

Е.В. Булычева, Е.И. Короткова, О.А. Воронова, Е.В. Петрова, А.А. Кустова

## МЕТОДИКА ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ИЗМЕРЕНИЯ КОЛИЧЕСТВА МЕТАБОЛИТА *IN SITU* ПРИ ОЦЕНКЕ ОБЩЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЗАГРЯЗНЕННОСТИ ПРИРОДНЫХ ВОД

(Национальный исследовательский Томский политехнический университет)

e-mail: [kosma13@yandex.ru](mailto:kosma13@yandex.ru)

*Проведен люминесцентный анализ образца медицинского препарата «Колибактерин», содержащего бактерии группы кишечной палочки, выбранные для данной работы как тест-объекты. В качестве аналитического сигнала был выбран сигнал одного из метаболитов, по присутствию которого можно судить о наличии живых бактерий в пробе. Показано, что выбранный сигнал подходит для оценки общей бактериальной загрязненности воды методом биотестирования.*

**Ключевые слова:** биотестирование, бактерии группы кишечной палочки, бактериальная загрязненность, вода

### ВВЕДЕНИЕ

Экологические проблемы настоящего времени связаны, в основном, с антропогенными воздействиями. Под этим термином понимают деятельность, вносящую изменения в природную среду посредством реализации экономических, военных, рекреационных, культурных и других интересов человека [1]. Возникающие экологические проблемы отрицательно влияют на здоровье и жизнь самого человека.

Вода является важнейшим природным ресурсом и ее качество должно строго контролироваться. Только с начала этого года от некачественной воды в мире умерло более 400 тысяч человек [2]. К основным показателям качества воды относятся: количество микроорганизмов, содержание тяжелых металлов, органических соединений, нефтепродуктов и т.д. [3].

Данная работа посвящена определению количества микроорганизмов в воде. Создание экспрессных методик определения этого показателя является актуальной задачей. В работе [4] описан метод быстрого определения содержания бактерий в пробе, основанный на измерении сигнала от метаболита, экстрагированного из клетки. Создаваемая методика внутриклеточного измерения количества метаболита при оценке общей бактериальной загрязненности вод основана на *in situ* и исключает стадию экстрагирования метаболита, что уменьшает время анализа и сокращает трудо- и энергозатраты. Для успешного создания методики необходимо решить следующие задачи: провести поиск аналитического сигнала, выполнить постановку эксперимента в модельной среде и реальных объектах. Для анализа выбран чувствительный, селективный, экспрессный, точный метод люминесцентного анализа.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Согласно источнику [5], в бактериальной клетке есть вещества, обладающие люминесценцией. Одно из них – никотинамидадениндинуклеотид (НАД) – метаболит, участвующий в процессе переноса протона водорода от окисляемых веществ в цепи углеводного обмена. Его восстановленная форма (НАДН) имеет четкий люминесцентный сигнал с максимумом на длине волны регистрации 460 нм при длине волны возбуждения 360 нм [6]. Присутствие в системе вещества НАДН позволяет сделать вывод о наличии в пробе живых бактерий. На этом явлении основана разрабатываемая методика определения бактериальной загрязненности воды.

На первом этапе был проведен анализ вещества НАДН, в результате чего установлено, что данное вещество действительно дает люминесцентный сигнал, максимум которого приходится на длину волны регистрации 460 нм при длине волны возбуждения 360 нм, следовательно, его можно выбрать в качестве аналитического сигнала.

Далее был поставлен эксперимент в модельной среде. Для ее создания использовался медицинский препарат «Колибактерин», содержащий бактерии группы кишечной палочки. Выбор данного препарата обусловлен тем, что в природной воде присутствуют бактерии кишечной палочки, следовательно, они могут быть использованы для создания модельной среды. Препарат представляет собой микробную массу живых антагонистически активных штаммов кишечной палочки (E-coli M-17), лиофилизированную в среде культивирования. Приготовление суспензии проводилось путем растворения содержимого ампулы в 15 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Приготовленная суспензия анализировалась в тех же условиях, что и НАДН.

Далее был поставлен эксперимент в реальных средах. Объектами анализа являлись пробы воды, взятые из водоемов г. Томска. Анализ проводился в условиях, аналогичных предыдущим этапам.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр люминесценции суспензии бактерий группы кишечной палочки (рис. 1) и сравнительный спектр стандарта НАДН были получены при длине волны возбуждения 360 нм.

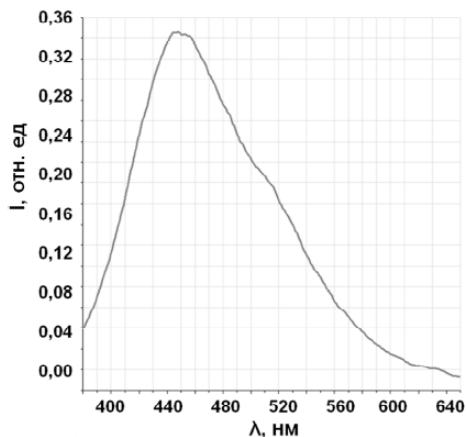


Рис. 1. Спектр люминесценции суспензии бактерий кишечной палочки (количество бактерий -  $1 \cdot 10^{10}$  КОЕ): чувствительность ФЭУ - средняя, длина волны возбуждения - 360 нм

Fig. 1. The luminescence spectrum of coliform bacteria suspension (quantity of bacteria  $1 \cdot 10^{10}$  CFU): sensibility of photomultiplier - medium, excitation wavelength - 360 nm

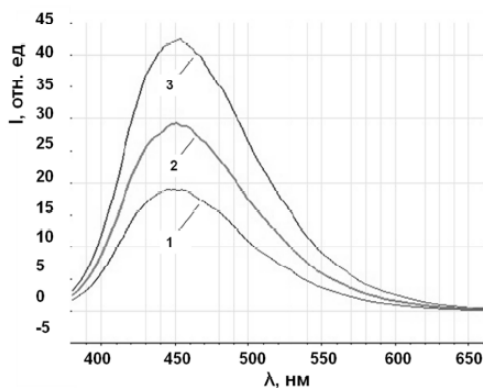


Рис. 2. Спектр люминесценции НАДН: длина волны возбуждения - 360 нм. 1 - стандарт НАДН  $C_m = 10^{-5}$ , 2 - стандарт НАДН  $C_m = 10^{-4}$ , 3 - стандарт НАДН  $C_m = 10^{-3}$

Fig. 2. The luminescence spectrum of NADH: excitation wavelength - 360 nm. 1 - standard of NADH  $C_m = 10^{-5}$ , 2 - standard of NADH  $C_m = 10^{-4}$ , 3 - standard of NADH  $C_m = 10^{-3}$

Из рис. 1 видно, что положение максимума пика НАДН в бактериях находится на длине волны 447 нм.

При исследовании чистого вещества НАДН (рис. 2) максимум люминесценции находится на длине волны 460 нм.

Смещение максимума пика люминесценции НАДН в бактериях от НАДН стандарта на 13 нм объясняется протеканием ферментативной реакции внутри клетки [5].

На следующем этапе работы было проведено исследование проб воды при условиях, подобранных на модельной среде. На рис. 3 представлены спектры люминесценции проб воды из реки, взятой в поселках Светлый и Мирный.

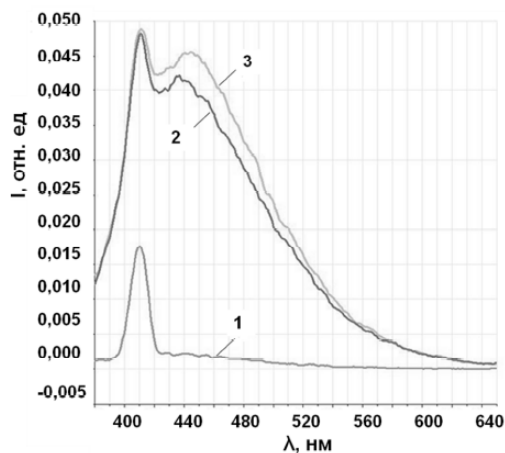


Рис. 3. Спектр проб воды: 1 - дистиллированная вода, 2 - вода из реки пос. Мирный, 3 - вода из реки пос. Светлый. Режим съемки - по регистрации. Длина волны возбуждения 360 нм

Fig. 3. Spectrum of water samples: 1 - distilled water, 2 - water from river Mymnyy, 3 - river water from township Svetlyiy. Sensibility of photomultiplier - medium, excitation wavelength - 360 nm

Из графика видно, что интенсивность люминесценции в области длины волны около 447 нм составляет не более 0,0045 отн. ед. Кривая 1, принадлежащая дистиллированной воде, в этой области сигнала не имеет. Сравнивая полученные результаты с результатами, представленными на рис. 2, можно сделать вывод, что данный пик принадлежит НАДН и в исследуемых пробах воды присутствуют бактерии. Таким образом, данный сигнал может использоваться для количественного определения бактерий в водах.

#### ВЫВОДЫ

В ходе исследования был проведен анализ воды, взятой из реки Ушайка в двух населенных пунктах. Для установления аналитического сигнала приготовлена модельная система на основе медицинского препарата «Колибактерин», содержа-

шего бактерии группы кишечной палочки. Определено, что в качестве аналитического сигнала можно выбрать люминесцентный сигнал от одного из метаболитов (НАДН). Показано, что и в модельной среде, и в реальных объектах данный сигнал определяется достаточно точно, обладает стабильностью и воспроизводимостью, и может быть выбран в качестве аналитического сигнала для дальнейшей количественной оценки бактериальной загрязненности.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-7366.2013.8.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Баленко Ю.К., Беспамятных Т.Б., Королькова С.В., Костецкая Г.Б., Михайлов Л.Б., Попова Р.И., Сла-

кова О.В., Соломин В.П., Царенко В.П. Концепции современного естествознания. СПб: Питер, 2008. 336 с.; Balenko Yu.K., Bespamyatnykh T.B., Korolkova S.V., Kostetskaya G.B., Mikhaylov L.B., Popova R.I., Silakova O.V., Solomin V.P., Tsarenko V.P. Concepts of modern natural science. SPb: Piter, 2008. 336 p (in Russian).

2. <http://www.worldometers.info/ru/>
3. Государственный стандарт ГОСТ 27065-86. Качество вод. Термины и определения; SU State Standard 27065-86. Water quality. Terms and determinations (in Russian).
4. Jinxue Wang, Hong Lin, Jing Wang. China Patent CN 101498666. 2009.
5. Карнаухов В.Н. Люминесцентный анализ клеток. Пушкино, 2002. 131 с.; Karnaukhov V.N. Cells luminescence analysis. Puschino. 2002. 131 p. (In Russian).
6. Dominik Berndt Michael Grögel. New fluorescent probes and assays for lactate and hydrogen peroxide: Diss...phD. Deggendorf. 2011. 142 p.

Кафедра физической и аналитической химии

УДК 543.

Е.Н. Дьяченко, Н.А. Колпакова

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗОЛОТА МЕТОДОМ ИНВЕРСИОННОЙ ВОЛЬТАМПЕРОМЕТРИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГРАФИТОВОГО ЭЛЕКТРОДА, МОДИФИЦИРОВАННОГО ВИСМУТОМ

(Национальный исследовательский Томский политехнический университет)

e-mail: [endyachenko@tpu.ru](mailto:endyachenko@tpu.ru)

*Рассмотрена возможность определения золота (III) методом инверсионной вольтамперометрии на модифицированном висмутом графитовом электроде. Показано, что при электроокислении осадка висмут-золото на вольтамперной кривой наблюдаются анодные пики электроокисления висмута, золота и пик селективного электроокисления висмута из ИМС ВiAn<sub>2</sub>. Определение висмута методом инверсионной вольтамперометрии можно проводить как по пику селективного электроокисления висмута из ИМС с золотом, так и по пику электроокисления золота с поверхности ГЭ. Модифицирование ГЭ висмутом увеличивает чувствительность определения золота.*

**Ключевые слова:** вольтамперометрия, висмут, золото, графитовый электрод, количественное определение

Для определения микроколичеств золота в минеральных рудах и рудных концентратах перспективен метод инверсионной вольтамперометрии (ИВ). Он обладает высокой чувствительностью, дешевой аппаратурой и позволяет определять элементы в широком интервале концентраций. Ранее было показано, что для определения золота (III) методом инверсионной вольтамперометрии используют графитовый электрод [1]. Из литературных данных известно, что чувствительность определения можно повысить, если для ин-

версионно-вольтамперометрического определения использовать графитовые электроды, модифицированные металлами [2]. Целью данной работы была оценка возможности определения золота (III) с использованием модифицированного висмутом графитового электрода.

Для проведения исследований и записи вольтамперных кривых использовался вольтамперометрический анализатор ТА-4 (ООО «НПП «Томьаналит», г. Томск) в комплекте с персональным компьютером.