

УДК 543.94+577.151.03

ПРИНЦИПЫ КОНСТРУИРОВАНИЯ БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ БИОТЕСТОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СЛОЖНЫХ СРЕД

В. П. Калябина^{1,2}, Е. Н. Есимбекова^{1,2,*}, И. Г. Торгашина¹,
К. В. Копылова¹, В. А. Кратасюк^{1,2}

Представлено академиком РАН И.И. Гительзоном 16.08.2018 г.

Поступило 19.10.2018 г.

Сформулированы принципы конструирования биолюминесцентных ферментативных тестов для оценки качества сложных сред, которые заключаются в обеспечении максимальной чувствительности к потенциально токсичным веществам при минимальном воздействии незагрязнённых сложных сред. Разработанные принципы легли в основу схемы конструирования, которую применили при создании нового биолюминесцентного метода для интегральной экспресс-оценки химической безопасности овощей и фруктов, основанного на использовании в качестве тест-системы ферментов светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазы и люциферазы.

Ключевые слова: биолюминесцентный метод, сложные среды, анализ безопасности пищи, тяжёлые металлы, пестициды, ферменты светящихся бактерий, ферментативные тесты.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524852229-233>

Сложные по составу жизненно важные компоненты природной среды, такие как почва и продукты питания растительного происхождения, склонны к аккумуляции потенциально опасных веществ [1–3], поэтому анализ их безопасности является одной из приоритетных задач экологической токсикологии.

Применяемые в настоящее время классические методы анализа, в частности хроматография и масс-спектрометрия, не позволяют в полной мере оценить потенциальную опасность продуктов питания [4–6], являются трудоёмкими и дорогостоящими. Для контроля безопасности и минимизации рисков здоровью потребителей необходимы простые экспресс-методы биотестирования, позволяющие не только выявлять количество загрязняющих соединений в природных средах, но и адекватно оценивать токсическое воздействие, которое они способны оказывать на живые системы [7, 8]. Среди имеющихся биотестов экспрессностью отличаются немногие. Так, длительность процедуры анализа с помощью биотестов на основе лиофилизированных бактерий Lumistox (“Nach”, Великобритания) и Microtox (“Modern water”, США) составляет около часа. Био-

тест, основанный на использовании яиц ракообразных *Thamnocephalus platyurus*, обеспечивает получение результата через 30 мин. К самым быстрым биотестам относятся биолюминесцентные ферментные биотесты для экологического мониторинга [9, 10]. Несмотря на то что данные тесты в основном применяются для биотестирования загрязнения простых сред, таких как вода и водные растворы, показана их потенциальная применимость для оценки безопасности многокомпонентных образцов, таких как почва, биологические жидкости, продукты питания и т.п.

Применение ферментных биотестов для оценки загрязнения гетерогенных и сложных по составу сред, например фруктов и овощей, требует специальной пробоподготовки перед анализом, а присутствие природных органических компонентов в их составе может существенно исказить результаты.

Цель нашего исследования состояла в разработке схемы конструирования новых биотестов, пригодных для оценки безопасности природных и искусственных сред сложного состава.

На рис. 1 представлена разработанная нами блок-схема конструирования ферментативных тестов, согласно которой в первую очередь необходимо установить чувствительность ферментов к действию ряда потенциальных загрязнителей сложной среды. В настоящей работе в модельных экспериментах мы оценили ингибирующее воздействие на параметры

¹Сибирский федеральный университет,
Красноярск

²Институт биофизики Сибирского отделения
Российской Академии наук, Красноярск

*E-mail: esimbekova@yandex.ru

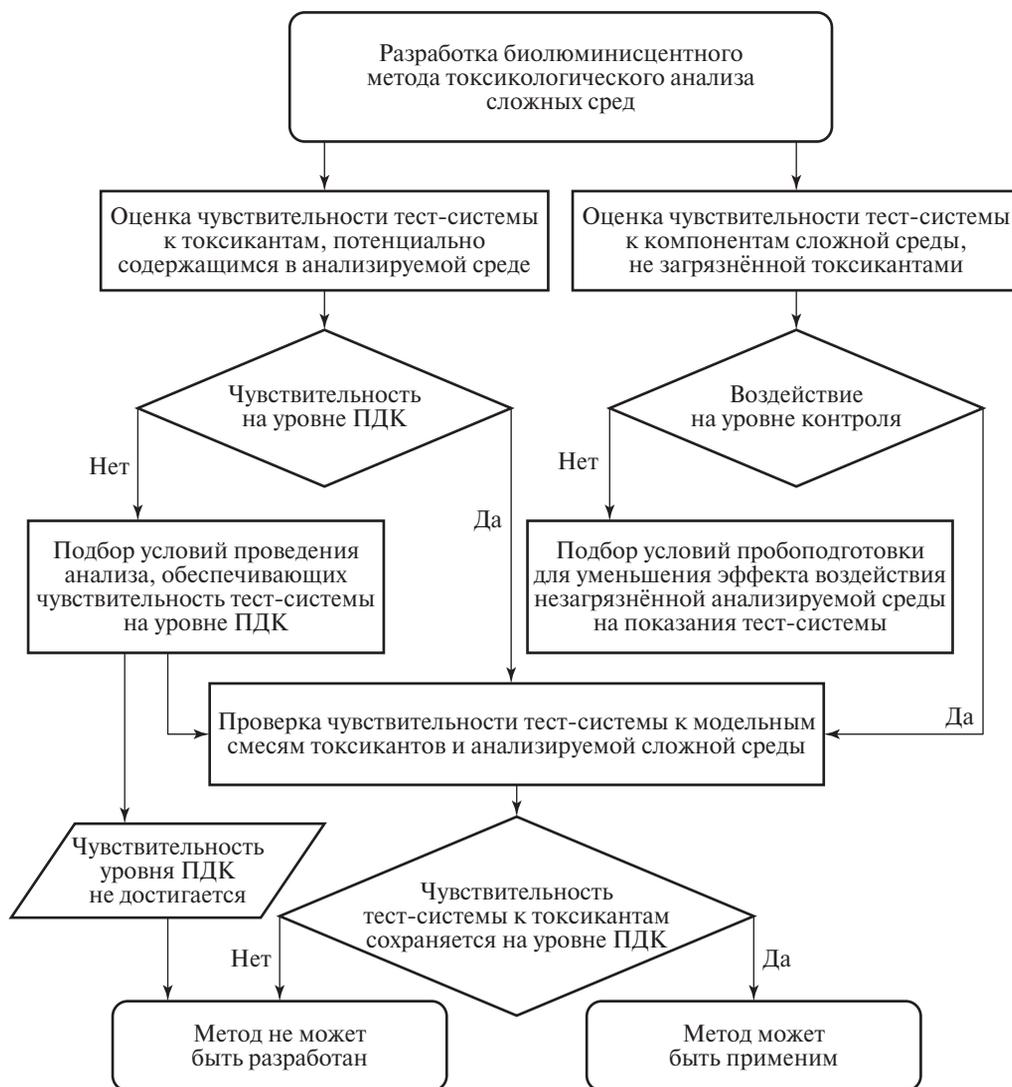


Рис. 1. Блок-схема конструирования ферментативных тестов для токсикологического анализа сложных сред.

биолюминесценции биферментной системы Р + Л тяжёлых металлов и пестицидов как наиболее часто встречающихся загрязнителей почвы и плодоовощных продуктов.

Для оценки безопасности природных компонентов, потенциально содержащих загрязняющие химические соединения, в работе использовали биферментную систему светящихся бактерий НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктаза + люцифераза (Р + Л). В основе биолюминесцентного метода лежит обнаружение ингибирующего влияния анализируемых веществ на ферментативные реакции путём регистрации изменения интенсивности испускаемого света [9, 10].

В работе использовали следующие реактивы: ФМН (“Serva”, Германия), НАДН (“Gerbu”, Германия), тетрадеканаль (“Merck”, Германия) и лиофилизованные препараты ферментов (набор реак-

тивов КРАБ производства лаборатории нанобиотехнологии и биолюминесценции Института биофизики СО РАН, Красноярск). Один флакон препарата содержал 0,5 мг люциферазы (КФ 1.14.14.3) из рекомбинантного штамма *E. coli* и НАД(Ф)Н:ФМН-оксидоредуктазу (КФ 1.5.1.29) из *Vibrio fischeri* (активность 3 нкат). Для приготовления растворов ферментов использовали 0,05 М калий-фосфатный буфер, рН 7,0. В качестве модельных токсических веществ использовали коммерчески доступные государственные стандартные образцы растворов солей тяжёлых металлов производства ОАО “Уральский завод химических реактивов” (Россия) и стандартные препараты пестицидов (ООО “НПАЦ Эколан”, Россия).

Образцы плодоовощной продукции для проведения экспериментов с модельным загрязнением проб приобретали в торгово-розничных сетях

г. Красноярск. Образцы после механического разрушения центрифугировали при 10 000 г в течение 5 мин при 25 °С. Полученные супернатанты исследовали в дальнейшей работе.

Активность биферментной системы определяли по величине максимальной интенсивности свечения $I_{\text{макс}}$, выраженной в относительных единицах. О влиянии анализируемых образцов на биолюминесцентную ферментную систему Р + Л судили по остаточному свечению $(I_0/I_k) \cdot 100\%$, где I_0 и I_k — значения максимальной интенсивности свечения биферментной системы Р + Л в присутствии анализируемого образца и контрольного раствора соответственно. В качестве контрольного раствора использовали дистиллированную воду. Степень влияния загрязняющих веществ на активность биферментной системы Р + Л оценивали по величине IC_{20} и IC_{50} (концентрации анализируемых веществ, вызывающих снижение активности системы Р + Л на 20 и 50% соответственно). Измерения биолюминесценции проводили на биолюминометре Lumat LB9507 (“Berthold Technology”, Германия).

При статистической обработке полученных результатов использовали критерий *t* Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

Мы обнаружили (табл. 1), что биферментная система Р + Л является чувствительной к ряду металлов, в том числе свинцу, цинку, меди, ртути, алюминию и хрому на уровне и ниже уровня их предельно допустимых концентраций (ПДК) в продуктах питания. Наибольшее ингибирующее воздействие на активность биферментной системы оказывала медь. Степень ингибирующего действия свинца и алюми-

Таблица 1. Значения параметров IC_{20} и IC_{50} , определённые при оценке влияния тяжёлых металлов и пестицидов на активность биферментной системы Р + Л

Токсикант	IC_{50} , мг/л	IC_{20} , мг/л	Допустимые уровни содержания, мг/л
Свинец	0,6	0,6	0,5
Медь	0,03*	0,002*	10,0
Ртуть	0,06*	0,03	0,02
Алюминий	—	0,6*	30,0
Хром	0,3	0,06*	0,2
α -ГХЦГ	0,03*	0,02	0,01
γ -ГХЦГ	0,1*	0,04	0,01
ДДЭ	0,01*	0,002*	0,1
ДДТ	0,01*	0,002*	0,1
Диазинон	6*	0,06*	0,5

Примечание. “—” при исследуемых концентрациях металла не установили величину показателя. * $p < 0,05$ по сравнению с максимально допустимыми уровнями содержания данных веществ в продуктах питания.

ния увеличивалась при уменьшении концентрации ферментов в реакционной смеси. Аналогичным образом исследовали влияние четырёх пестицидов. Предел чувствительности ферментативной системы Р + Л к действию таких пестицидов, как α - и γ -изомеры гексахлорциклогексана (ГХЦГ), 4,4-дихлордифенилэтилен (ДДЭ) и 4,4-дихлордифенилтрихлорметилметан (ДДТ), соответствовал или был ниже их максимально допустимого уровня в продуктах питания.

Преимуществом ферментативных методов токсикологического анализа является возможность увеличения чувствительности ферментативной системы к действию потенциально опасных веществ путём варьирования условий проведения анализа, например изменением концентраций ферментов и/или субстратов в реакционной смеси. Мы обнаружили, что чувствительность биферментной системы Р + Л к действию ряда тяжёлых металлов увеличивается при уменьшении содержания ферментов реакции в реакционной смеси. Так, наибольший ингибирующий эффект ионов свинца на активность системы Р + Л мы зарегистрировали при добавлении в реакционную смесь 0,2 мкг люциферазы (рис. 2).

Согласно предложенной блок-схеме, конструирование ферментативного теста подразумевает также оценку воздействия исследуемых сложных сред на ферментативную реакцию в отсутствие загрязнителей. В случае наличия ингибирующего или стимулирующего действия на ферментную систему пробы, не содержащей токсических веществ, дополнительным этапом в разработке теста может стать подбор условий пробоподготовки для уменьшения

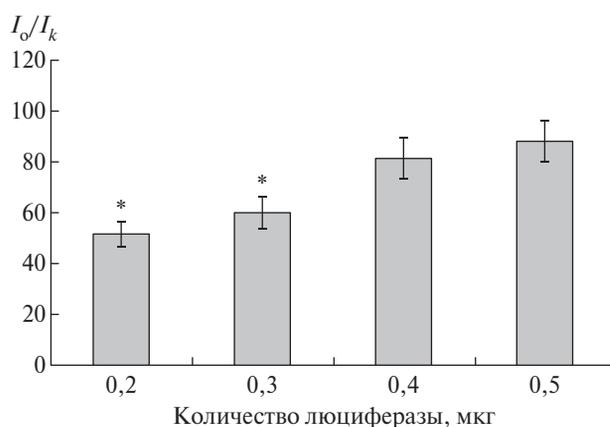


Рис. 2. Зависимость остаточного свечения биферментной системы Р + Л от количества люциферазы в реакционной смеси, содержащей 0,6 мг/л ионов свинца. ПДК содержания свинца в овощах 0,5 мг/л. $M \pm m$, $n = 5$, * $p < 0,05$ по сравнению с 0,5 мкг люциферазы.

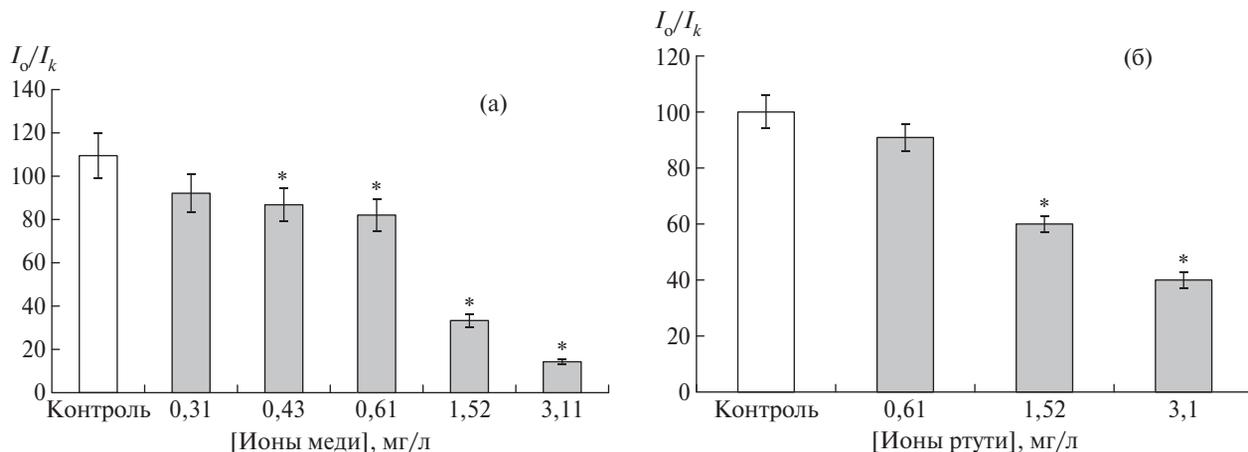


Рис. 3. Зависимость остаточного свечения биферментной системы Р + Л от концентрации ионов меди (а) и ртути (б), предварительно разведённых в супернатанте образца огурца. $M \pm m$, $n = 5$, $*p < 0,05$ по сравнению с остаточным свечением контрольной пробы. ПДК содержания меди в овощах составляет 10,0 мг/л, ртути — 0,02 мг/л.

эффекта воздействия компонентов сложной анализируемой среды.

На заключительном этапе апробации ферментативного теста мы провели модельные эксперименты по оценке чувствительности ферментативной системы к смеси компонентов сложной системы и токсических веществ. Мы обнаружили влияние образцов плодоовощной продукции, загрязнённых рядом пестицидов и тяжёлых металлов, на активность биферментной системы Р + Л. Пестициды и тяжёлые металлы добавляли непосредственно в подготовленные супернатанты овощей (анализируемые образцы). Результаты сравнивали с ранее полученными данными о воздействии на активность системы Р + Л исследуемых загрязнителей, разведённых в дистиллированной воде (контрольные образцы). Мы установили, что при внесении меди и ртути непосредственно в пробу овощей чувствительность системы Р + Л к воздействию тяжёлых металлов сохранилась на уровне их ПДК для продуктов питания, хотя и была меньше чувствительности системы в присутствии солей металлов, разведённых дистиллированной водой (рис. 3). Аналогичные эксперименты мы провели при оценке степени воздействия на активность системы Р + Л инсектицида диазинона. Мы обнаружили, что показатели чувствительности системы Р + Л к данному пестициду не различались при добавлении в реакционную смесь контрольного или анализируемого образца (рис. 4).

Итак, мы впервые разработали схему конструирования биолюминесцентных ферментативных тестов для проведения токсикологического анализа сложных по составу сред и установили, что главными

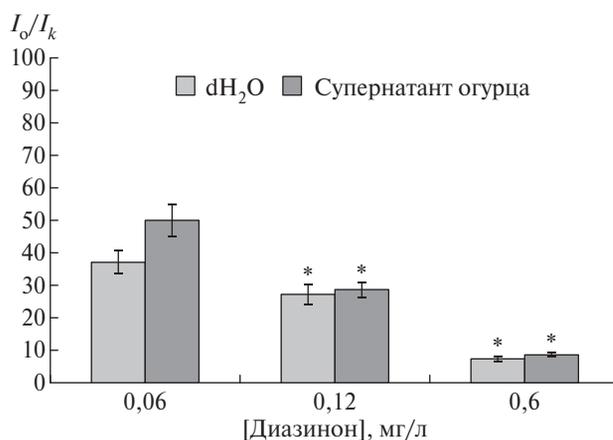


Рис. 4. Зависимость остаточного свечения биферментной системы Р + Л от концентрации диазинона, разведённого в дистиллированной воде (контроль), и в супернатанте образца огурца. Максимально допустимый уровень диазинона в овощах составляет 0,2 мг/л. $M \pm m$, $n = 5$, $*p > 0,05$ при сравнении показателей соответствующих групп.

принципами разработки методов для анализа гетерогенных сред на основе ферментативных систем являются обеспечение максимальной чувствительности к потенциально токсичным веществам и подбор условий, гарантирующих минимальное воздействие незагрязнённых, сложных по составу сред на биферментную систему для корректной интерпретации результатов.

Источники финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Правительства Красноярского края, Красноярского краевого фонда науки в рамках научного проекта № 18–44–242003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antoniadis V., Shaheen S.M., Boersch J., Frohne T., Du Laing G., Rinklebe J. // *J. Environ. Manage.* 2017. V. 186. Pt 2. P. 192–200.
2. Denis N., Zhang H., Leroux A., Trudel R., Bietlot H. // *Food Control.* 2016. V. 67. P. 225–234.
3. Orisakwe O.E., Nduka J.K., Amadi C.N., Dike D.O., Bede O. // *Chem. Cent. J.* 2012. V. 6. P. 77.
4. Lozowicka B., Abzeitova E., Sagitov A., Kaczynski P., Toleubayev K., Li A. // *Environ. Monit. Assess.* 2015. V. 187. № 10. P. 609.
5. Luis G., Hernández C., Rubio C., González-Weller D., Gutiérrez Á., Revert C., Hardisson A. // *Nutricion Hospitalaria.* 2012. V. 27. № 5. P. 1605–1609.
6. Osman K.A., Al-Humaid A.I., Al-Rehiyani S.M., Al-Redhaiman K.N. // *Food Control.* 2011. V. 22. Iss. 6. P. 947–953.
7. Xu T., Close D., Smartt A., Ripp S., Sayler G. // *Bioluminescence: Fundam. and Appl. in Biotechnol.* 2014. V. 1. P. 111–151.
8. Augustsson A., Uddh-Söderberg T., Filipsson M., Helmfrid I., Berglund M., Karlsson H., Hogmalm J., Karlsson A., Alriksson S. // *Environ Int.* 2017. V. 113. P. 269–280.
9. Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N. // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2015. V. 18. № 10. P. 952–959.
10. Esimbekova E.N., Kratasyuk V.A., Shimomura O. // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2014. V. 144. P. 67–109.

PRINCIPLES FOR CONSTRUCTION OF BIOLUMINESCENT ENZYME BIOTESTS FOR ANALYSIS OF COMPLEX MEDIA

V. P. Kalyabina, E. N. Esimbekova, I. G. Torgashina, K. V. Kopylova, V. A. Kratasyuk

Presented by Academician of the RAS I.I. Gitel'zon August 16, 2018

Received October 19, 2018

We formulated the principles of designing bioluminescent enzyme tests for assessing the quality of complex media which consist in providing the maximum sensitivity to potentially toxic chemicals at a minimal impact of uncontaminated complex media. The developed principles served as a basis for designing a new bioluminescent method for an integrated rapid assessment of chemical safety of fruits and vegetables which is based on using the luminescent bacterium enzymes (NAD(P)H:FMN oxidoreductase and luciferase) as a test system.

Keywords: bioluminescent method, complex media, food safety analysis, heavy metals, pesticides, luminous bacteria enzymes, enzyme tests.