

## **БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА МИКРОБНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ**

**Кириллова М. А.**

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

**Сибирский федеральный университет**

Традиционными методами анализа микробного загрязнения в микробиологии являются чашечный метод Коха, методы кратных и предельных разведений. Данные методы достаточно трудоемкие (занимают 24-72 часов), поэтому на их смену пришли более быстрые методы подсчета колонии. Наиболее распространенными являются биолюминесцентные методы анализа микробного загрязнения, использующие, главным образом, биолюминесценцию светляков и позволяющие с высокой чувствительностью определять степень бактериальной обсемененности пищевых продуктов, а также количество микроорганизмов в воде и воздухе. Принцип методов с использованием люциферазы светляков состоит в определении количества АТФ, пропорционального содержанию микробных клеток. Кроме люциферин-люциферазной системы светляков существует принципиальная возможность использования для анализа микробного загрязнения биолюминесцентной системы фотобактерий.

Цель данной работы - оценить возможность разработки метода анализа бактериального загрязнения на основе биолюминесцентной ферментативной системы светящихся бактерий

По аналогии с методом анализа микробного загрязнения на основе светляковой люциферазы биолюминесцентный анализ бактериального загрязнения с использованием ферментативной системы светящихся бактерий может быть основан на измерении в анализируемом образце таких важных соединений как флавинмононуклеотид (FMN) или никотинамиддинуклеотид (NADH). FMN и NADH представляют собой ключевые коферменты многих метаболических цепей в бактериальных клетках, и одновременно являются субстратами биферментной системы светящихся бактерий NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза. Таким образом, количество FMN или NADH в анализируемом образце, измеренное биолюминесцентным методом, будет пропорционально количеству бактериальных клеток.

Для достижения максимальной чувствительности биферментной системы к FMN и NADH в анализируемых образцах варьировали условия проведения анализа. Были найдены концентрации компонентов реакции (ферментов и субстратов), позволяющие определять минимальное содержание FMN в анализируемом образце. Для этого варьировали содержание NADH и ферментов в реакционной смеси, оставляя неизменным содержание FMN.

Максимальная чувствительность биферментной системы к FMN составила 1,2 нМ. Линейный отклик системы находится в диапазоне от 1,2 нМ до 10 мкМ FMN (рис. 1). Из литературных данных известно, что чувствительность биолюминесцентной системы светляков к АТФ составляет 0,01 пМ, что выше чувствительности биферментной системы светящихся бактерий к FMN на пять порядков.

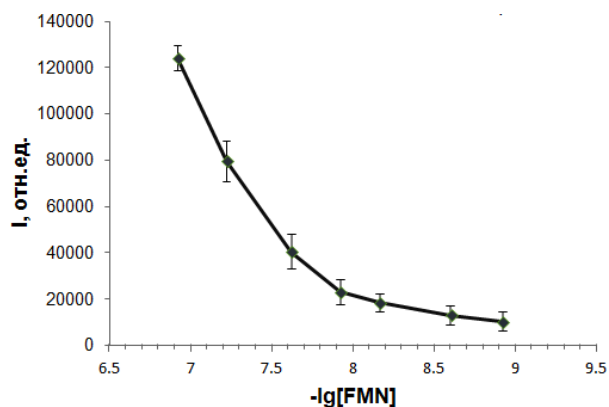


Рисунок 1 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза от концентрации FMN в реакционной смеси

Для обеспечения максимальной чувствительности биферментной системы к NADH были подобраны концентрации ферментов и субстратов, позволяющие определять минимальное содержание NADH в анализируемом образце. Для этого измеряли биолуминесцентный сигнал при добавлении 100 мкл 5 нМ раствора NADH и последовательном варьировании содержания FMN, тетрадеканалю или ферментов в реакционной смеси, оставляя неизменным содержание других компонентов.

При проведении данных исследований наблюдалось значительное фоновое свечение, то есть наличие биолуминесцентного сигнала в отсутствие NADH в реакционной смеси. В дальнейшем для уменьшения фонового свечения, реакционную смесь предварительно выдерживали в течение 6 минут, после чего запускали реакцию добавлением NADH различных концентраций.

В результате были выбраны оптимальные количества ферментов и субстратов в реакционной смеси, обеспечивающие максимальную чувствительность биферментной системы к NADH, которая составила 0,1 пМ. Линейный отклик системы находится в диапазоне от 0,1 пМ до 1 нМ (рис.2). Таким образом, чувствительность биферментной системы светящихся бактерий к NADH ниже чувствительности ферментативной системы светлячков к АТФ в 10 раз.

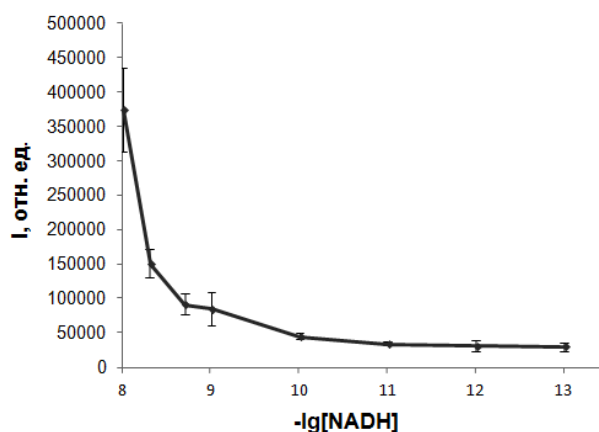


Рисунок 2 – Зависимость интенсивности свечения биферментной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза от концентрации NADH в реакционной смеси

В качестве модельного микробного образца для определения возможности использования билюминесцентной системы NADH:FMN-оксидоредуктаза-люцифераза в анализе степени биологического загрязнения использовали клетки *Escherichia coli*, разрушенные ультразвуковым дезинтегратором при частоте 44 кГц. Образцы добавляли по 10 мкл в реакционную смесь вместо раствора FMN или NADH. Для построения зависимости интенсивности свечения от количества клеток в образце клеточные суспензии разбавляли в 2, 3, 4, 5, 8, 10, 16 раз. Каждый раз перед добавлением анализируемого образца измерялось фоновое свечение.

При добавлении бактериальных клеток в реакционную смесь интенсивность свечения зависела от их количества как в случае определения FMN, так и NADH. Предел чувствительности определяли как количество клеток, при котором интенсивность свечения биферментной системы в присутствии образца в 3 раза превышала интенсивность фонового свечения.

Максимальная чувствительность билюминесцентной системы составила 3,9 млн. и 800 тыс. бактериальных клеток при анализах, основанных на определении содержания FMN и NADH соответственно. По сравнению с билюминесцентной системой светляков, предел обнаружения которой составляет 1000 клеток/мл, система светящихся бактерий слабее по чувствительности на три и два порядка при использовании методик, основанных на количественном анализе содержания FMN и NADH соответственно. Таким образом, в качестве определяемого ключевого метаболита в анализе степени микробного загрязнения следует использовать АТФ.