

УДК 543.4+544.164+577.113+577.323+547.6+547.7

НОВАЯ МЕТОДИКА КОМПЛЕКСНОГО ФОТОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО МИКРОБИОТЕСТИРОВАНИЯ

В. С. Сибирцев^{1,*}, А. В. Гарабаджиу², академик РАН В. И. Швеиц^{2,3}

Поступило 22.06.2019 г.

Описаны методика биотестирования, предусматривающая регистрацию изменений интенсивностей упругого светорассеяния, светопоглощения и собственной фотофлуоресценции белковой составляющей, а также определение концентрации и коэффициентов структуризации геномной составляющей образцов с жизнеспособными одноклеточными тестовыми организмами, инкубируемыми в жидкой питательной среде в присутствии и в отсутствие различных внешних химических факторов. Представлены результаты анализа с помощью данной методики антибиотической активности катионов разных металлов. Показано, что с помощью данной методики можно существенно более экспрессно, объективно и комплексно, чем при использовании стандартных визуальных методов микробиотестирования, оценивать влияние на скорость размножения, метаболическую активность и структуру генома тестовых организмов образцов различной продукции, отходов и т.п.

Ключевые слова: биотестирование микробиологическое, геномный анализ, токсикобезопасность, антибиотическая активность.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524896641-645>

Как уже говорилось [1], разработка методов экспрессного биотестирования различной продукции, отходов и т.п. является весьма актуальной задачей. Вследствие этого исходя из результатов исследований свойств различных ДНК-флуорофоров, представленных в работе [1], а также многолетних авторских наработок по различным способам инструментального биотестирования, описанных, в частности, в работах [2–13], авторские права на которые защищены рядом патентов [14, 15], нами была разработана следующая методика оптического белково-геномного биотестирования.

Сначала готовится тестовая среда (ТС), представляющая собой водный раствор, содержащий достаточное количество жизнеспособных одноклеточных тестовых организмов (ТО), а также веществ, необходимых для поддержания их жизнедеятельности. Затем эта ТС разливается в измерительные ёмкости (ИЕ). Далее в каждую из тестовых ИЕ добавляется также определённое количество тестируемого фактора (ТФ, в качестве которого могут выступать не только различные образцы жидкой, твёрдой или газообразной продукции, но и пробы, взятые возле

источников выбросов или на территориях, экологическое состояние которых требуется оценить, и т.п.). После чего все ИЕ, включая как тестовые (содержащие ТС + ТФ), так и контрольные (содержащие только ТС), инкубируются в течение нескольких часов при заданной температуре.

При этом перед началом и через каждые k часов такой инкубации у ТС, содержащейся в упомянутых ИЕ, регистрируются интенсивность упругого светорассеяния (I_{OD}), а также интенсивность светопоглощения и собственной фотофлуоресценции белковой составляющей (A_p и I_p). Плюс с помощью системы из нескольких синтетических флуорофоров со взаимодополняющими оптическими и комплексобразующими с ДНК свойствами оцениваются концентрация и коэффициенты структуризации геномной составляющей ТО (C_D , K_{SG1} и K_{SG2}). Причём, как будет показано ниже, все эти параметры могут быть определены с помощью всего лишь одного прибора (спектрофлуориметра среднего класса точности) с затратой всего нескольких минут на одно совместное определение I_{OD} , A_p , I_p , C_D , K_{SG1} и K_{SG2} , характеризующих разные аспекты влияния ТФ на ТО. А k может быть равно либо всему периоду инкубации (которая в зависимости от конечной цели анализа проводится до достижения ТО в ИЕ начальной, экспоненциальной либо стационарной фазы развития); либо части этого периода (в случае необходимости оценки влияния ТФ на динамику жизнедеятельности ТО во всех фазах развития последних).

¹Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок, филиал ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбунова Российской Академии наук, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный технологический институт

³МИРЭА — Российский технологический университет

*E-mail: vs1969r@mail.ru

Затем общую степень активирования или ингибирования (+/–) ТФ жизнедеятельности ТО через k часов их инкубирования рассчитывают по формуле

$$\varepsilon_{M,k} = (\varepsilon_{Iod,k} + \varepsilon_{Ap,k} + \varepsilon_{Ip,k} + \varepsilon_{Cd,k})/4,$$

а меру влияния ТФ на структуру генома ТО определяют как

$$m_{G,k} = (m_{Ksg1,k} + m_{Ksg2,k})/2.$$

Здесь

$$\varepsilon_{i,k} = 100(\Delta Y_{T,i,k} - \Delta Y_{C,i,k})/\Delta Y_{C,i,k},$$

$$m_{i,k} = 100(\Delta Z_{T,i,k} - \Delta Z_{C,i,k})/\Delta Z_{C,i,k},$$

а

$$\Delta Y_{i,k} = N \sum_j (Y_{k,i,j} - Y_{0,i,j})/Y_{0,i,j}$$

и

$$\Delta Z_i = N \sum_j (Z_{k,i,j} - Z_{0,i,j})/Z_{0,i,j}$$

— средние по выборке из $j = 1, 2, \dots, N$ параллельных ИЕ (содержащих одинаковое количество ТФ в одинаковых ТС) разности значений Y_i параметров (таких как I_{OD} , A_p , I_p и C_D) и Z_i коэффициентов (таких как K_{SG1} и K_{SG2}) вначале (Y_0 и Z_0) и через k часов (Y_k и Z_k) инкубирования ТС в присутствии ТФ (ΔY_T и ΔZ_T в тестовых ИЕ) и в их отсутствие (ΔY_C и ΔZ_C в контрольных ИЕ).

При этом следует учитывать, что как ε , так и m определяются во всех случаях исключительно в процентах по отношению к контрольным ИЕ (содержащим те же ТС, что и тестовые ИЕ, но без ТФ). А для определения таких параметров ТС, как C_D , K_{SG1} и K_{SG2} , может быть использована система из таких флуорофоров, как Hoechst-33258 (Ht) и этидий бромид (ЕБ). При этом Ht присоединяется к молекуле ДНК “снаружи” и предпочтительно специфичен к участкам её двойной спирали, содержащим три последовательно расположенных аденино-тиминовых и одну гуанино-цитозиновою пары оснований. Этидия бромид представляет собой интеркалятор, прослаивающийся между двумя парами оснований двойной спирали ДНК и специфичный в основном к вторичному и более высоким порядкам организации её молекулы (хотя и с некоторым предпочтением к участкам ДНК, богатым гуанином и цитозином). И с помощью Ht и ЕБ определение C_D , K_{SG1} и K_{SG2} у ТС может быть следующим.

После измерения I_{OD} , A_p и I_p в исходной пробе ТС из ИЕ часть этой пробы обрабатывается лизирующей смесью (для разрушения клеточных стенок и мембран, обеспечивающего доступ используемых

флуорофоров к внутриклеточной ДНК). Затем производится разбавление обработанной части пробы (в 10 раз или более), буферирование её (по pH, ионной силе и т.п.) и разделение на ещё три равных части.

Далее определяется концентрация ДНК в ТС (C_D) по следующим этапам. Для этого производится измерение при длинах волн возбуждения и эмиссии $\lambda_{EX} = 350$ и $\lambda_{EM} = 455$ нм фоновой интенсивности флуоресценции первой части пробы (I_{F0}) и Ht (I_{F1}); измерение при тех же λ_{EX} и λ_{EM} интенсивности флуоресценции первой части пробы после добавления к ней Ht (I_D) и последующего добавления стандартной ДНК (I_{SD}); и вычисление $C_D = C_{DH} = aC_{SD}(I_D - I_{F0} - I_{F1})/(I_{SD} - I_D)$, где C_{SD} и a — соответственно концентрация стандартной ДНК в первой части пробы и разбавление последней относительно исходной.

Параметр C_{DE} определяется аналогично C_{DH} , но со второй частью пробы, флуорофором ЕБ вместо Ht и при $\lambda_{EX} = 520$ и $\lambda_{EM} = 605$ нм. После чего по формуле $K_{SG1} = C_{DE}/C_{DH}$ вычисляется первый коэффициент геномной структуризации ТС. При этом изменение значения K_{SG1} (относительно ТС, содержащейся в контрольных ИЕ, либо начала инкубации анализируемых ИЕ) должно отражать изменения в характере третичного и более высоких порядков организации структуры генома ТО, содержащихся в анализируемой ТС (поскольку ЕБ к ним существенно более специфичен, чем Ht).

И наконец при $\lambda_{EX} = 350$ и $\lambda_{EM} = 605$ нм определяется интенсивность флуоресценции второй части пробы после добавления к ней Ht (I_{F3}) и последующего добавления ЕБ (I_R). После чего по формуле $K_{SG2} = (I_R - I_{F3})/C_{DH}$ вычисляется второй коэффициент геномной структуризации ТС. При этом изменение значения K_{SG2} также должно отражать изменения в характере первичного и более высоких порядков организации структуры генома ТО, однако иным, чем в случае K_{SG1} , образом (поскольку значение K_{SG2} зависит от эффективности резонансного переноса энергии между Ht и ЕБ, которая, в свою очередь, будет тем большей, чем ближе друг к другу будут специфически сорбировавшиеся на ДНК молекулы упомянутых флуорофоров).

С помощью этой методики мы оценивали токсикобезопасность различных отходов человеческой жизнедеятельности (включая отработанные буровые растворы до и после их очистки), а также про- и антибиотические свойства многих видов продукции, веществ и материалов (включая различные нефтепродукты, лекарственные препараты, более 100 ви-

дов эфирных масел и иных экстрактов, промышленно получаемых из различного растительного сырья, в том числе с использованием в качестве экстрагента сжиженного углекислого газа, и многое другое). Однако в данной работе в качестве примера конкретной реализации описанной методики нам бы хотелось представить результаты проведённой нами сравнительной оценки влияния на жизненную активность разных представителей природной микрофлоры наиболее устойчивых ионных форм таких металлов, как Al, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Sn, Hg, Pb и Bi. Эти металлы были выбраны нами в качестве объектов анализа потому, что они являются одними из наиболее распространённых и устойчивых антропогенных поллютантов, а, кроме того, способны быть доступными и эффективными регуляторами активности любого живого организма (вследствие того, в частности, что многие из упомянутых металлов входят в состав реакционных и регуляторных центров большинства ферментов, а другие металлы способны первые в этих центрах замещать).

В ходе описываемого исследования для большей его репрезентативности в качестве ТО мы использовали таких типичных представителей разных таксономических групп, как *Escherichia coli*, *Rhodotorula glutinis* и *Chlorella vulgaris*, а в качестве ТС — раствор с pH $7,2 \pm 0,2$, содержащий 20 г/л сахарозы + 3 г/л NH_4NO_3 + 1 г/л KH_2PO_4 + 1 г/л NaH_2PO_4 + 1,5 г/л $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ + 0,3 г/л $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, приготовленный на основе стерилизованной природной воды (содержащей в необходимых количествах все микроэлементы, нужные для поддержания жизнедеятельности ТО). Все ТО инкубировали в этой ТС в присутствии и в отсутствие ТФ в течение 7 ч при 30 °С. А все оптические измерения производили с помощью спектрофлуориметра “СМ 2203” (Беларусь). При этом для всех ТО C_D , K_{SG1} и K_{SG2} определяли, как описано выше (с добавлением к 1 мл анализируемой пробы в качестве “внутреннего стандарта”; 0,02 мл водного раствора, содержащего 60 мкг/мл ДНК тимуса телёнка, обработанного предварительно для гомогенизации ультразвуком в течение 15 с при силе тока 0,3 А на резонансной частоте 22 кГц), A_p опре-

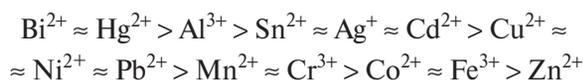
Таблица 1. Степень ингибирования жизнедеятельности (ϵ_M , %) и влияния на структуру генома (m_G , %) разных представителей природной микрофлоры разных концентраций катионов различных металлов

| Катион | Mn ²⁺ | Cr ³⁺ | Fe ³⁺ | Co ²⁺ | Zn ²⁺ | Mn ²⁺ | Cr ³⁺ | Fe ³⁺ | Co ²⁺ | Zn ²⁺ |
|--------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Концентрация | 0,03 М | | | | | 0,01 М | | | | |
| <i>E. coli</i> | -83 +42 | -80 +42 | -64 +36 | -69 +38 | -32 +19 | -17 +9 | -16 +10 | -8 +5 | -9 +5 | -2 +1 |
| <i>R. glutinis</i> | -80 +40 | -79 +40 | -46 +31 | -52 +27 | -27 +18 | -15 +8 | -14 +9 | -5 +3 | -8 +5 | +1 0 |
| <i>C. vulgaris</i> | -77 +39 | -78 +39 | -23 +12 | -43 +25 | -20 +14 | -12 +8 | -13 +7 | +10 -5 | -4 +2 | +3 -1 |
| Катион | Ni ²⁺ | Cu ²⁺ | Al ³⁺ | Ag ⁺ | Cd ²⁺ | Sn ²⁺ | Hg ²⁺ | Pb ²⁺ | Bi ²⁺ | |
| Концентрация | 0,0008 М | | | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | -48 +28 | -78 +40 | -96 +46 | -89 +45 | -82 +44 | -93 +45 | -93 +44 | -55 +32 | -90 +45 | |
| <i>R. glutinis</i> | -54 +31 | -48 +28 | -89 +42 | -52 +30 | -59 +35 | -59 +31 | -91 +44 | -57 +34 | -93 +44 | |
| <i>C. vulgaris</i> | -60 +33 | -41 +25 | -88 +43 | -70 +37 | -85 +43 | -70 +36 | -95 +45 | -75 +38 | -99 +45 | |
| Катион | Ni ²⁺ | Cu ²⁺ | Al ³⁺ | Ag ⁺ | Cd ²⁺ | Sn ²⁺ | Hg ²⁺ | Pb ²⁺ | Bi ²⁺ | |
| Концентрация | 0,0002 М | | | | | | | | | |
| <i>E. coli</i> | -20 +12 | -32 +18 | -68 +38 | -52 +30 | -47 +27 | -56 +31 | -85 +45 | -22 +13 | -89 +45 | |
| <i>R. glutinis</i> | -24 +14 | -18 +11 | -41 +23 | -31 +18 | -23 +15 | -26 +15 | -78 +42 | -21 +12 | -81 +43 | |
| <i>C. vulgaris</i> | -26 +13 | -13 +8 | -64 +35 | -43 +24 | -51 +28 | -30 +18 | -80 +42 | -16 +9 | -86 +44 | |

Примечания. В каждой числовой ячейке таблицы сверху указаны значения ϵ_M , а снизу m_G , определявшиеся через 7 ч инкубирования ТО с ТФ (для более “тонкой” оценки влияния ТФ на динамику жизнедеятельности ТО ϵ_M во всех случаях определялись нами через каждый час инкубирования ИЕ, но вследствие ограниченности объёма сообщения здесь эти данные не показаны). При этом относительная ошибка определения ϵ_M и m_G для всех их значений находилась в диапазоне от 10 до 20%.

деляли фотометрически при длине волны $\lambda = 330$ нм, а I_{OD} — нефелометрически (как кажущуюся интенсивность резонансной флуоресценции ТС) при $\lambda = 520$ нм. В то же время I_p определяли для *E. coli* при $\lambda_{EX} = 375$ и $\lambda_{EM} = 465$ нм, для *C. vulgaris* — при $\lambda_{EX} = 375$ нм и $\lambda_{EM} = 685$ нм, а для *R. glutinis* I_p не определяли (поскольку клеточная стенка этих ТО эффективно гасит их собственную белковую флуоресценцию).

Основные результаты этого исследования приведены в табл. 1. Отсюда видно, что в целом по степени убывания ингибирующей активности в отношении ТО (выражающейся в уменьшении скорости размножения ТО, характеризуемой величинами ϵ_{Iod} и ϵ_{Cid} ; снижении метаболической активности ТО, характеризуемой величинами ϵ_{Ap} и ϵ_{Ip} , а также в более выраженном изменении пространственной структуры генома ТО в ходе их жизнедеятельности в присутствии ТФ по сравнению с таковым в отсутствие ТФ, характеризуемом величинами m_{Ksg1} и m_{Ksg2}) исследованные ионные формы металлов можно выстроить в следующий ряд:



(учитывая, однако, что в зависимости от вида и штамма ТО порядок металлов в этом ряду может в некоторой степени меняться, что особенно отчетливо видно на примере влияния на жизнедеятельность *E. coli* и *C. vulgaris* ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} и Zn^{2+}).

Таким образом, мы видим, что с помощью представленной в настоящей работе методики биотестирования, используя всего лишь один измерительный прибор среднего класса точности, можно существенно более экспрессно, объективно и информативно, чем при использовании стандартных визуальных методов микробиотестирования, оценивать влияние на скорость размножения, метаболическую активность и структуру генома ТО (в том числе пространственную) образцов различной продукции, отходов и т.п. А это, в свою очередь, сможет повысить качество и безопасность жизни людей, потребляющих упомянутую продукцию, проживающих вблизи возможных источников загрязнения окружающей среды и т.п.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сибирцев В.С., Гарабаджиу А.В., Швец В.И. Флуоресцентные ДНК-зонды: исследование свойств и способов применения // ДАН. 2019. Т. 489. № 5. С. 530–534.

2. Сибирцев В.С. Флуоресцентные ДНК-зонды: исследование механизмов изменения спектральных свойств и особенностей практического применения // Биохимия. 2007. Т. 72. № 8. С. 1090–1106.
3. Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S. Leukopenia Prognosis by Radiation Therapy of Patients with Hodgkin's Disease // Experim. and Clinic. Cancer Res. 1997. V. 16. № 2. P. 183–188.
4. Ivanov S.D., Korytova L.I., Yamshanov V.A., Ilyn N.V., Sibirtsev V.S. Leukopenia Prognosis during Radiation Therapy in Patients with Hodgkin's Disease // Experim. and Clinic. Cancer Res. 1997. V. 16. № 4. P. 413–418.
5. Иванов С.Д., Коваленко А.Л., Кованько Е.Г., Ямшинов В.А., Акимов А.А., Забежинский М.А., Сибирцев В.С. Применение циклоферона при экспериментальной лучевой терапии опухолей // Вопросы онкологии. 1999. Т. 45. № 3. С. 292–297.
6. Сибирцев В.С., Тындык М.Л., Иванов С.Д. Особенности индивидуальных реакций дезактивации бенз(а)пирена у крыс в зависимости от режима поступления канцерогена в организм // Вопросы онкологии. 2000. Т. 46. № 5. С. 594–599.
7. Сибирцев В.С. Изучение возможностей применения к анализу ДНК бифункциональной системы: бромид этидия + Хехст-33258 // Биохимия. 2005. Т. 70. № 4. С. 545–555.
8. Сибирцев В.С. Методики биотестирования на основе флуорометрического геномного анализа // Оптический журн. 2017. Т. 84. № 11. С. 84–89.
9. Сибирцев В.С., Волкова К.В., Хайдаров А.Х., Чан Тхань Туан, Строев С.А., Радин М.А. Исследование биодеградации, а также антимикробных свойств поливинилхлоридных плёнок с добавками пектина и крахмала // Науч.-техн. вестн. информационных технол., механики и оптики. 2018. Т. 18. № 1. С. 43–49. DOI: 10.17586/2226-1494-2018-18-1-43-49.
10. Сибирцев В.С. Применение фотолюминесцентных методик для изучения динамики структуры белков в водных растворах // Науч.-техн. вестн. информ. технол., механики и оптики. 2019. Т. 19. № 1. С. 27–32. DOI: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-27-32.
11. Сибирцев В.С., Строев С.А. Оптико-электрохимическая микробиотестовая система оценки токсической безопасности нефтепродуктов // Науч.-техн. вестн. информ. технол., механики и оптики. 2019. Т. 19. № 1. С. 74–81. DOI: 10.17586/2226-1494-2019-19-1-74-81.
12. Сибирцев В.С., Маслова А.Ю. Комплексное исследование динамики жизнедеятельности *E. coli* в присутствии ионов переходных металлов // Науч.-техн. вест. информ. технол., механики и оптики. 2019. Т. 19. № 2. С. 236–241. DOI: 10.17586/2226-1494-2019-19-2-236-241.

13. *Сибирцев В.С., Маслова А.Ю., Марченко А.А., Радин М.А.* Исследование про- и антибиотического влияния слабых электромагнитных полей мегагерцового диапазона // *Эпоха науки*. 2019. № 17. С. 150–154. DOI: 10.24411/2409-3203-2018-11730.
14. *Сибирцев В.С., Красникова Л.В., Гарабаджиу А.В.* Способ оценки про- и антимикробных свойств проб. Патент РФ № 2688117; зарег. в гос. реестре изобрет. 17.05.2019, бюлл. № 14; приоритет от 12.04.2018.
15. *Сибирцев В.С., Щемелинина Т.Н., Куприна Е.Э., Гарабаджиу А.В.* Способ определения токсичности проб. Патент РФ № 2688745; зарег. в гос. реестре изобрет. 22.05.2019, бюлл. № 15; приоритет от 25.06.2018.

NEW METHOD OF COMPLEX PHOTO-FLUORESCENT MICROBIOTESTING

V. S. Sibirtsev¹, A. V. Garabadgiu², Academician of the RAS V. I. Shvets^{2,3}

¹*ARRI Food Additives, a Branch of the FSC for Food Systems Named after V.M. Gorbatov,
Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation*

²*Saint-Petersburg State Technological Institute (Technical University),
Saint-Petersburg, Russian Federation*

³*MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russian Federation*

Received June 22, 2019

The biotesting procedure is described, which provides for recording changes in the intensities of elastic light scattering, light absorption and intrinsic photofluorescence of the protein component, as well as determination of concentration and structuring coefficients of the genomic component of samples with viable unicellular test organisms, incubated in a liquid nutrient medium in the presence and absence of various external chemical factors. The results of the analysis using this technique of the antibiotic activity of cations of various metals are presented. It is shown that using this technique can be much more rapid, objectively and comprehensively than using standard visual microbiotesting methods, to assess the effect on reproduction rate, metabolic activity and genome structure of test organisms of samples of various products, wastes, etc.

Keywords: microbiological biotesting, genomic analysis, toxic safety, antibiotic activity.