания красителя метиленового синего от концентрации микроорганизмов в водной среде

Недостатками визуальной редуктазной пробы (ВРП) является субъективность контроля конечной точки обесцвечивания красителя, а также увеличивающаяся длительность анализа с ростом содержания токсичных и ингибирующих веществ, снижающих концентрацию жизнеспособных клеток и их активность.

Для ликвидации недостатков ВРП был предложен метод оптико-редуктазной пробы (ОРП) [5], устраняющий субъективность контроля и сокращающий длительность биотестирования.

В его основе лежит высокая чувствительность ферментов-дегидрогеназ клеток, к присутствию ингибирующих и токсичных веществ в водных средах. Метод ОРП основан на спектрофотометрической регистрации максимальной скорости обесцвечивания редокс-красителя МС, наблюдаемой при 660 нм.

Величина скорости обесцвечивания МС линейно изменяется от содержания клеток N (рис. 2) в диапазоне 10^6 – 10^8 кл/мл.

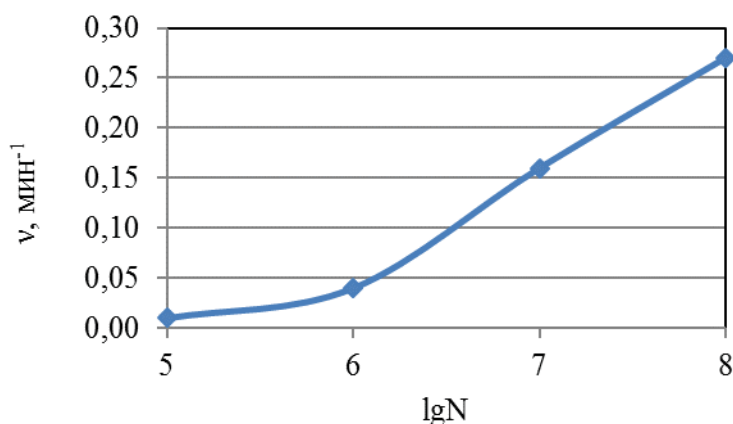


Рисунок 2 – Зависимость показателя скорости обесцвечивания метиленового синего от концентрации микроорганизмов в водной среде

Кинетическая зависимость обесцвечивания МС в анаэробных условиях (рис. 3) описывается выражением (1)

$$C = C_0 \cdot \exp(-k \cdot t), \quad (1)$$

где C_0 , C – начальная и текущая концентрации окисленной формы редокс-красителя; k – эффективная константа скорости обесцвечивания МС, которая может быть найдена после преобразования (1) в полупологарифмических координатах $\ln(C/C_0)$ от t .

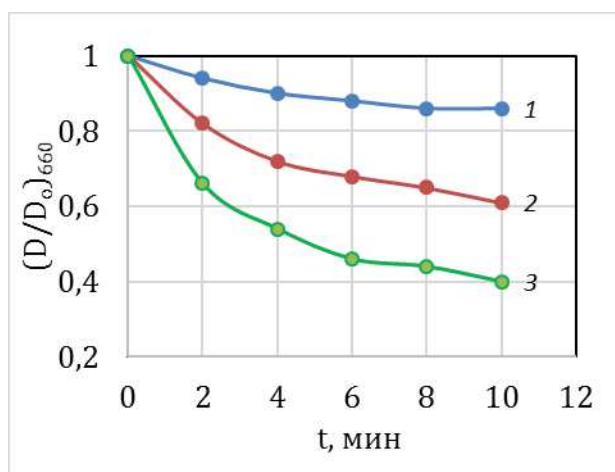


Рисунок 3 – Кинетика изменения показателя $(D/D_0)_{660}$ водной среды с МС: 1 – надосадочная жидкость без ила; 2, 3 – с активным илом 0,2 г и 0,4 г

Активный ил является сложной гетерогенной системой, поэтому на показания ОРП может оказывать влияние целый ряд факторов: светорассеивание среды, седиментация частиц и сорбция на них красите-

ля. Для правильного применения метода ОРП при анализе состояния ила необходимо оценить влияние указанных факторов на восстановление красителя МС.

Цель работы – оценка влияния воздействующих факторов среды на оптико-редуктазный метод определения активности ила. В работе использовали избыточный активный ил Минской очистной станции (МОС-1), отобранный из илоприемника. За седиментацией частиц следили методом фотоседиментации по изменению оптической плотности светорассеивания ила на длинах волн 600 – 800 нм. Измерение оптической плотности D образцов проводили с помощью спектрофотометра Sperecord M-40 (Германия).

Процессы сорбции МС изучали при $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Для этого в бюксы, содержащие по 10 мл растворов МС с $C = 10^{-5} - 10^{-3}$ М помещали по 0,1–0,5 г АИ. В процессе сорбции красителя периодически отбирали образцы, центрифугировали их при 10 000 об./мин, 5 мин и измеряли, содержание МС в надосадочной жидкости на длине волны 660 нм. Строили изотермы сорбции МС клетками АИ в соответствии с уравнением мономолекулярной сорбции Ленгмюра [2]. Для учета влияния светорассеивания неосаждаемых частиц на показания ОРП использовали метод 2-х волн наблюдения в области 750–800 нм. Экстраполировав зависимость k $\lambda = 660$ нм, находили истинное значение оптической плотности красителя без влияния светорассеивания среды. Полученные результаты обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

В таблицах 1 и 2 приведены значения констант скоростей процесса обесцвечивания МС и влияющих на него факторов.

Таблица 1 – Константы скорости седиментации частиц активного ила, сорбции и восстановления МС и влияние светорассеивания среды

№	Факторы	Значение констант скорости, мин ⁻¹	
		t = 0	t = 10 мин
1.	Седиментация	0,231±0,015	0,003±0,001
2.	Сорбция	0,252±0,017	0,002±0,001
3.	Светорассеивание	0,170±0,011	0,005±0,002
4	Восстановление МС	-	0,213 ±0,009

Как видно из таблицы 1, начальные значения скоростей седиментации частиц ила, сорбции МС и влияние светорассеивания среды сопоставимы с константами скоростей обесцвечивания МС активным илом (таблица 2), поэтому оказывают сильное возмущающее воздействие на показания оптико-редуктазной пробы и не позволяют их точно измерить в начальный момент времени.

Таблица 2 – Константы скорости обесцвечивания красителя МС активным илом ($m = 0,5$ г), полученные методом ОРП. $T = 20^\circ\text{C}$

Образцы ила	Состояния активного ила	Значение константы скорости обесцвечивания МС в анаэробных условиях, мин^{-1}
1	слабоактивный ил	$0,019 \pm 0,002$
2	среднеактивный ил	$0,155 \pm 0,007$
3	активный ил	$0,265 \pm 0,009$

После 10 мин отстаивания ила значения констант скоростей мешающих факторов значительно снижаются (таблица 1) и они не влияют существенно на показания редуктазной пробы (таблица 2). Из таблицы 2 видно, что метод ОРП реагирует на состояния активного ила и позволяет различать слабо-, средне- и высокоактивный ил.

Таким образом, в результате проведенной работы показано, что для оценки состояния активного ила и влияния на него ингибирующих и токсичных веществ в сточных водах может применяться оптический вариант редуктазной пробы. Установлено, что наибольшее влияние на скорость изменения показателя D_{660} в системе ил-краситель оказывают процессы седиментации крупных частиц и сорбции красителя. Для устранения их влияния на показания ОРП необходимо проводить измерение редуктазной активности клеток после завершения основных стадий осаждения частиц и процессов сорбции красителя в течение 10 мин. Показано, что остаточное влияние указанных факторов и светорассеивания на скорость обесцвечивания МС в анаэробных условиях становится незначительным и им можно пренебречь. Метод ОРП устраняет субъективность контроля редуктазной активности ила и снижает длительность анализа до 10–15 мин.

Использование метода ОРП для оценки состояния активного ила имеет ряд преимуществ перед другими методами анализа. К их числу относятся: экспрессность, низкая трудоемкость измерений, достаточно высокая чувствительность и производительность анализа. Это позволяет применять данный метод для контроля биологической активности ила, влияния на него токсичных веществ и оценки эффективности детоксикации сточных вод на очистных сооружениях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Михейчик Н. И, Игнатенко А. В. Анализ влияния ксенобиотиков на ростовую и биохимическую активность клеток бактерий // Труды БГТУ. Сер. IV, Химия и технология органических веществ, 2007. Вып. XV. С. 216–220.
2. Разработка нового метода оценки ферментативной окислительной способности активного ила / П. А. Тупин [и др.] // Известия вузов. Лесной журнал. 2010. № 3. С. 119–124.

3. Определение окислительной способности микроорганизмов биоплёнки активного ила очистных сооружений / Д. Г. Чухчин [и др.] // Биотехнологии в химико-лесном комплексе. 2014. С. 329–333.

4. Nandy S. K., Venkatesh K. V. Application of methylene blue dye reduction test (MBRT) to determine growth and death rates of microorganisms // African j. of Microbiol. Research. 2010. Vol. 4, no 1. P. 61–70.

5. Игнатенко А.В. Биотестирование токсичности водных сред методом редуктазной пробы / Труды БГТУ. Сер. 2, Химические технологии, биотехнологии, геоэкология. – Минск: БГТУ, 2018. – № 2 (211). – С. 155–160.

УДК 582.998.16:615.322

А.А. Климович, асп.; Я.Л. Страх, ассист.;
О.С. Игнатовец, канд. биол. наук, доц.
(БГТУ, г. Минск)

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ПУПАВКИ БЛАГОРОДНОЙ (*CHAMAEMELUM NOBILE* (L.) ALL) В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

В настоящее время без лекарственных растений невозможно представить современную профилактику и терапию большинства заболеваний. В мире почти 40 % фармацевтической продукции изготавливается из лекарственных растений. Природные средства применяются как в развитых, так и в развивающихся странах.

Лекарственные средства на основе растительного сырья характеризуются высокой эффективностью, незначительным проявлением побочных эффектов, в том числе опасности, связанной с развитием явлений привыкания, психической и физической зависимости, удобным способом применения и приемлемой ценой. В настоящее время актуально создание новых лекарственных средств на основе тонко измельченного отечественного лекарственного растительного сырья. В связи с чем появляется необходимость расширить область исследований, так как многие потенциально важные лекарственные растения малоизученны.

Пупавка благородная (*Chamaemelum nobile*) – многолетнее травянистое растение, семейство Астровые. Относится к лекарственным растениям, обладает схожей биологической активностью с ромашкой аптечной. Однако, согласно литературным данным, данный вид обладает более выраженными лекарственными свойствами по сравнению с аптечной ромашкой [1], поэтому имеет большой производственный потенциал. Например, может использоваться в фармацевтической промышленности в качестве основного компонента биологически ак-