

16. Tamura G., Gold C., Ferro-Luzzi A., Ames B.N. Fecalase: A model for activation of dietary glycosides to mutagens by intestinal flora. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980, 77(8): 4961-4965.

17. Wollowski I., Rechkemmer G., Pool-Zobel B.L. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am. J. Clin. Nutr. 2001, 73: 451-455.

18. Zhang X.B., Ohta Y. Antimutagenicity and binding of lactic acid bacteria from a Chinese cheese to mutagenic pyrolyzates. J. Dairy Science, 1990, 73 (10):2702-2710.

С помощью бактериальной тест-системы Эймса на штаммах *Salmonella typhimurim* TA 100 и TA 98 исследована мутагенная активность фекальных экстрактов, полученных от 52 человек, у которых предварительно бактериологическим методом был проанализирован качественный и количественный состав кишечного микробиоценоза. Анализ микробных карт позволил разделить обследуемый контингент на две группы, первую, состоящую из 12 человек, без выраженных отклонений от принятого стандарта содержания основных представителей резидентной микрофлоры, и вторую из 40 человек с выявленным снижением на 1-3 порядка популяционного уровня бифидобактерий, лактобацилл и кишечной палочки.

Показано, что снижение на 2-3 раза логарифма стандартного количества бифидобактерий и лактобацилл в кишечнике приводит к повышению мутагенного фона экстрактов фекалий. Связи между качественным и количественным составом эшерихиозной микрофлоры и мутагенной активностью экстрактов фекалий не установлено. Ферментативные экстракты фекализы, полученные из фекалий с высоким содержанием бифидобактерий и лактобацилл значительно снижали выраженный мутагенный эффект нитрозометилмочевины и нитрозогуанидина.

И.С. Савицкая, В.А. Тарасов, А.С. Кистаубаева, Н.В. Воронова

БАТАРЕЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ТОКСИКОЛОГИИ

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

Одним из перспективных направлений экологических исследований является генетическая токсикология и ее новый раздел – экотоксикогенетика, который изучает воздействие факторов среды на генетический аппарат различных организмов в составе биоценоза. Основной задачей этого направления является создание методологии для классификации факторов окружающей среды по степени их генетической опасности и осуществление мероприятий, направленных на уменьшение возможных неблагоприятных генетических последствий [1]. Химические соединения, повсеместно распространенные в природе, способные мигрировать по пищевым цепям и представляющие наибольшую опасность, носят название суперэкоксиканты [2]. Для контроля за их содержанием в окружающей среде, необходимо разработать тест-системы для выявления как отдельных генотоксикантов, так и оценки суммарной активности этих факторов в сложных смесях и природных средах, прежде всего в почве.

Поскольку основное количество загрязнителей попадает именно в этот биосферный объект, при проведении эколого-генетического мониторинга почв имеет смысл осуществлять не только выявление и оценку мутагенного потенциала химических соединений, традиционно поступающих в почву, но и определять уровень загрязнения мутагенами почвенного покрова – среды обитания почвенных микроорганизмов. В связи с этим традиционно применяемые в генетической токсикологии бактериальные тесты с успехом могут применяться для данных целей не только из-за своей краткосрочности, но и ввиду возможности определения мутагенного воздействия загрязнителей на обитающие в почве прокариоты.

Для этого на практике основное тестирование или просеивающую программу можно начинать с применением первичной батареи, состоящей из трех разновидностей тестов [3]. В первую включены репарационные тесты, в которых оценивается ДНК - повреждающая активность тестируемых агентов. Они основаны на регистрации большего ингибирующего действия этих агентов у дефектных по репарации штаммов по сравнению с диким типом. Экспресс - методы регистрации агентов, взаимодействующих с ДНК, разработаны для различных микроорганизмов: *B.subtilis*, *P.mirabilis*, *E. coli*. В целом эта группа методов носит название RecA-тест, который в настоящее время существует в разных модификациях. Это, прежде всего, диффузионный тест - «spot»-тест и получивший наибольшее развитие чашечный метод - «plate incorporation test» [4]. Принципиально они регистрируют один и тот же эффект – различие в токсичности испытуемых соединений в зависимости от наличия или отсутствия *recA* функции, одного из ключевых ферментов, участвующих в репарационных процессах. Однако результаты, полученные в «spot»-тесте трудно оценить количественно, в этом методе в большей степени регистрируется качественный эффект. Чашечный тест более трудоемкий, по сравнению с другими модификациями и хуже поддается автоматизации.

Измерение же оптической плотности бактериальной культуры может быть легко автоматизировано путем использования фотокolorиметрических методов, и в этом отношении суспензионный тест является наиболее перспективным в плане создания автоматизированных систем

массового скрининга. Разработанная на кафедре биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби и в лаборатории молекулярной организации генома Иогена АН России модификация этого теста связана не просто с определением количества клеток в суспензионной культуре, а с учетом β -галактозидазной активности в *lac*⁺ штаммах *E.coli* RR1 (*recA*⁺) и *E.coli* HB101(*recA*⁻) после контакта с мутагеном. Уровень продукции этого фермента также измеряется фотометрически, отдельно для *recA*⁺ и *recA*⁻ мутантов. Это связано с наличием специфических красителей для β -галактозидазы и, в связи с этим, высокой точностью измерения ее активности в клетках, т.е. с повышением разрешающей способности метода спектрофотометрии.

Предлагаемая тест-система была апробирована на ряде классических мутагенов, индуцирующих в ДНК различные типы первичных повреждений. Для этого у *recA*⁺ и *recA*⁻ штаммов *E.coli* после 2-х часовой обработки мутагеном определялась оптическая плотность суспензии и активность β -галактозидазы. В качестве модельных мутагенов использовали классическим алкилирующий агент метилметансульфонат (ММС), основным типом первичных повреждений которого являются модифицированные основания в ДНК. Параллельно с ним исследовали ДНК-тропное действие бифункционального алкилирующего агента – Митомицина С (МтС), в результате действия которого, наряду с индукцией моноаддуктов, образуются еще и межнитевые сшивки.

Таблица - Сравнительная чувствительность суспензионного *Rec*⁻-теста и *Rec*⁻-хромотеста

Мутаген	Доза, (мкг/мл), при которой наблюдается % снижение регистрируемых параметров						
	Активность β -галактозидазы			Оптическая плотность			Кч <i>rec</i> -хромотеста
	РД50		КРД50	ЛД50		КЛД50	
	<i>recA</i> ⁻	<i>recA</i> ⁺		<i>recA</i> ⁻	<i>recA</i> ⁺		
Митомицин С	1,5	120,0	0,0013	17,0	120,0	0,14	56,0
Метилметансульфонат	2,0	131,0	0,013	177,0	327,0	0,5	33,3
Нитрозометилмочевина	4,2	213	0,02	97	176	0,5	25,0
Нитрозогуанидин	0,2	6,2	0,03	1,7	5,8	0,3	10,0
2-Нитрофлуорен	11,0	545,0	0,08	163,0	270,0	0,6	30,0
Этидиумбромид	36,0	43,0	0,8	70,0	92,0	0,8	1,0
2-Аминопурин	227,0	212,0	1,1	205,0	210,0	1,0	1,0

Параметры дозовой кривой рассчитывали в полулогарифмическом масштабе, а эффективность работы тест-системы учитывали по величине коэффициента К ЛД50, который вычисляли по отношению дозы мутагена, вызывающего 50% гибель клеток (ЛД50) у штамма *recA*⁻ по сравнению со штаммом *recA*⁺. Для варианта *Rec*⁻-теста $K_{ЛД50} = \frac{ЛД50_{recA-}}{ЛД50_{recA+}}$.

В случае *Rec*⁻-хромотеста коэффициент рассчитывали подобным образом, но при этом определяли дозу мутагена, которая вызывает 50% снижение ферментативной активности β -галактозидазы – редуцированную дозу (РД50). Для *Rec*⁻-хромотеста $K_{РД50} = \frac{РД50_{recA-}}{РД50_{recA+}}$. По этим данным определяется коэффициент чувствительности (Кч), по которому можно сравнить эти два теста. Коэффициент чувствительности *Rec*⁻-хромотеста $Кч = \frac{K_{ЛД50}}{K_{РД50}}$.

Эффективность работы системы оценивалась по величине коэффициента R50, регистрирующего кратность показателей 50% снижения активности фермента или плотности культуры у *recA*⁺ и *recA*⁻ штаммов после воздействия мутагена. Видно, что Кч предлагаемой тест-системы значительно различается в зависимости от того, какого типа повреждения ДНК вызывает тот или иной мутаген. Так, при воздействии таких агентов как 2-Аминопурин и этидиумбромид, коэффициент Кч =1, т.е. значения К ЛД50 (концентрация клеток) и КРД50 (редукция активности β -галактозидазы у *recA*⁺ и *recA*⁻ штаммов) не различаются. Этого и следовало ожидать, поскольку данные мутагены индуцируют повреждения, которые реализуются как ошибки репликации.

Однако, для других использованных в работе мутагенов, запускающих работу репарационных систем, значения сравниваемых коэффициентов различаются в 10,0 – 33,3 раза для алкилирующих мутагенов, а в случае МтС в 56 раз. Полученные данные позволяют заключить, что эта новая система «*RecA*-хромотест» является сверхчувствительной и может быть использована не только для обнаружения мутагенов, но и мутагенного фона объектов окружающей среды с различной степенью загрязнения [5].

В основе другой категории методов тестирования химических веществ на генетическую активность с помощью индикаторных микроорганизмов лежит экспериментальная проверка их способности индуцировать генные мутации. Для этого чаще всего используется бактериальная тест-система Эймса, ставшая уже классической. Метод основан на способности мутагенов вызывать реверсии к прототрофности у ауксотрофных по гистидину штаммов *S.typhimurium*. Ревертировавшие под действием мутагена клетки при высеве на селективную питательную среду образуют колонии. Если исследуемый агент оказывается мутагеном, то в его присутствии число таких колоний будет больше, чем в контроле (спонтанный уровень мутаций).

Предложено достаточно большое число различных модификаций теста Эймса. Основная идея усовершенствований – автоматизация процедуры тестирования и/или повышение чувствительности к отдельным типам мутагенов. Среди наиболее значимых отметим «градиент»-тест Эймса и автоматизированный «спиральный» тест Эймса [6]. С помощью этих модификаций можно одновременно на одной чашке оценивать мутагенные свойства веществ сразу в нескольких концентрациях.

Вместе с тем тест Эймса, несмотря на несомненную популярность, имеет и недостатки. Метод достаточно трудоемок, требует большого количества реактивов, оценка результатов может быть проведена лишь через 48 часов инкубации индикаторных бактерий с испытуемым образцом. Кроме того, тестирование нерастворимых в воде соединений может быть затруднено или даже вообще неосуществимо ввиду сложности его диффузии в слой селективного агара на чашке. И, наконец невозможно оценить мутагенную активность образцов, содержащих токсические компоненты. Поэтому предлагается новая модификация теста Эймса, основанная на биолюминесцентном методе индикации АТФ бактериальных клеток, в основе которого лежит взаимодействие АТФ, люциферазы и люциферина, сопровождающееся свечением. Т.е. биолюминесцентные варианты теста предусматривают использование штаммов, имеющих гены *lux* [7].

При этом одновременно определяется рост и ауксотрофов и прототрофов, что обеспечивает возможность параллельного измерения не только мутагенного, но и токсического эффекта. При этом время анализа значительно сокращается, реакция происходит в жидкой среде, измерение поддается автоматизации, что исключает субъективный фактор оценки, присутствующей в тесте Эймса. Данная модификация с успехом испытана на двух стандартных мутагенах – метилметансульфонате и нитрохинолиноксиде. Высокая чувствительность данного теста позволяет рекомендовать его для системы экологического контроля.

Существование в клетках *E. coli* системы генов SOS- ответа, выражение которых происходит координированно в ответ на действие мутагенов, создает реальную возможность, путем учета индукции активности любого из известных SOS - генов при действии испытуемого соединения, судить о его мутагенной активности. Эта принципиальная возможность реализована при создании так называемых SOS – хромотестов. Путем слежения за синтезом фермента β - галактозидазы, находящегося под контролем SOS-индуцибельного промотора, полученные системы позволяют качественно и количественно оценивать генотоксичность тестируемых соединений.

В настоящее время SOS – хромотест существует в двух вариантах – «хромосомном» и «плазмидном». Достаточно обширный экспериментальный материал по сравнению эффективности SOS – хромотеста с широко известным тестом Эймса указывает, что по уровню прогностической способности эти тесты примерно одинаковы. Это касается также и порога чувствительности тестов, однако по времени, затрачиваемому на одно измерение, а также простоте и возможности автоматизации SOS – хромотест несомненно превосходит тест Эймса. Следует сказать, что это сравнение относится к случаю – «хромосомного» варианта SOS – хромотеста [8].

Однако проведенные нами исследования по определению генотоксичности таких загрязнителей, как фосфорорганические и триазиновые пестициды показали, что SOS – хромотест на базе плазмиды pJB43 превосходит «хромосомный» аналог Килларде и др. по минимально обнаруживаемой концентрации (порогу чувствительности), времени, затрачиваемому на одно измерение и коэффициенту индукции в несколько раз. Достоверный эффект наблюдается в области малых доз – 1 и 10 мкг/мл, для которых активности на штаммах Эймса не обнаружено [9].

Общим достоинством бактериальных тестов является быстрота, экономичность, высокая чувствительность, возможность автоматизации. Краткосрочные бактериальные тест-системы, применяемые в генетической токсикологии, могут быть использованы в системе экологического мониторинга для измерения мутагенного фона объектов окружающей среды.

1. Новиков А.В. Экология, окружающая среда и человек // М.: Наука. – 2001. – 306 с.
2. Fahring R.F., Lang R., Madle S. General strategy for the assessment of genotoxicity // *Mutat. Res.* – 1991. – Vol. 252. – P. 161-163.
3. Тарасов В.А., Абилев С.К., Велибеков Р.М., Асланян М.М. Эффективность батарей тестов при оценке потенциальной мутагенной опасности химических соединений // *Генетика.* – 2003. - Т.39. - №10. – С.1406-1417.
4. Yamaguci T. Mutagenic activity of various kinds of cheese on the Ames, rec and umu assay // *Mutat. Res.*-1989. Vol. – 224. - №4. -P.493-502.
5. Савицкая И.С., Махмудова Г.С., Кистаубаева А.С., Ахметова Ж.А. Перспективы использования автоматизированных бактериальных тест-систем для массового скрининга генотоксичных агентов в почве // *Сборник материалов II Международной конференции «Современные проблемы геоэкологии и сохранение биоразнообразия».* - Бишкек, 2007 - С. 278-280.
6. Diehl M., Fort F. Spiral Salmonella assay: validation against the standard pour-plate assay // *Environ. Mol. Mutagen.* – 1996. – Vol. 27. – P. 227-236.
7. Guadano A., Pena E., Azucena G.C., Jose F.A. Development of new bioluminescent mutagenicity assay based on the Ames test // *Mutagenesis*, 1999, Vol.14, № 4. -P.411-415.
8. Quillardet P., Huisman O., De An R., Hofnung M. SOS-chromotesti, ei direct assay of induction of a SOS function in *Escherichia coli* k12 to measure genotoxicity // *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA).* - 1982. - Vol.79. - P.5971-5975.
9. Савицкая И.С., Махмудова Г.С., Кистаубаева А.С., Ахметова Ж.А. Перспективы использования автоматизированных бактериальных тест-систем для массового скрининга генотоксичных агентов в почве // *Сборник материалов II Международной конференции «Современные проблемы геоэкологии и сохранение биоразнообразия».* - Бишкек, 2007 - С. 278-280.

Приводится краткая характеристика основных разновидностей бактериальных тест-систем на мутагенез и репарацию, применяемых в экотоксикологии. Обсуждаются их достоинства и недостатки. Разработана новая модификация Rec-хромотеста. Она рекомендуется для использования в генетической токсикологии при скрининговых исследованиях для определения ДНК-тропной и антигенотоксической активности различных факторов.

The short characteristic of the basic versions of bacterial test systems on mutation and a reparation, applied in ecotoxicology is resulted. Their merits and demerits are discussed. Is developed new updating Rec-hromotests. It is recommended for use in genetic toxicology at screenings researches for definition of DNA-trops and antigen toxics to activity of various factors.

И.С. Савицкая, А.С. Кистаубаева, К. Низметова, Н.В. Воронова

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЛАКТОБАЦИЛЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА КАРБЕНИЗИРОВАННОМ СОРБЕНТЕ (Казахский национальный университет им.аль-Фараби)

При пероральном приеме пробиотиков, содержащих живые микроорганизмы или их активные метаболиты, преодоление естественных барьеров (кислая среда и протеолитические ферменты желудка или секреты мембран кишечных и слизистых оболочек и ворсинок) сопровождается значительной потерей исходной активности готовых лекарственных форм. Клинико-экспериментальные исследования показали, что под действием желудочного сока и желчи пробиотики теряют более 90% своей активности еще до момента попадания в кишечник [1].

Для сохранения жизнеспособности клеток бактерий-пробиотиков их можно, но и закреплять на поверхности носителя-сорбента [2].

Среди сорбентов, которые могут быть использованы для иммобилизации пробиотиков особый интерес представляют активированные угли нового типа, полученные путем высокотемпературной карбонизации и последующей активации отходов растительного происхождения, таких как скорлупа грецких и кокосовых орехов, абрикосовые косточки, рисовая шелуха и т.п. Несомненным достоинством этих сорбентов является то, что производятся они из дешевого, причем ежегодно возобновляемого растительного сырья. Широкий диапазон размеров пор и большая удельная поглощающая поверхность карбонизованных материалов обеспечивают наличие у них высоких прикрепительных и детоксикационных свойств [3].

Это послужило основанием для изучения возможности иммобилизации клеток лактобацилл на сорбенте из зауглероженной рисовой шелухи (ЗРШ), полученной Институте проблем горения КазНУ им.аль-Фараби.

Цель работы: Исследовать влияние иммобилизации клеток лактобацилл на зауглероженной рисовой шелухе на их антагонистическую активность и устойчивость к неблагоприятным факторам.

Материалы и методы исследования

В качестве пробиотического компонента использованы отобранные ранее 3 штамма бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащие к трем наиболее типичным видам интестинальной лактофлоры: *L.fermentum* АК-2R, *L.acidophilus* АА-1R и *L.plantarum* АР-1R.