

ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ СИСТЕМЫ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

Кириллова М. А.

научный руководитель канд. биол. наук Есимбекова Е. Н.

Сибирский федеральный университет

Одним из основных показателей санитарного качества продуктов питания, воды, а также чистоты поверхностей является микробная загрязненность. В настоящее время для определения микробной загрязненности широко используют микробиологические методы посева бактериальных клеток на питательные среды (чашечный метод Коха, метод предельных разведений). Также получили распространение методы, основанные на определении какого-либо физико-химического параметра образца, абсолютная величина которого или ее изменение пропорциональны количеству колонеобразующих единиц (КОЕ). Одним из них является билюминесцентный метод, основанный на измерении концентрации микробного АТФ в анализируемом образце при помощи люциферин-люциферазной системы светляков. Наряду с билюминесцентной системой светляков существует биферментная система светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза, которая применяется в биотестировании для анализа химического загрязнения, однако для определения степени микробного загрязнения она не используется. Одним из субстратов данной системы является флаavinмоноклеотид (FMN), который представляет собой кофермент некоторых флаvинзависимых ферментов, присутствующих во всех живых клетках. Таким образом, измеряя концентрацию FMN, можно определить количество бактериальных клеток в образце.

Целью данной работы было разработать метод анализа микробного загрязнения с использованием билюминесцентной системы светящихся бактерий, основанный на определении количества FMN в образце.

В работе использовали лиофилизированный препарат высокоочищенных ферментов, содержащий люциферазу из рекомбинантного штамма *Escherichia coli* и NADH:FMN-оксидоредуктазу из *Vibrio fischeri*. Для достижения максимальной чувствительности биферментной системы светящихся бактерий к FMN варьировали концентрации ферментов и субстратов в реакционной смеси. Показано, что максимальная чувствительность биферментной системы к FMN достигается при использовании следующей реакционной смеси: 300 мкл 0,05 М калий фосфатного буфера pH 6,8, 5 мкл раствора ферментов, 50 мкл 0,0025 % раствора тетрадеканала, 50 мкл 0,25 мМ раствора NADH. Концентрацию FMN варьировали в диапазоне от 0,5 нМ до 1 мкМ. Регистрацию интенсивности свечения проводили на билюминометре LUMAT LB 9507 (Berthold Technology, Германия).

Максимальная чувствительность биферментной системы светящихся бактерий к FMN составила 1,2 нМ (рис. 1), линейный отклик системы находится в диапазоне от 10 мкМ до 1,2 нМ.

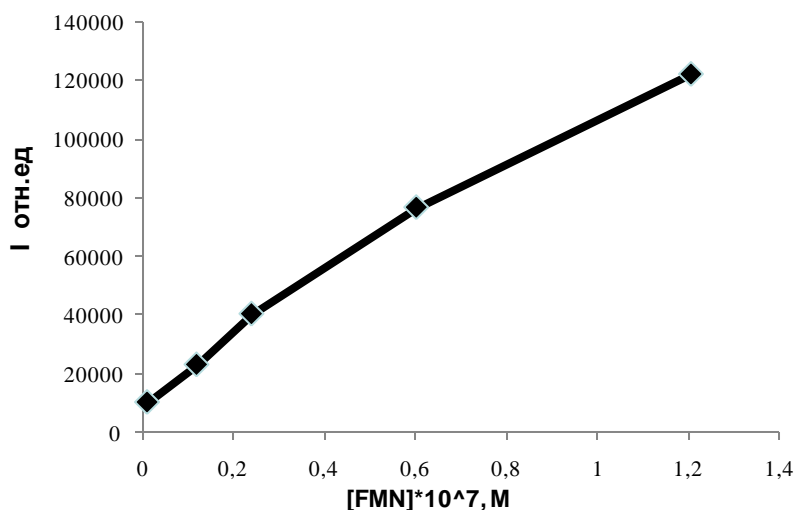


Рисунок 1. Зависимость интенсивности свечения биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза от количества FMN в реакционной смеси.

В качестве исследуемого объекта были использованы клетки *Escherichia coli* (штамм BL21 codon Plus (DE3) RIPL) в стационарной фазе роста, выращенные в лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН на среде LB при 30°C в течение 18 ч. Титр клеток *E. coli* в исходной культуре определяли по светорассеянию при 590 нм, принимая, что 1 единица оптической плотности соответствует $5 \cdot 10^8$ кл/мл. Для проведения анализа использовали три образца: образец №1 - интактные клетки, образец №2 - клетки, разрушенные ультразвуковым дезинтегратором при частоте 44 кГц, образец №3 - надосадочная жидкость после центрифугирования разрушенных клеток (5000 об/сек, 12 мин).

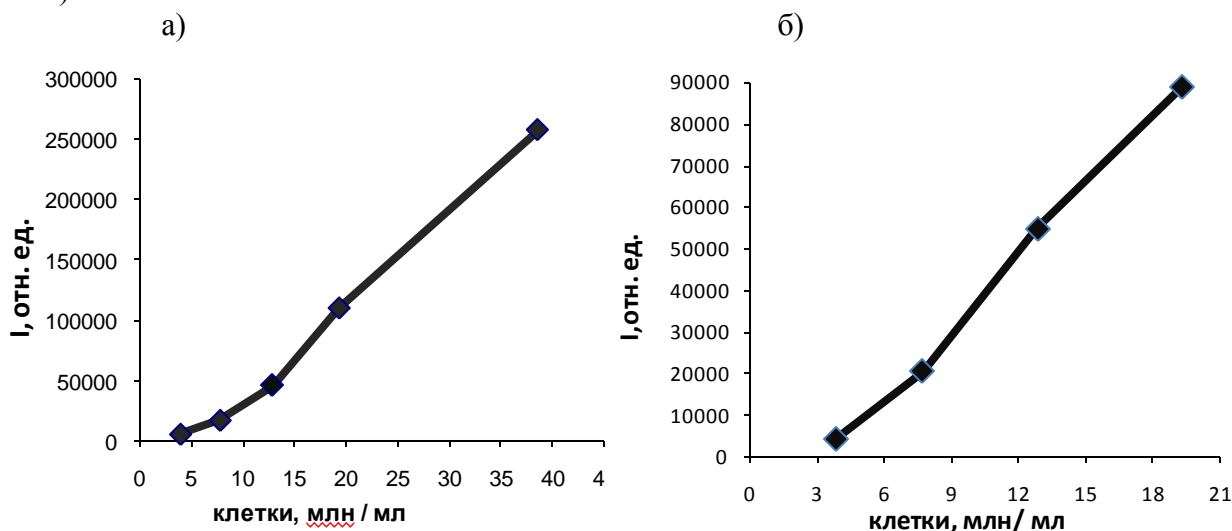


Рисунок 2. Зависимость интенсивности свечения от количества бактериальных клеток а) образец № 2, б) образец № 3.

При добавлении первого образца в реакционную смесь интенсивность свечения биферментной системы не превышала фонового значения, то есть значения интенсивности свечения в отсутствие FMN в реакционной смеси. При добавлении

второго и третьего образцов интенсивность свечения зависела от количества бактериальных клеток (рис.2). Порог чувствительности определяли как количество клеток, при котором интенсивность свечения биферментной системы в присутствии образца в 3 раза превышала интенсивность фонового свечения. Максимальная чувствительность биолюминесцентной системы при этом составила примерно 3,9 и 5 млн. бактериальных клеток для второго и третьего образцов соответственно. Таким образом, для достижения наибольшей чувствительности биферментной системы, бактериальные клетки достаточно разрушить ультразвуковым дезинтегратором.

Согласно санитарным правилам и нормам, установленным в Российской Федерации (СНиП 2.3.2.560-96. Гигиенические требования к качеству и безопасности продовольственного сырья и пищевых продуктов), количество микроорганизмов для отдельных продуктов питания не должно превышать порядка ста тысяч КОЕ/г. В работе определен порог чувствительности биферментной системы светящихся бактерий порядка четырех миллионов КОЕ/г.

Таким образом, в работе показано, что чувствительности биферментной системы недостаточно для определения бактериальной обсемененности пищевых продуктов на уровне, установленном санитарными правилами и нормами. По сравнению с биолюминесцентной системой светляков чувствительность биферментной системы к бактериальному загрязнению ниже на 3 порядка. Для достижения необходимого уровня чувствительности необходимо проведение дополнительных исследований.

Работа поддержана Правительством Российской Федерации в рамках государственной программы по привлечению ведущих ученых в российские учреждения высшего профессионального образования (контракт No 11. G34.31.058) и Федеральным агентством по науке и инновациям (контракт No 02.740.11.0766).