

УДК 577.13: 579.22

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ
ТОКСИЧНОСТИ СВОБОДНЫХ РАДИКАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЛЮМИНЕСЦИРУЮЩИХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК****Мелихова Л.А., Миндолина Ю.В.***ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», г. Оренбург, e-mail: mel1295@mail.ru***THEORETICAL FOUNDATIONS FOR DETERMINING THE LEVEL
OF THE TOXICITY OF FREE RADICALS WITH THE USE
OF LUMINESCENT BACTERIAL CELLS****Melikhova L.A., Mindolina Yu.V.***Orenburg State University, Orenburg, e-mail: mel1295@mail.ru*

В данной статье представлены теоретические основы определения уровня токсичности свободных радикалов кислорода и азота с использованием рекомбинантных люминисцирующих штаммов. Определение влияния внешних факторов на клетки бактерий в целом осуществляется при помощи оценки биолюминесценции, т.к. это явление тесно связано с метаболическими процессами, происходящими в клетке. Данное исследование основано на следующей закономерности: уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту. Проведение подобного рода исследований поможет понять, на какие именно виды и группы бактерий направлено действие различных АФК и РФА, и разработать рекомендации в отношении методов асептики и антисептики, а также методов тестирования эффективности дезинфицирующих агентов по уровню тушения свечения.

Ключевые слова: активные формы кислорода, биолюминесценция, токсичность.

This article presents the theoretical basis for determining the level of toxicity of free radicals of oxygen and nitrogen using recombinant luminescent strains. Determination of the influence of external factors on bacterial cells as a whole is carried out using the evaluation of bioluminescence. This phenomenon is closely related to the metabolic processes taking place in the cell. This study is based on the following regularity: a decrease in the intensity of bioluminescence in proportion to the toxic effect. Carrying out such studies will help to understand which species and groups of bacteria the action of various active forms of oxygen and reactive forms of nitrogen is directed, and to develop recommendations on aseptic and antiseptic methods, as well as methods for testing the effectiveness of disinfectants in the level of suppression of luminescence.

Keywords: active oxygen species, bioluminescence, toxicity.

Активные формы кислорода (АФК) – это молекулы органического или неорганического происхождения, имеющие неспаренный электрон на внешнем электронном уровне. В большей степени к ним относятся ионы кислорода, свободные радикалы и различные перекисные соединения. Образование АФК в клетках бактерий происходит в аэробных условиях на клеточной мембране и связано это с деятельностью цепи дыхательных ферментов. Утечка электронов из электронно-транспортной цепи в процессе окислительного фосфорилирования и непосредственное их взаимодействие с кислородом – основной путь образования активных форм кислорода в большинстве клеток. Тем не менее, образование продуктов неполного восстановления кислорода считается нормальным процессом. Активные формы кислорода и радикалы, синтезируемые в организме, выполняют как вредные, так и полезные для клетки функции. Высокая концентрация свободных радикалов в клетке может привести к окислительному стрессу, вызывающему повреждение различных

структур: ДНК, белков и липидов. У бактерий могут образовываться гидроксильные радикалы, которые в дальнейшем окажут повреждающее действие. Гидроксильные радикалы, воздействуя на гистидиновые группы и аминокислотные составляющие белков, вызывают их разрушение, и повреждают ферменты. Мутацией и гибелью бактерий может произойти из-за разрыва нуклеиновых кислот и углеводных мостиков. Негативное воздействие АФК на клетку может привести к клеточной смерти. Вследствие высокой токсичности АФК произошло существенное сокращение биоразнообразия первичной анаэробной микробиоты. Однако большинство видов бактерий выработало средство защиты от губительного действия активных форм кислорода – антиоксидантные системы. Под действием NO-синтаз в организме образуются токсичные продукты метаболизма оксида азота, которые носят название реактивные формы азота (РФА). Они оказывают аналогичное отрицательное воздействие на клетку, вызывая «нитрозирующий стресс» [1 – 6].

Одним из удобных инструментов исследования влияния внешних факторов на бактерии в целом является оценка биолюминесценции, благодаря тесной связи с метаболическими путями клетки позволяющей оценивать интегральную жизнеспособность клетки. Ферментативный процесс, в котором происходит потребление кислорода и выделение большого количества света носит название бактериальная биолюминесценция. Для генерации свечения важным условием является наличие кислорода, при отсутствии данная реакция не пройдет. Явление биолюминесценции связано с окислением длинноцепочечных альдегидов с помощью люциферазы, в результате которого происходит свечение. Функцией бактериальной люциферазы или флавинозависимой монооксигеназы является окисление субстрата с отсоединением у него протонов и электронов, и в дальнейшем с переносом их к последнему акцептору. Бактериальная биолюминесценция представляет собой окисление флавиномононуклеотида, который окисляется до длинноцепочечного алифатического альдегида или до жирной кислоты, и затем происходит излучение кванта света с длиной волны 495 [7, 8].

Методика определения уровня токсичности свободных радикалов кислорода и азота на рекомбинантные люминесцирующие штаммы включает в себя изучение интенсивности биолюминесценции бактерий при воздействии токсических веществ, присутствующих в анализируемой пробе, по сравнению с контролем. Люминесцентные бактерии оптимальным образом сочетают в себе различные типы чувствительных структур, ответственных за генерацию биоповреждения (клеточная мембрана, цепи метаболического обмена, генетический аппарат). Это обеспечивается тем, что люминесцентные бактерии содержат фермент люциферазу, осуществляющую эффективную трансформацию энергии химических связей жизненно важных метаболитов в световой сигнал на уровне, доступном для экспрессных и количественных измерений. Основой такого подхода является то, что уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту. Острое токсическое действие исследуемой пробы на бактерии определяется

по ингибированию их биолюминесценции за 30-минутный (в экспрессном варианте – 5 минут) период экспозиции [9 – 12].

Проведение подобного рода исследований с использованием ряда люминесцирующих бактерий, имеющих различное строение клеточных систем, позволит иметь представление об уровне токсичности АФК и РФА для данных микроорганизмов. Сопоставление полученных данных с бактерицидностью поможет разработать рекомендации для быстрого тестирования эффективности дезинфицирующих агентов по уровню изменения интенсивности биолюминесценции [9].

Список литературы

1. Balaban R.S., Nemoto S., Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging // *Cell*. – 2005. – 120(4). – P. 483–95.
2. Северин Е.С. Биохимия / Е.С. Северин. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003., – 779 с.
3. Лепехина Е.В. Роль тиоловых редокс-систем при действии экстремальных температур и антибиотиков у *Escherichia coli*: На материале микробиологических дисциplin. : дис. ... доктор. биол. наук / Г.В. Смирнова. – Пермь, 2014. – 119 с.
4. Мартинович Г.Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г.Г. Мартинович, С. Н. Черенкевич. – Минск: БГУ, 2006. – 159 с.
5. Goswami, M. Effects of glutathione and ascorbic acid on streptomycin sensitivity of *Escherichia coli* / M. Goswami, S.H. Mangoli, N. Jawali // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – V.51. – P. 1119–1122.
6. Graumann P. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures / P. Graumann, T. Wendrich, M. Weber, K. Schroder, M. Marahiel // *Mol. Microbiol.* – 1997. – V. 25. – p. 741-756.
7. Дерябин Д.Г. Бактериальная биолюминесценция: фундаментальные и прикладные аспекты: учебник / Д.Г. Дерябин. – М.: Наука, 2009. – 246 с.
8. Данилов В.С. Сенсорные биолюминесцентные системы на основе lux-оперонов разных видов люминесцентных бактерий / В.С. Данилов, А.П. Зарубина, Г.Е. Ерошников, Л.Н. Соловьева, Ф.В. Карташев, Г. Б. Завильгельский // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология.* – 2002. – № 3. – С. 20-24.
9. Данилов В.С. Расширение возможностей люминесцентного бактериального теста для анализа токсичности химических соединений / В. С. Данилов, Т. П. Юдина, Е.В. Сорокина // *Вестник ОГУ.* – 2007. – № 75 (специальный выпуск). – С. 102-104.
10. Кудряшева Н.С. Физико-химические основы биолюминесцентного анализа: учеб. пособие / Н. С. Кудряшева, В. А. Крагасюк, Е. Н. Есимбекова. – Красноярск : Краснояр. гос.ун-т., 2002. – 154 с.
11. Farr S.B. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* / S.B. Farr, T. Kogoma // *Microbiol. Rev.* – 1991. – V. 55. – p. 561-585.
12. Bulich A.A. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity / A. A. Bulich, D. L. Isenberg // *ISA Trans.* – 1981. – № 1. – p. 29-33.