

УДК 57.04+579.6+57.083.1+57.033+504+544.165

КОМПЛЕКСНАЯ МЕТОДИКА ИНСТРУМЕНТАЛЬНОГО МИКРОБИОТЕСТИРОВАНИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ РАЗЛИЧНОЙ ПРОДУКЦИИ, ОТХОДОВ И ТЕРРИТОРИЙ

В. С. Сибирцев^{1,*}, М. В. Успенская¹, А. В. Гарабаджу², академик РАН В. И. Швец^{2,3}

Поступило 12.03.2018 г.

Описана методика микробиотестирования, предусматривающая регистрацию изменений рН, редокс-потенциала, электропроводности, оптической плотности, интенсивности светорассеяния и люминесценции, а также других параметров образцов с жизнеспособными тестовыми микроорганизмами, инкубируемыми в жидкой питательной среде в присутствии и в отсутствие тестируемых факторов. Представлены результаты анализа с помощью данной системы про- и антибиотической активности нефтепродуктов, а также слабых электромагнитных полей мегагерцового диапазона. Показано, что предлагаемая методика по сравнению со стандартными методами позволяет получать более детальную и объективную информацию и требует меньше временных и трудовых затрат.

Ключевые слова:

DOI:

В связи с неуклонным ростом объёмов промышленного производства, ассортимента продукции и уровня её потребления увеличивается антропогенная нагрузка на окружающую среду. Всё более актуальными в настоящее время становятся проблемы разработки новых объективных и доступных для широкого использования экспресс-методов мониторинга общей токсикологической опасности выпускаемой и вновь разрабатываемой либо модифицируемой продукции. Не менее актуальными являются проблемы оценки токсичности и экологической безопасности разных видов производственных и бытовых отходов, оценки общей степени экологического неблагополучия помещений, водоёмов, территорий и т.п.

Наиболее приемлемым и адекватным в настоящее время признано применение для этих целей тестовых биосистем. Использование в качестве таких систем многоклеточных организмов позволяет более адекватно моделировать условия человеческого организма, а биотестирование с помощью микроорганизмов делает проведение подобных анализов значительно более простым, доступным, дешёвым, экспрессным и статистически объективным при

оценке результатов. Однако принятые в настоящее время в качестве стандартных при микробиологическом тестировании процедуры визуальной оценки общей выживаемости тестовых микроорганизмов (ТМ) дают, как правило, неполную, статичную и достаточно субъективную информацию лишь о летальных нарушениях жизнедеятельности ТМ.

В связи с этим перспективным представляется использование для целей микробиологического тестирования инструментальных технологий. Из последних с точки зрения их простоты, надёжности, универсальности и доступности для широкого использования наше внимание привлекли такие методы, как нефелометрия, фото- и люминометрия в области от 200 до 1100 нм, потенциометрия и кондуктометрия. Каждый из упомянутых методов имеет свои преимущества и ограничения по применимости к тестируемым объектам (ТО), ТМ и тестовым средам (ТС). Поэтому целью настоящей работы стала разработка методики комплексной инструментальной оценки влияния внешних химических и физических факторов на динамику жизнедеятельности ТМ.

Эта методика состояла из следующих этапов. Сначала готовили ТС — жидкую питательную среду (ЖПС), содержащую достаточное количество жизнеспособных ТМ (10^4 – 10^7 клеток/мл). Приготовленную ТС разливали в измерительные ёмкости, в каждую из которых (за исключением контрольных) добавляли определённое количество ТО (образец продукции, проба, взятая возле источника выброса

¹ Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики

² Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)

³ Московский технологический университет (Институт тонких химических технологий)

*E-mail: vs1969r@mail.ru

или на территории, экологическое состояние которой требуется оценить, и т.п.). Далее ёмкости с ТС инкубировали в течение нескольких часов при температуре, близкой к оптимальной, для размножения содержащихся в них ТМ, которые затем подвергались в остром или хроническом режиме дополнительным физическим воздействиям, моделирующим электромагнитный или радиационный фон или иные условия, характерные для территорий, откуда были взяты ТО. Непосредственно **перед** началом и сразу после окончания инкубации в каждой из инкубируемых ёмкостей с помощью нефелометрии регистрировали значения интенсивности упругого светорассеяния (I_{od}) при 540 нм либо иных длинах волн, определяли величины электропроводности (X) и редокс-потенциала (E). Общую степень активирования или ингибирования (+/-) жизнедеятельности ТМ рассчитывали по формуле $\epsilon_S = \sum (w_i \epsilon_i) / \sum w_i$, где $\epsilon_i = 100 \cdot (\Delta Y_i - \Delta Y_{c_i}) / \Delta Y_{c_i}$ отдельно по изменениям каждого из Y_i параметров ТС (X , E , I_{od} и др.); $\Delta Y_i = \sum (Y_{e,i,j} - Y_{b,i,j}) / N$ — средние значения разности параметров Y_i в начале (Y_b) и в конце (Y_e) инкубирования ТС в присутствии ТО (ΔY_i) и в их отсутствие (ΔY_c) при выборке из N параллельных образцов (содержащих одинаковое количество ТО в одинаковых ТС); w_i — весовые коэффициенты, выбираемые исследователем в зависимости от степени информативности Y_i параметра ТС для общей оценки жизненной активности ТМ в каждом конкретном виде анализа.

Кроме того, мы могли дополнительно оценить следующие показатели: изменения в тонкой динамике жизненной активности ТМ в присутствии ТО по сравнению с контролем, как описано в работах [1–3]; изменения в ходе инкубации таких параметров ТС, как рН, оптическая плотность (A_m) и интенсивность люминесценции (I_m) при длинах волн 300 (для A_m), 380 и 465 нм (по величине фотовозбуждения и эмиссии в случае регистрации I_m), характерных для белков в составе большинства неокрашенных микроорганизмов, либо иных значений длины волны (например, при 435 нм для A_m и 370 и 685 нм для I_m , характерных для многих микроорганизмов, синтезирующих хлорофилл), далее эти параметры могут быть дополнительно включены в формулу для расчёта ϵ_S ; влияние ТО на структуру генома ТМ (в соответствии с тем, как описано в работах [4–7]).

С помощью этой методики мы оценили экологическую опасность широко распространённых антропогенных загрязнителей окружающей среды

(нефтепродукты в разных концентрациях, слабые электромагнитные поля мегагерцового диапазона, возникающие, в частности, в результате работы большинства современных электротехнических устройств) при использовании таких представителей естественной микрофлоры, как *Clostridium perfringens*, *Pseudomonas yamanorum*, *Rhodotorula glutinis* и *Chlorella vulgaris*.

В экспериментах в качестве ЖПС использовали стерильный водный раствор с рН 7,2, содержащий 5 г/л глюкозы, 18 г/л белкового гидролизата и 2 г/л NaCl. Инкубацию с ТМ проводили при 25 °С при стандартном уровне **освещённости** и интенсивности перемешивания образцов. Показатель ϵ_S определяли по формуле $\epsilon_S = (\epsilon_{Iod} + 0,4\epsilon_E + 0,6\epsilon_X) / 2$, где ϵ_{Iod} , ϵ_E и ϵ_X , в свою очередь, определяли по результатам измерений I_{od} , E и X так, как это было описано выше для ϵ_i . Относительная ошибка определения ϵ_S для всех образцов — в диапазоне от 10 до 20%. Результаты этих исследований представлены в табл. 1 и 2.

Из данных таблиц видно, что при достаточно большой концентрации **все** исследованные нефтепродукты оказывали ингибирующее действие ($\epsilon_S < 0$) на **все** ТМ, которое при 100-кратном уменьшении концентрации нефтепродуктов менялось на активирующее ($\epsilon_S > 0$). Однако интенсивность этого действия, выражаемая $|\epsilon_S|$, существенно различалась при использовании разных видов микроорганизмов и разных нефтепродуктов.

В отличие от стандартных методов биотестирования мы с помощью предлагаемой методики смогли оценить влияние слабых высокочастотных электрических полей на характер жизнедеятельности ТМ в зависимости от напряжённости и от частоты (ν) изменения последней. Так, при $U = 50$ В/м и ν от 0,1 до 3 МГц мы наблюдали значимое ингибирование, а при $U = 50$ В/м и $\nu = 35$ МГц, наоборот, значимое активирование жизнедеятельности всех ТМ. В наибольшей степени это было характерно для водорослей *C. vulgaris*, а в наименьшей — для клостридий.

Таким образом, полученные результаты позволяют прийти к заключению, что при использовании разработанной нами системы комплексного инструментального микробиологического тестирования экологической опасности образцов промышленной продукции, отходов и проб с разных территорий может быть достигнут значительный экономический и экологический эффект, заключающийся в удешевлении и ускорении анализа при использовании предлагаемой методики по сравнению со стандартными методами микробиологического тестирования. Наша методика повышает объективность и информатив-

Таблица 1. Оценка ϵ_s (%) для разных представителей природной микрофлоры в присутствии типичных нефтепродуктов в разных концентрациях

	Концентрация									
	$2 \cdot 10^{-3}$ об.%					$2 \cdot 10^{-5}$ об.%				
ТМ	Нефтепродукты									
	ДТ	УС	ОП	Тл	н-Г	ДТ	УС	ОП	Тл	н-Г
<i>P. yamanorum</i>	-15	-7	-39*	-27	+9	+18	+23	+39*	+36*	+43*
<i>R. glutinis</i>	-23	-21	-49	-35	+10	+11	+18	+41	+31	+47
<i>C. vulgaris</i>	-34	-21	-56	-39	+11	+13	+19	+43	+39	+52

Примечание. ДТ — дизельное топливо, УС — уайт-спирит, ОП — ОП-10 (смесь ароматических углеводородов с различными заместителями), Тл — толуол, н-Г — н-гексан.

Таблица 2. Оценка ϵ_s (%) для разных представителей природной микрофлоры после воздействия на них в течение всего времени инкубирования (8 ч) электрическими полями со средней напряжённостью (U) от 20 до 50 В/м и частотой её изменения (ν) от 0,1 до 35 МГц

U , В/м	20					50				
ν , МГц	0,1	0,6	3	9	35	0,1	0,6	3	9	35
<i>C. perfringens</i>	-17	-13	-10	-4	+8	-32	-27	-21	-6	+15
<i>R. glutinis</i>	-21	-14	-8	+3	+13	-43	-30	-14	+5	+28
<i>C. vulgaris</i>	-24	-16	-10	+4	+18	-46	-33	-19	+8	+35

ность результатов микробиологического тестирования и доступна для широкого использования. В конечном итоге она может повысить качество жизни людей, потребляющих упомянутую продукцию и проживающих на территориях вблизи возможных источников их загрязнения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сибирцев В.С., Наумов И.А., Куприна Е.Э., Олехнович Р.О. Применение методики импедансного биотестирования для оценки действия фармацевтических соединений на рост микроорганизмов // Хим.-фарм. журн. 2016. Т. 50. № 7. С. 51–55.
2. Сибирцев В.С., Игнатъева А.Ф., Шичкова К.А., Чан Тхань Туан, Строев С.А., Радин М.А. Исследование влияния высокочастотных электрических полей на жизнедеятельность микроорганизмов при различной температуре // Науч.-техн. вестн. информ. технологий, механики и оптики. 2017. Т. 17. № 2. С. 279–286.
3. Sibirtsev V.S., Olekhnovich R.O., Samuylova E.O. Assessment of Integral Toxicity of Water Resources by Instrumental Methods of Analysis // SGEM Conf. Proc. 2017. V. 17. № 61. P. 507–514.
4. Сибирцев В.С. Изучение возможностей применения к анализу ДНК бифункциональной системы: бромид этидия + Хехст-33258 // Биохимия. 2005. Т. 70. № 4. С. 545–555.
5. Сибирцев В.С. Флуоресцентные ДНК-зонды: исследование механизмов изменения спектральных свойств и особенностей практического применения // Биохимия. 2007. Т. 72. № 8. С. 1090–1106.
6. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В. Новые методы биотестирования и анализа ДНК с помощью флуорофоров // Биотехносфера. 2011. Т. 13. № 3. С. 9–14.
7. Сибирцев В.С. Методики биотестирования на основе флуорометрического геномного анализа // Опт. журн. 2017. Т. 84. № 11. С. 84–89.

COMPLEX METHOD OF INSTRUMENTAL MICROBIOTESTING ECOLOGICAL SAFETY OF VARIOUS PRODUCTS, WASTE AND TERRITORIES

V.S. Sibirtsev, M.V. Uspenskaya, A.V. Garabadgiu, V.I. Shvets

A microbiotesting technique is described, which involves recording changes in pH, redox potential, electrical conductivity, optical density, light scattering and luminescence intensities, as well as other parameters of samples with viable test microorganisms, incubated in a liquid nutrient medium in the presence and in the absence of tested factors. The results of the analysis using this system of pro- and antibiotic activity of various oil products, as well as weak electromagnetic fields of the megahertz range are presented. It is shown that the proposed method,

in comparison with standard methods, allows to obtain more detailed and objective information, and also requires less time and labor.