

УДК 619:616.98:579.842.11:631.147

Ю. С. Сухарев

**ИНФУЗОРИИ *STYLONICHIA MYTILUS* КАК  
ОБЪЕКТ ДЛЯ АВТОМАТИЗИРОВАННОГО  
ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗА ЭНТЕРОТОКСИНОВ  
*ESCHERICHIA COLI***

Использовали инфузорий в качестве тест-объекта для автоматизированного экспресс-анализа энтеротоксинов *Escherichia coli* в объектах окружающей среды. В отличие от простого биотестирования, инфузории *Stylonichia mytilus*, выполняющие функцию биологического элемента распознавания энтеротоксинов, быстро и достоверно реагировали на их содержание и низкие концентрации в малых образцах, а физический преобразователь, состоящий из оптической и электронной подсистем, позволял проводить подсчет погибших под действием токсинов инфузорий и оценку степени токсичности в автоматическом режиме.

**Ключевые слова:** *Stylonichia mytilus*, *Escherichia coli*, энтеротоксины, экспресс-анализ, бесклеточные супернантны.

Необходимость отслеживать все аспекты состояния окружающей среды в реальном времени постоянно растет, и это вызвано возрастающим влиянием загрязнения окружающей среды на здоровье и безопасность человека. Необходимо также иметь возможность определять содержание основных компонентов и примесей в различных средах. Именно поэтому целью современной биотехнологии является снижение пределов обнаружения и повышение точности и надежности анализа.

Следствием столь насущной потребности в мониторинге всего, что нас окружает, является вовлечение значительных ресурсов в разработку сенсоров широкого спектра действия [7, 9]. Первые работы, оценивающие возможность использования биосенсоров на основе одноклеточных организмов, для характеристики токсических веществ появились в конце 1990-х гг. [1, 2].

Известно, что патогенные *E. coli*, находящиеся в необработанных бытовых и коммунальных сточных водах, в 40—50% случаев синтезируют термостабильные (STa, STb) и в 20—30% — термолабильный (LT) энтеротоксины [10, 11].

Уникальные возможности для экспресс-анализа бактериальных токсинов могут обеспечить инфузории, позволяющие проводить тестирование на

© Ю. С. Сухарев, 2013

легко и быстро воспроизводимых, генетически однородных организмах, имеющих значительно более низкую стоимость по сравнению с другими биологическими объектами [3—6].

Цель исследований состояла в использовании инфузорий в качестве тест-объекта для автоматизированного экспресс-анализа энтеротоксинов *Escherichia coli* в объектах окружающей среде.

**Материал и методика исследований.** В экспериментах использовали инфузорий четырех видов: *Colpoda steinii*, *Paramecium caudatum*, *Tetrahymena pyriformis* и *Stylonychia mytilus*<sup>1</sup>. Культивирование проводили в закрытых чашках Петри в среде Лозина — Лозинского, которую готовили на дистиллированной воде с добавлением следующих солей (г/дм<sup>3</sup>): NaCl — 0,1, KCl — 0,01, NaHCO<sub>3</sub> — 0,02, MgSO<sub>4</sub> — 0,01, CaCl<sub>2</sub> — 0,01, поддерживая оптимальную температуру 24—26°C.

Пересев культуры производили каждый раз за сутки до постановки опыта. В качестве корма использовали сухие пекарские дрожжи, которые добавляли в среду во время пересева культуры (на 25 см<sup>3</sup> среды — 1 кусочек сухих пекарских дрожжей ГОСТ 171-81, массой 10 мкг). Передозировка корма недопустима, поскольку она приводила к угнетению инфузорий или к их гибели.

В качестве исследуемых объектов были использованы бесклеточные супернатанты энтеротоксигенных штаммов *E. coli* из коллекции Национального научного центра «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины: O26 (LT), O20 (LT), O9 (STa), O139 (STa), O119 (STb, LT), O8 (STb, LT), O101 (STb, LT), проявившие максимальную токсичность в опыте на белых мышах. Контролем служил штамм *E. coli* M-17, представляющий собой пробиотический препарат, поступающий в аптечную сеть под названием «Колибактерин» («Ромакол»), не обладающий токсигенными свойствами. В качестве отрицательного контроля использовали стерильную питательную среду культивирования штаммов *E. coli*, а также культуральный бесклеточных фильтрат *Proteus vulgaris*.

Исследуемые штаммы *E. coli* выращивали отдельно на синтетической питательной среде Г. В. Гнатенко и Ю. С. Сухарева [8] в течение 18—24 ч при температуре 37°C, отделяли бактериальную массу центрифугированием при 5000 g в течение 30—40 мин или фильтрованием через стерилизующие пластины фильтра Зейтца.

Требования к условиям анализа и параметрам программы:

— температура в лунке в момент измерения не ниже 24—26°C;

— экспозиция инфузорий в лунке после их пересадки из чашки Петри, перед первым подсчетом — не менее 15 мин и зависит от установления оптимальной температуры и чистоты лунки;

<sup>1</sup> Материал предоставлен зав. кафедрой зоологии Харьковского национального университета А. Ю. Утевским.

— использование только суточной культуры инфузорий. Культура старшего возраста (2—3-суточная) характеризовалась нестабильной реакцией на токсические вещества и более высокой устойчивостью к ним;

— для создания оптимальных оптических условий следует обеспечить выбор такого объема раствора, чтобы его уровень в лунке не превышал 4 см<sup>3</sup>, что достигалось при внесении в лунку 6—7 капель раствора;

— оптимальная плотность инфузорий — в пределах 50—70 клеток в лунке;

— чистота лунок, критерием которой служило отсутствие в контроле подавления активности инфузорий через 60 мин после первого подсчета.

### *Результаты исследований и их обсуждение*

Существенные морфологические и физиологические различия инфузорий обуславливают разнообразие сфер их использования в биологической практике.

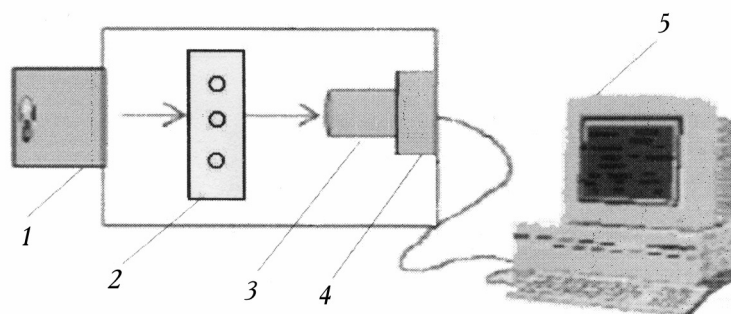
Установлено, что в данном тесте можно использовать инфузорий лишь одного вида — *Stylonichia mytilus*, так как только они оказались чувствительными к продуцируемым *E. coli* энтеротоксинам. Представители других видов инфузорий не погибали в присутствии энтеротоксинов *E. coli*, даже при высоких их концентрациях.

Помимо признаков, присущих прочим инфузориям, данный вид обладал рядом уникальных свойств. Способность образовывать цисты покоя, устойчивые к высушиванию, и быстрый переход от стадии покоя к активной жизнедеятельности позволяли получать на основе культуры *S. mytilus* удобный в использовании сухой препарат-диагностикум с длительным сроком годности (24 мес).

Существенным является и то обстоятельство, что гибель *S. mytilus* сопровождается их полным лизисом, что весьма удобно при подсчете оставшихся в живых инфузорий.

Новизна предлагаемого решения, по сравнению с простым биотестированием, заключается в том, что инфузории *S. mytilus*, выполняющие функцию биологического элемента распознавания энтеротоксинов *E. coli*, быстро и достоверно реагируют на их содержание и низкие концентрации в малых образцах, а физический преобразователь, состоящий из оптической и электронной подсистем, позволяет осуществлять подсчет погибших под действием токсинов инфузорий и оценку степени токсичности в автоматическом режиме.

Схема аппаратно-программного комплекса для регистрации погибших под действием энтеротоксинов *E. coli* инфузорий *S. mytilus* показана на рисунке 1.



1. Аппаратно-программный комплекс для регистрации погибших под действием энтеротоксинов *E. coli* инфузорий *S. mytilus*: 1 — осветитель; 2 — планшет с инфузориями; 3 — объектив микроскопа AXIOSCOP-40; 4 — цифровая фотокамера; 5 — ПК Packard Bell IMEDIA X9751 AIO с программным обеспечением.

Оптическая подсистема осуществляла надежную видимость объекта размером 200—250 мкм (инфузории *S. mytilus*) и захват в поле зрения фотокамеры всей лунки микропанели диаметром 14 мм и глубиной 6 мм.

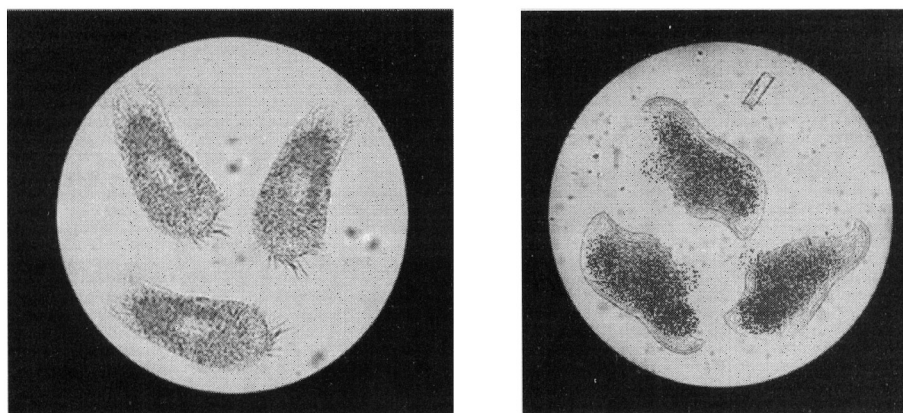
Электронная подсистема обеспечивала: удобную настройку системы, определение степени токсичности образцов в заданном числе лунок, ввод и редактирование необходимой дополнительной информации, запись полученных результатов на диск и чтение их с диска, распечатку полученных результатов на принтере.

При создании тест-системы важное значение имело нормирование ее начального состояния, которое зависело от физиологического состояния входящих в нее тест-объектов, то есть от фазы роста культуры и стадии жизненного цикла каждой отдельной инфузории.

Нами определено, что оптимальным состоянием культуры инфузорий для получения чувствительной ответной реакции является фаза экспоненциального роста (суточная культура инфузорий), в связи с чем после добавления корма чашку Петри с культурой выдерживали в течение 4 ч для получения концентрированной культуры инфузорий.

Испытания начинали с внесения в лунки полистиролового планшета по три капли культуры тест-организмов, при этом в лунку попадало 50—70 инфузорий. Для тестирования одной пробы использовали четыре — пять повторностей, при этом две лунки были контрольными. В качестве контроля использовали стерильную среду Лозина — Лозинского, в которой инфузории должны оставаться живыми.

Исследуемый раствор тестируемых веществ вносили пастеровской пипеткой в лунки планшета в количестве четырех капель, не касаясь поверхности среды с внесенными ранее инфузориями, после чего добавляли 0,5—1,0%-ный р-р трипанового синего.



а

б

2. Инфузории *S. mytilus* в среде, содержащей энтеротоксины *E. coli* (увеличение 2×8): а — через 5 мин экспозиции; б — через 60 мин экспозиции.

Так как тест-система в общем случае представляла собой неоднородную совокупность клеток, их гибель происходила не одновременно, а с некоторым временным разбросом, и включала три этапа: снижение двигательной активности (вращение вокруг своей оси), полная остановка и лизис клеток.

В присутствии энтеротоксинов *E. coli* инфузории *S. mytilus* погибали в течение интервала времени, являющегося функцией концентрации токсинов. Через 60 мин после внесения пробы результат токсикологического анализа фиксировали цифровой фотокамерой, соединенной с ПК Packard Bell IMEDIA X9751 АЮ с программным обеспечением, и с помощью программы Totallab на мониторе осуществляли подсчет погибших (окрашенных) инфузورий (рис. 2).

Численность инфузورий через 60 мин экспозиции рассчитывали по формуле

$$n = \frac{n_2 \cdot 100\%}{n_1},$$

где  $n_1$  — общая численность посаженных инфузورий,  $n_2$  — общая численность инфузورий через 60 мин экспозиции.

**1. Степень токсичности культуральных бесклеточных супернатантов *E. coli*, определяемая по количеству выживших инфузورий *S. mytilus***

Степень токсичности супернатантов <i>E. coli</i>	Выживаемость инфузورий, %
Нетоксичный	100—81
Слаботоксичный	80—50
Токсичный	49—0

Степень токсичности тестируемых бесклеточных супернатантов *E. coli* определяли по количеству выживших инфузорий *S. mytilus*, в соответствии со шкалой, приведенной в таблице 1.

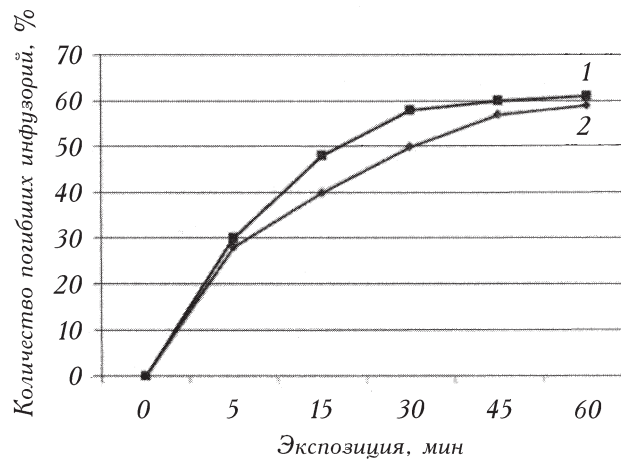
Зависимость гибели инфузорий *S. mytilus* в бесклеточных супернатантах токсигенных штаммов *E. coli* от экспозиции показана на рисунке 3.

Для получения достоверных данных опыт многократно повторяли, затем подсчитывали средний показатель. Чем выше доля лизированных (погибших) инфузорий, тем более токсичным являлся культуральной супернатант и, соответственно, исследуемый штамм *E. coli* — токсигенным (рис. 4).

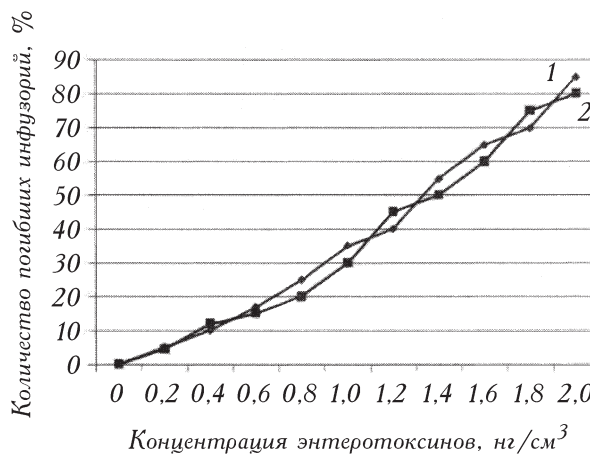
Сравнение порога чувствительности тест-реакций гибели *S. mytilus* и высших животных к энтеротоксинам *E. coli* показало, что инфузории реагировали на концентрации токсинов на один — два порядка ниже, чем теплокровные (табл. 2).

### Заключение

Таким образом, была установлена возможность использования инфузорий *S. mytilus* в качестве тест-объекта для автоматизированного экспресс-анализа энтеротоксинов *E. coli* в объектах окружающей среде. Инфузории быстро и достоверно реагировали на содержание и низкие концентрации энтеротоксинов в малых образцах, а физический преобразователь, состоящий из оптической и элект-



3. Зависимость гибели инфузорий *S. mytilus* в бесклеточных супернатантах токсигенных штаммов *E. coli* от экспозиции. Здесь и на рис. 4: 1 — супернатант LT-продуцирующего штамма; 2 — супернатант ST-продуцирующего штамма.



4. Зависимость гибели инфузорий *S. mytilus* в бесклеточных супернатантах токсигенных штаммов *E. coli* от концентрации энтеротоксинов.



**2. Порог чувствительности тест-реакций гибели *S. mytilus* и высших животных к энтеротоксинам *E. coli***

Тест-реакции	Порог чувствительности тест-реакций к энтеротоксинам <i>E. coli</i>
Лигированная петля кишечника кролика	50—30 мкг/см <sup>3</sup>
Дермoneкротическая проба на кролике	20—15 мкг/см <sup>3</sup>
Отек лап белых мышей	15—10 мкг/см <sup>3</sup>
Анальная проба на мышатах-сосунах	50—40 нг/см <sup>3</sup>
Гибель <i>Stylonichia mytilus</i>	0,4—0,2 нг/см <sup>3</sup>

ронной подсистем, осуществлял подсчет погибших под действием токсинов инфузорий и оценку степени токсичности в автоматическом режиме.

Метод обладает высокой чувствительностью, скоростью, надежностью, универсальностью и малой себестоимостью. Он прост в проведении, поддается инструментализации и автоматизации, а его результаты легко интерпретируемы. По сравнению с тестами на других видах животных, он имеет значительные преимущества в экономической, методической и этической сферах. Рекомендуются применять в условиях лабораторий, не имеющих возможности использовать специальное дорогостоящее оборудование для наблюдения за специфическими тест-реакциями при индикации энтеротоксигенных *E. coli*.

\*\*

*Використовували інфузорій в якості тест-об'єкта для автоматизованого експрес-аналізу ентеротоксинів Escherichia coli. На відміну від простого біотестування, інфузорії Stylonichia mytilus, що виконували функцію біологічного елементу розпізнавання ентеротоксинів, швидко і достовірно реагували на їх вміст і низькі концентрації в малих зразках, а фізичний перетворювач, що складався з оптичної та електронної підсистеми, дозволяв проводити підрахунок загиблих під дією токсинів інфузорій і оцінку ступеня токсичності в автоматичному режимі.*

\*\*

*Ciliates used as a test object for rapid automated analysis of enterotoxins Escherichia coli. Unlike simple bioassay, infusoria Stylonichia mytilus, which function as biological recognition elements enterotoxins, quickly and reliably respond to the content and low concentrations in small samples, and the physical transducer, consisting of optical and electronic subsystems, counting the dead carried out by the action of toxins and ciliates assessment of toxicity in the automatic mode.*

\*\*

1. Балабаньян В.Ю. Разработка системы скрининга лекарственных веществ антиоксидантного и мембраностабилизирующего типов действия: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. — М., 1998. — 24 с.
2. Будников Г.К., Майстренко В.Н., Муринов Ю.И. Вольтамперометрия с модифицированными и ультрамикрoэлектродами. — М.: Наука, 1994. — 239 с.

3. *Винохогов, Д. О.* Биотестирование на культурах инфузорий в диагностической профилактике пищевых отравлений животных // *Вет. патология.* — 2006. — № 1. — С. 90—96.
4. *Ковбасенко В. М., Горобей А. М., Ляшкевич А. А.* Экспресс-метод определения токсичности пищевых продуктов с использованием инфузории *Colpoda steinii* // *Ветеринария в птицеводстве.* — 2002 — № 3. — С. 26—29.
5. *Олійник Л.В.* Ветеринарно-санітарний контроль харчових токсикоінфекцій // *Аграрна наука.* — К., 2004. — 198 с.
6. *Поляков Н.Л.* Новый экспресс-метод определения токсичности мясопродуктов // *Уч. зап. Казан. академии вет. медицины.* — 2006. — Т. 180. — С. 210—219.
7. *Поляков Н.Л., Винохогов Д.О., Винохогов В.О.* Новый экспресс-метод определения токсичности мясопродуктов // *Там же.* — С. 210—219.
8. *Сухарев, Ю.С.* Энтеротоксины *Escherichia coli* (методы получения, очистки, изготовление иммунизирующих препаратов, антитоксических сывороток и диагностических тест-систем на их основе). — Харьков: Коллегиум, 2009. — 92 с.
9. *Эггинс Б.* Химические и биологические сенсоры. — М.: Техносфера, 2005. — 366 с.
10. *Qadri F., Kumar Das S., Faruque A. S. G.* Prevalence of Toxin Types and Colonization Factors in Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated during a 2-Year Period from Diarrheal Patients in Bangladesh // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — Vol. 38, N 1. — P. 27—31.
11. *Thielman N. M., Guerrant R. L.* Acute infectious diarrhea // *N. Engl. J. Med.* — 2004. — Vol. 350, N 1. — P. 38—47.

Харьковская государственная  
зооветеринарная академия

Поступила 12.02.13