

Дроздова Е.А., Каримов И.Ф.
Оренбургский государственный университет
E-mail: drozdova15@mail.ru

ВЛИЯНИЕ НОРМАЛЬНОГО КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА РУБЦОВОЙ ЖИДКОСТИ НА УРОВЕНЬ СВЕЧЕНИЯ БИОСЕНСОРА

Рассмотрено влияние реальной (нативная) рубцовой жидкости и модельной смеси на уровень свечения люминесцентного штамма *E. coli*. Выявлены сходные токсические эффекты изучаемых биологических жидкостей, развивающиеся в первые минуты контакта. Проанализировано влияние отдельных компонентов рубцовой жидкости на свечение бактерий, а также вклад отдельных компонентов трофического субстрата.

Ключевые слова: биосенсор, биотоксичность, рубцовая жидкость, рекомбинантный штамм *E. coli* K12 TG1, субстрат

Биолюминесценция – это ферментативный процесс, сопровождающийся потреблением кислорода и выделением света [1]. У микроорганизмов центральным звеном подобной реакции является люцифераза – флавинозависимая монооксигеназа, катализирующая окисление восстановленного флавиномононуклеотида и длинноцепочечного альдегида в присутствии кислорода до флавиномононуклеотида, воды и соответствующей жирной кислоты с испусканием кванта света в видимой сине-зеленой области спектра [2].

Высокая степень сопряженности биолюминесценции с основными энергетическими потоками в бактериальной клетке [3] явилась условием для использования светящихся микроорганизмов при тестировании различных природных сред, биотоксичность которых может быть интегрально оценена через изменение интенсивности биолюминесценции [4], [5]. Исходя из этих предпосылок на основе лиофилизированных светящихся бактерий и выделенной из них люциферазной ферментной системы предложен ряд методов экспрессного биолюминесцентного анализа.

В настоящее время для решения проблем анализа токсичности сред сложного состава привлекается метод под названием биотестирование. Данный метод состоит в определении токсичности среды непосредственно при действии ее на живой организм [6].

В качестве материала для исследования выбрана рубцовая жидкость мясного крупного рогатого скота казахской белоголовой породы; модельная рубцовая жидкость, полученная на основе фосфатного буфера, пропионовой, молочной, масляной, уксусной кислот, глюкозы и 10-% раствора аммиака; трофические субстра-

ты на основе пшеничных отрубей, экструдированных с добавлением Ca^{2+} , Cr^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} или обработанные сверхвысокочастотными волнами (СВЧ) и ультразвуком (УЗ) [7]. Следует отметить, что рубцовую жидкость получали путем фильтрации цельного рубцового содержимого через четыре слоя марли, затем в отфильтрованную рубцовую жидкость добавляли несколько капель 20% раствора формалина для фиксации. Для проведения опыта *in vitro* за основу нами была взята методика исследования переваримости сухого вещества оцениваемых кормов *in vitro* В. В. Попова и Е. Т. Рыбиной в модификации Г. И. Левахина и А. Г. Мещерякова. При этом в каждый из контейнеров «искусственного рубца» вносили по 128 мл рубцовой жидкости и 500 мг трофического субстрата и инкубировали в течение 24 часов при 37 °С, при этом временной интервал отбора проб составлял 3, 6, 12 и 24 часа.

При проведении исследований использован рекомбинантный штамм *E. coli* K12 TG1 с клонированными *luxCDABE* генами *Photobacterium leiognathi* 54D10, выпускаемый в виде лиофилизованного препарата под коммерческим названием «Эколюм-10». В соответствии с инструкцией во вскрытый флакон с лиофилизированными бактериями добавляли 10 мл дистиллированной воды. Полученную суспензию бактерий несколько раз встряхивали до однородного раствора. Данную суспензию выдерживали в холодильной установке при температуре от плюс 2°С до плюс 4°С в течение 30 мин, доводили температуру суспензий бактерий от плюс 22°С до плюс 24°С, держа при этом флакон в защищенном от солнца месте.

Перед экспериментом суспензию бактерий во флаконе встряхивали.

Измерение люминесценции сенсорного штамма *E.coli* осуществляли с помощью биолюцинометра LM-01T, при этом в лунки планшета вносили 225 мкл испытуемого агента и 25 мкл бактерий, после чего измеряли кинетику свечения в течение 30 минут. Ключевым моментом является внесение во все пробы одинаковых количеств суспензии бактериального биосенсора и их быстрое смешивание, исключая лимитирование люминесцентной реакции по кислороду.

Окончательную обработку результатов измерений токсичности выполняли путем расчета среднеарифметического значения величины биолюминесцентного индекса (БЛИ) по формуле:

$$БЛИ = \frac{I_n^{опыт} \cdot I_0^{контр}}{I_0^{опыт} \cdot I_n^{контр}},$$

где $I_n^{опыт}$ – уровень люминесценции опытной пробы на n-минуте;

$I_0^{опыт}$ – уровень люминесценции опытной пробы на 0-минуте;

$I_n^{контр}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на n-минуте;

$I_0^{контр}$ – уровень люминесценции контрольной пробы на 0-минуте.

По окончании исследований полученные результаты были нами обработаны методами статистического анализа с определением средней арифметической величины, ошибки средней арифметической и стандартного отклонения.

В соответствии с поставленной целью, в ходе первого эксперимента оценивалось формирование возможной биотоксичности нативной рубцовой жидкости, при этом в качестве контроля была взята суспензия рекомбинантного люминесцирующего штамма *E. coli* в физиологическом растворе (рисунок 1).

В начале эксперимента по изучению влияния нативной рубцовой жидкости на биолюминесценцию репортёрного штамма *E. coli*, наблюдалась индукция бактериальной биолюминесценции, начинающаяся с середины опыта. Однако подобная ситуация нивелировалась к концу эксперимента.

Исходя из предварительных результатов эксперимента нативная рубцовая жидкость оказала выраженное ингибирующее действие на

рекомбинантный штамм *E.coli*, характеризующееся резким тушением свечения уже в первые минуты контакта. Вероятной причиной такого явления может быть влияние на бактериальную биолюминесценцию какого-либо одного или нескольких компонентов, входящих в состав рубцовой жидкости, а именно наличием высокой концентрации ионов водорода в среде, воздействующих на мембраны бактериальных клеток и вызывающих протонирование молекул фосфолипидов и белков, что нарушает транспорт веществ и активность дыхательных ферментов.

Чтобы подтвердить или опровергнуть данное предположение, на следующем этапе работы нами использована модельная смесь (модельная рубцовая жидкость). Анализируя данные о влиянии отдельных компонентов модельной рубцовой жидкости на рекомбинантный штамм *E. coli*, можно сделать предварительный вывод, что меньшая степень токсичности в отношении бактериальных клеток связана, по всей видимости, с отсутствием в ее составе полного спектра веществ, включая ферменты и антимикробные пептиды.

С целью идентификации компонентов, оказывающих ингибирующее воздействие на уровень свечения рекомбинантного штамма *E.coli* нами были изучены эффекты пропионовой, молочной, масляной, уксусной кислот, глюкозы и 10-% раствора аммиака. При этом зарегистрировано, что раствор аммиака и уксусная кислота проявляли выраженное прогрессирующее подавление интенсивности свечения штамма биосенсора. С другой стороны, пропионовая, масляная и молочная кислоты проявляли менее выраженное токсическое действие, что обусловлено наличием более длинного углеводородного хвоста, ослабляющего кислотные свойства данных молекул.

Иной характер имела глюкоза, проявляющая стимуляцию свечения, что вероятно, связано с тем, что глюкоза является трофическим субстратом для бактериальных клеток, вследствие чего регистрируется развивающееся во времени увеличение интенсивности свечения.

Полученные результаты явились отправной точкой для серии экспериментов, целью которых стало изучение влияния отдельных компонентов трофического субстрата на динамику формирования биотоксичности в условиях «искусственного рубца».

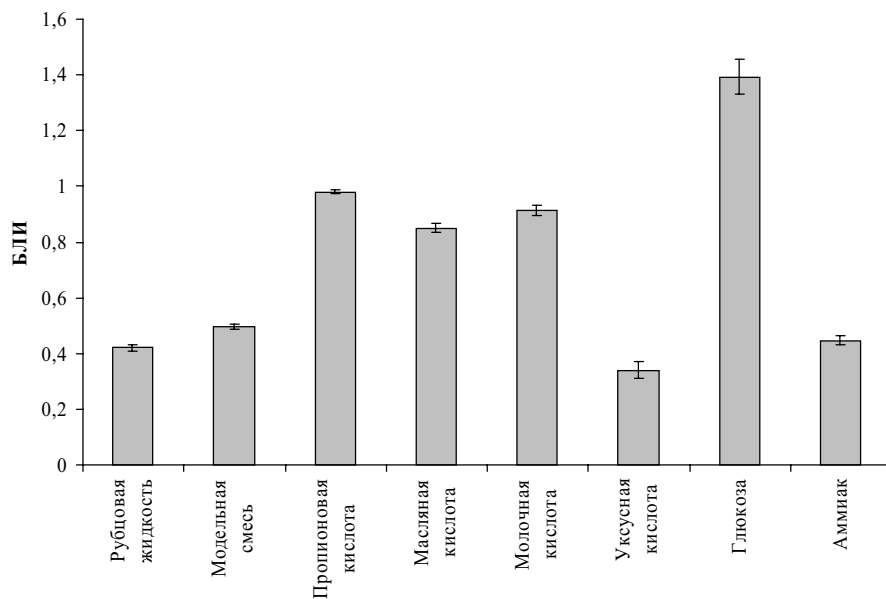


Рисунок 1. Оценка интегральной биотоксичности рубцовой жидкости и ее отдельных компонентов с использованием сенсорного штамма E.coli

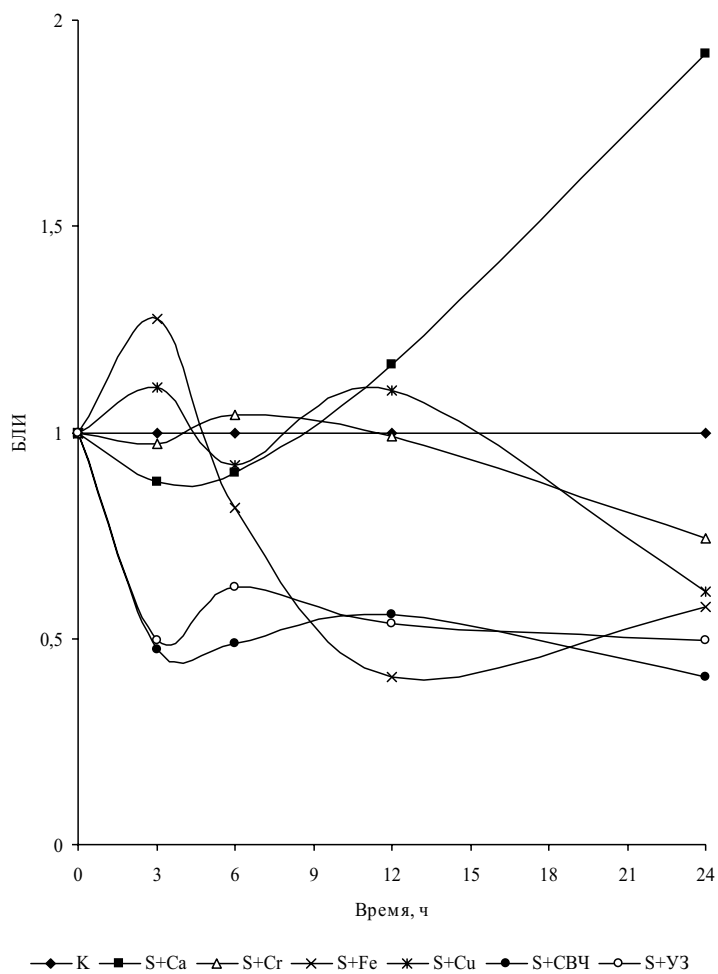


Рисунок 2. Влияние рубцовой жидкости в комплексе с кормовым субстратом и времени экспозиции на свечение сенсорного штамма E.coli

Анализируя вклад отдельных компонентов трофического субстрата в формирование биотоксичности рубцовой жидкости в условиях «искусственного рубца» с использованием рекомбинантного штамма *E. coli* можно отметить, что уже через 3 ч инкубации рубцовой жидкости формируется повышение уровня токсичности образцов, обработанных УЗ или СВЧ, при этом данный эффект сохраняется на протяжении всего времени (рисунок 2).

Наибольшее усиление биотоксичности рубцовой жидкости с кормовыми добавками оказывали ионы железа (II), максимальное ингибирующее воздействие которых зарегистрировано на 12 часах инкубации смеси и составляло 59,4% тушения свечения бактериального биосенсора. Подобный эффект связан со способностью металлов переменной валентности осуществлять процессы перекисного окисления липидов, что ведет к нарушению структуры мембраны клетки, а также образованию веществ, блокирующих активный центр люциферазы. С другой стороны, хром проявлял токсический эффект лишь после суток инкубации в системе, что свидетельствует о достаточной низкой токсичности данного металла в ионной форме, в

отличие от соединений с кислородом. В свою очередь медь (II) не оказывала сходного действия в связи с тем, что данный металл находится в максимальной окисленной форме и в существующей системе не способен отдать электрон. Противоположный эффект был зарегистрирован при действии на бактериальные биосенсоры рубцовой жидкости, инкубированной с ионами кальция, при этом наблюдалось зависимый от времени инкубации усиление свечения люминесцирующего штамма, что обусловлено не только принадлежностью данного металла к группе макроэлементов, но его способностью увеличивать степень перевариваемости кормов, подвергнутых экструзионной обработке.

Таким образом, были зарегистрированы сходные эффекты воздействия на бактериальную биолюминесценцию реальной и модельной рубцовой жидкости, при этом обе смеси проявляли токсическое действие. Полученные данные подтверждают возможность использования созданной нами модельной смеси для установления влияния отдельных компонентов рубцовой жидкости на биолюминесценцию рекомбинантного штамма *E. coli*.

28.03.2014

Список литературы:

1. Кратасюк, В.А. Использование светящихся бактерий в биолюминесцентном анализе [Текст] / В.А. Кратасюк, И.И. Гительзон // Успехи микробиологии. – 1987. – Т. 21. – С. 3.
2. Findley, S.D. Activity based metagenomic screening and biochemical characterisation of bovine protozoan glycoside hydrolases [Текст] / S.D. Findley, M.R. Mormile, A. Sommer-Hurley, X.C. Zhang, P. Tipton, K. Arnett, J.H. Porter, M. Kerley, G. Stacey // Appl. Environ. Microbiol. – 2011. – V 77. – P. 8106–8113.
3. Griffith, G.W. Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota [Текст] / G.W. Griffith, S. Baker, K. Fliiegerova, A. Liggenstoffer, M. van der Giezen, K. Voigt & G. Beakes // IMA Fungus 1. – 2010. – P. 181–185.
4. Huang, H. Diversity, abundance and characterisation of ruminal cysteine phytases suggest their important role in phytate degradation [Текст] / H. Huang, R. Zhang, D. Fu, J. Luo, Z. Li, H. Luo, P. Shi, P. Yang, Q. Diao, B. Yao // Environ. Microbiol. 13. – 2010. – P. 747–757.
5. Zoetendal, E.G. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota [Текст] / E.G. Zoetendal, M. Rajilic-Stojanovic & W.M. de Vos // Gut 11. – 2008. – P. 1605–1615.
6. McSweeney, C. Micro-organisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and future prospects [Текст] / C. McSweeney, R. Mackie // Commission on genetics resources for food and agriculture – FAO. – September 2012. – Background study paper NO. P. 61–62.
7. Дроздова, Е.А. Влияние трофических субстратов на интегральную и дифференциальную биотоксичность рубцовой жидкости / Е.А. Дроздова, И.Ф. Каримов, К.Г. Логачев // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 2013. – №2. – С. 58–61.

Сведения об авторах:

Дроздова Елена Александровна, доцент кафедры микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук
e-mail: drozdova15@mail.ru

Каримов Ильшат Файзелгаянович, доцент кафедры микробиологии химико-биологического факультета Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук
460018, Оренбург, пр. Победы, д. 13, корп. 16, ауд. 306, e-mail: ifkarimov@yandex.ru