

АНАЛИЗ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПРОТОПЛАСТОВ И КЛЕТОК БАКТЕРИЙ В ПРИСУТСТВИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

The article is devoted to the problem of estimation of dangerous xenobiotics in environment by application of biological testing. The aim of work is connected with selection of sensitive forms of bacteria for testing of toxic heavy metals and study their action into protoplasts and cells. In the result of fulfilled research it was selected some sensitive and stable cultures of bacteria and studied the reasons of their stability. It was shown that cell's wall plays the main part in the stability of bacteria to heavy metals. After removing of cell's wall from the stable bacteria their sensitivity to toxic ions was increased. Protoplasts are having not only a higher sensitivity but a lower stability in the presence of heavy metals and can be used for biotesting of toxic xenobiotics in environment.

Ввиду постоянного загрязнения природной среды ксенобиотиками, медленно разлагающимися либо не подвергающимися биодеструкции, они быстрыми темпами накапливаются в окружающей среде, биомассе живых организмов, угрожая их жизнеспособности. Среди таких ксенобиотиков 90% составляют искусственно синтезируемые органические вещества и 10% – различные неорганические вещества, в частности ионы тяжелых металлов, наиболее часто обнаруживаемые в сточных водах промышленных предприятий.

Около 1000 наименований наиболее опасных химических веществ внесены в список приоритетных загрязнителей, подлежащих контролю. Реально же контролируемое их количество значительно меньше. В настоящее время складывается ситуация, когда скорость синтеза новых химических веществ на несколько порядков превышает скорость разработки методов их обнаружения и оценки опасности. В результате постоянно увеличивается вероятность присутствия в окружающей среде никем не контролируемых вредных веществ.

Существующие физические и физико-химические методы анализа в принципе не позволяют зарегистрировать все чужеродные вещества, а также ответить на основной вопрос, насколько опасна та или иная комбинация ксенобиотиков и продуктов их превращения.

Только биологические методы в состоянии с высокой чувствительностью, надежностью, точностью и минимальными затратами решить данную проблему. В этой связи сложилось новое научное направление – биоаналитика [1, 2]. Большое внимание в биоаналитике у нас в стране и за рубежом уделяется разработке экспресс-методов биоиндикации, биотестирования и биосенсорного анализа, позволяющих быстро выявлять присутствие опасных веществ в воде, почве, а также в сельскохозяйственном сырье и пищевых продуктах.

Одной из проблем разработки биологических методов анализа является отбор чувствительных и селективных биообъектов к отдельным ксенобиотикам. Перспективными биообъектами для этих целей могут быть клетки и протопласты микроорганизмов [3].

Целью данной работы являлся отбор чувствительных форм микроорганизмов и анализ влияния ионов тяжелых металлов на жизнеспособность клеток и протопластов.

В работе использовали чистые культуры клеток из коллекции кафедры биотехнологии и биоэкологии БГТУ. Суточные культуры исследуемых бактерий разводили свежим питательным бульоном в 4 раза и выращивали при 30°C с аэрацией в течение 2 ч, после чего методом посева разведений на чашки с агаризованной питательной средой подсчитывали начальную концентрацию клеток.

Отбор чувствительных и устойчивых форм микроорганизмов осуществляли с помощью метода диффузии ксенобиотиков в агар, определяя диаметр зон подавления роста микроорганизмов [4].

Измерение адсорбционной способности микроорганизмов по отношению к ионам тяжелых металлов осуществляли стационарным методом, измеряя колориметрически концентрации свободных металлов в надосадочной жидкости после осаждения клеток центрифугированием (6000 об/мин, 10 мин) и строя изотермы сорбции.

Протопласты Gr(+) бактерий получали путем обработки клеток в логарифмической фазе роста раствором (1 мл, 1000 мкг/мл) лизоцима в жидкой гипертонической среде (ГС) в течение 30 мин при 30°C с последующей двукратной отмывкой от лизоцима центрифугированием в ГС [5].

Для анализа физиологического состояния тест-культур микроорганизмов использовали величины тепловых потоков, зарегистрирован-

ных микрокалориметром МКМ-Ц в соответствии с [6].

В качестве неорганических ксенобиотиков использовали соли тяжелых металлов: Cd^{2+} , Cr^{6+} , являющиеся сильными токсикантами и часто встречающиеся в сточных водах. Концентрации солей в среде варьировали в диапазоне 10^{-2} – 10^{-9} моль/л.

Результаты измерений обрабатывали статистически, используя программное обеспечение Microsoft Excel.

Жизнеспособность микроорганизмов при воздействии ксенобиотиков характеризуется их чувствительностью и устойчивостью. Под чувствительностью понимают способность организмов реагировать на присутствие ксенобиотиков в среде изменением своих функций жизнедеятельности. Чувствительность микроорганизмов определяется величиной пороговой концентрации вещества, при которой наблюдается достоверное изменение жизненных функций клеток. Под устойчивостью клеток понимается их способность сохранять жизнеспособность в присутствии ксенобиотика до момента гибели или потери способности к размножению. Устойчивость клеток можно охарактеризовать минимальной концентрацией вещества, подавляющей их функции жизнедеятельности.

Для процессов биотестирования ксенобиотиков важно использовать наиболее чувствительные формы микроорганизмов. Поэтому на первом этапе методом диффузии ксенобиотиков в агар были отобраны микроорганизмы, для которых наблюдались максимальные и минимальные зоны подавления роста клеток. Это указывало, соответственно, на их повышенную чувствительность и повышенную устойчивость к отдельным ксенобиотикам по отношению к другим микроорганизмам. На рис. 1 представлена зависимость диаметра зон подавления роста клеток в присутствии катионов кадмия от вида изученных микроорганизмов. Как видно из рис. 1, микроорганизмы проявляли различную чувствительность к токсиканту. Наибольшая зона подавления роста при действии Cd^{2+} наблюдалась для штамма клеток *Bacillus subtilis* 1/3, который был отобран для дальнейшего анализа. Аналогичным образом проверена чувствительность клеток и к другим ионам тяжелых металлов. Чувствительность микроорганизмов разных таксономических групп различалась на 1–2 порядка к каждому из выбранных токсикантов.

На втором этапе изучали причину устойчивости и чувствительности клеток к ксенобиотикам. Для этого проведен анализ адсорбционных

свойств чувствительного (*B. subtilis* 1/3) и устойчивого (*B. subtilis* F58) штаммов бактерий к солям тяжелых металлов (рис. 2).

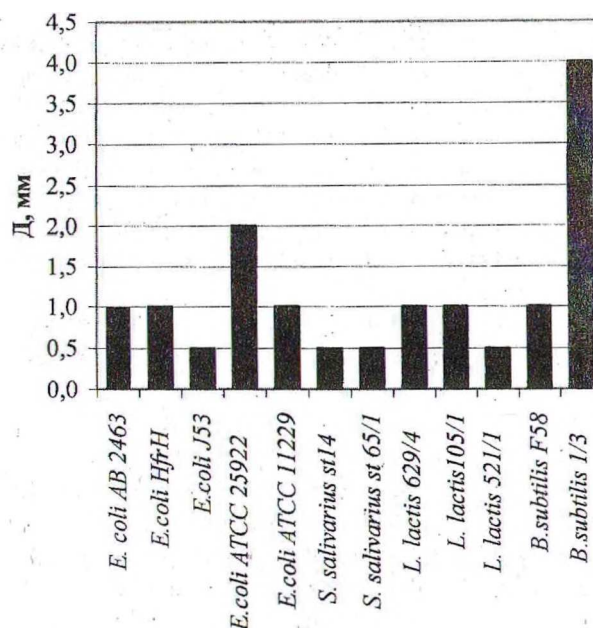


Рис. 1. Диаметр зон подавления роста микроорганизмов в присутствии Cd^{2+} (10^{-5} М)

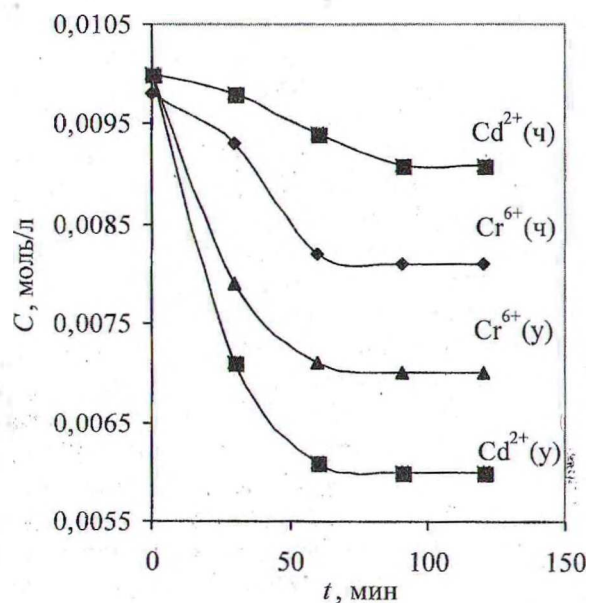


Рис. 2. Кинетика адсорбции катионов тяжелых металлов устойчивыми (y) и чувствительными (ч) штаммами клеток *B. subtilis*

Наличие фазы быстрой сорбции указывает на участие поверхностных структур клеток в связывании тяжелых металлов.

Изотермы сорбции хорошо описывались уравнением Ленгмюра:

$$A = A_{\max} \cdot K \cdot C / (K \cdot C + 1), \quad (1)$$

где $A = (C_0 - C)/N_0$; C_0 , C – начальная и равновесная концентрации солей металлов; N_0 – концентрация клеток; $A_{\max}$, K – максимальная удельная емкость и константа связывания металлов. Это позволило определить значения $A_{\max}$ и K для отдельных штаммов клеток.

Сравнение связывания катионов металлов чувствительными и устойчивыми формами клеток показало, что устойчивые микроорганизмы отличаются высокой скоростью связывания металлов. Культуры клеток с высокой жизнеспособностью в присутствии тяжелых металлов обладали также повышенной селективностью и сорбционной емкостью. Полученные данные указывают на то, что в механизмах устойчивости бактерий к тяжелым металлам важную роль играет их клеточная стенка. Поэтому представляло интерес выяснить, как влияет удаление клеточной стенки на чувствительность и устойчивость микроорганизмов к тяжелым металлам.

Анализ изменения физиологической активности клеток и протопластов в присутствии катионов кадмия проводился микрокалориметрическим методом. На рис. 3 приведены дозные зависимости мощности тепловыделения протопластов и клеток *B. subtilis* F58 от логарифма концентрации катионов кадмия в среде.

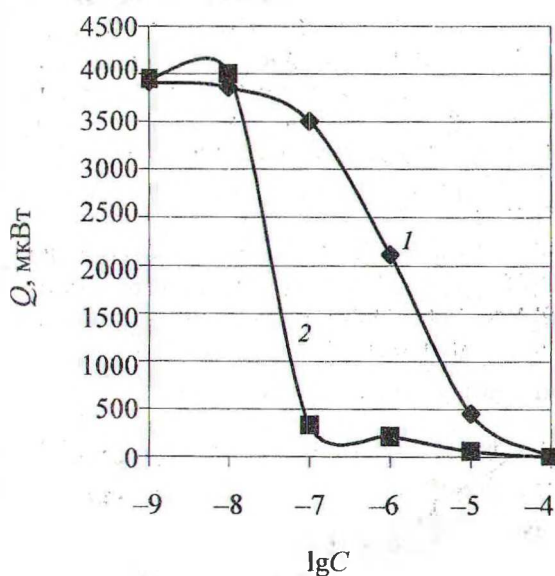


Рис. 3. Зависимость мощности тепловыделения протопластов (1) и клеток (2) *B. subtilis* F58 от логарифма концентрации ионов Cd^{2+} в среде

Как видно из рис. 3, ионы кадмия подавляли тепловыделение микроорганизмов уже при концентрации Cd^{2+} выше 10^{-8} М, при этом чувствительность протопластов к ионам кадмия была на два порядка выше, по сравнению с клеточной формой. Устойчивость протопластов в присутствии Cd^{2+} также значительно снизилась по сравнению с клетками. Так, протопласты теряли свою жизнеспособность при концентрации ионов металла 10^{-7} М, тогда как клетки – при 10^{-5} М.

Таким образом, полученные результаты указывают на важную роль клеточной стенки в защите микроорганизмов от действия токсичных металлов и свидетельствуют о повышении чувствительности и снижении устойчивости протопластов к ионам тяжелых металлов по сравнению с клетками. Это позволяет использовать протопласты бактерий для биотестирования токсичных тяжелых металлов в анализируемых средах.

Литература

1. Туманов А. А. Биоаналитика и экомониторинг // Журнал аналитической химии. – 2005. – Т. 60. – № 12. – С. 1236–1238.
2. Кудрин А. Н., Ананин В. В., Балабаньян В. Ю., Галушкина Л. Р., Дассайе Ч. Р., Акимов П. П. Система экспресс-методов интегральной оценки биологической активности индивидуальных веществ и комплексных препаратов на биологических объектах // Российский химический журнал. – 1997. – Т. XLI. – № 5. – С. 114–119.
3. Игнатенко А. В. Исследование влияния ксенобиотиков на протопласты и клетки микроорганизмов // Труды БГТУ. Серия IV. Химия и технология орган. в-в. – 2004. – Вып. XII. – С. 142–145.
4. Белясова Н. А. Игнатенко А. В., Ивчик В. С., Гриц Н. В. Совершенствование метода биотестирования ксенобиотиков // Материалы, технологии, инструменты. – 2005. – Т. 10. – № 4. – С. 90–93.
5. Биохимия и молекулярная биология: Теория и методы: Учеб. пособие / Н. А. Белясова, Н. В. Гриц. – Мн.: БГТУ, 2002. – 306 с.
6. Игнатенко А. В., Гриц Н. В. Микробиологические, органолептические, визуальные методы контроля качества пищевых товаров. Микрокалориметрия: Лаб. практикум. – Мн.: БГТУ, 2003 – 114 с.