

О. П. Собошук, ст. преподаватель; В. Е. Калуцкий, вед. науч. сотрудник БГУ

ИЗУЧЕНИЕ СИСТЕМЫ «МОХ – МИКРООРГАНИЗМЫ – СУЛЬФАТ МЕДИ»

This work is dedicated to heavy metal salt effect on 15 microorganism stems of *Pseudomonas aeruginosa*, and defensive properties of natural sorbent, moss *S. cuppidatum* for them. Experimentally it has been shown that minimal copper ion inhibitory concentration is to be found at an interval $4,0 \cdot 10^{-5}$ – $12,0 \cdot 10^{-5}$ M and minimal bactericidal concentration is $20,0 \cdot 10^{-5}$ M. It has been discovered, that natural lower plants, moss, *S. cuppidatum*, added to the system «microorganisms-copper sulphate», has defensive effect for the microorganisms and it decreases the microorganisms sensitiveness to the metal, from $3,2 \cdot 10^{-5}$ to $20,0 \cdot 10^{-5}$ M. Defensive action mechanism of the moss natural sorbent has been proposed, the essence of which is that moss structure containing pectinated components connect copper ions chemically and it creates stable, minimally dissociated connections, as a result copper ion concentration in solution is getting lower. The work has practical application as it directly models natural processes in the environment.

Известно, что растения сорбируют положительно заряженные ионы металлов, радионуклидов и любых других соединений и частиц, находящихся в окружающей среде [1–9].

В условиях все большего химического загрязнения природы и техногенной трансформации экосистем отмечается повышенный интерес к низшим растениям (водоросли, лишайники, грибы, мхи), которые наиболее чувствительны к изменению концентрации вредных веществ, в особенности тяжелых токсичных металлов в почве, воде и воздухе. Изучение патологических изменений этих растений, а также определение в них содержания тяжелых металлов позволяет следить за параметрами экосистем и за уровнем загрязнения окружающей среды [8, 9].

Микроорганизмы также очень чувствительны к тяжелым металлам, и даже незначительные концентрации губительно сказываются на их жизнедеятельности. Это негативное действие тяжелых металлов начинается с того, что они как положительно заряженные частицы притягиваются к отрицательно заряженным мозаичным структурам клеточных мембран и затем могут прочно фиксироваться на поверхности либо проникать внутрь клеток, оказывая многогранное отрицательное действие на функцию клеточных структур. Это может проявляться в возникновении мутаций, нарушении метаболизма и, в конечном итоге, при избыточных концентрациях привести к гибели клетки. Так как в основании экологической пирамиды находятся растения и микроорганизмы, то нарушение сложившихся в результате длительной эволюции их взаимодействий с окружающей средой может привести к глобальным последствиям существования животного мира [10].

В реальной биосфере сосуществуют одновременно и растения, и микроорганизмы, и тяжелые металлы, например в почвах, водных

системах. И, как оказывается, растения и микроорганизмы являются конкурирующими биоконпонентами по отношению к металлам. При этом анализ известных научных исследований показывает, что тяжелые токсичные металлы, находящиеся в водных системах в виде двух- и более зарядных катионов, поглощаются растительными тканями и даже связываются их определенными структурными компонентами, например пектиновыми соединениями либо другими полиуроновыми кислотами, очень прочными химическими связями [11]. Интересно отметить, что авторы [12] из растений и растительных суспензионных культур выделили пептиды, образующие комплексы с тяжелыми металлами (кадмий, цинк, медь). Их структуру установили как $(\gamma\text{-глутаминовая кислота} - \text{цистеин})_n - \text{глицин}$; $n = 2-11$. Эти пептиды названы фитохелатинами, они индуцируются из всех автотрофных растений и некоторых грибов. Микроорганизмы поглощают ионы металлов значительно менее прочными связями [13, 14]. В результате этого загрязняющие окружающую среду токсичные тяжелые металлы в значительной степени сорбируются растительными материалами, по видимому, таким образом защищая от вредного токсичного воздействия находящееся в этой системе сообщество микроорганизмов. Мы полагаем, что в результате длительной эволюции биосферы и возникли в природе такие протекторы, как растения.

Целью работы является изучение модельной системы «растение – микроорганизмы – тяжелый металл». В качестве растения взят мох *Sphagnum cuppidatum*, в качестве микроорганизмов – *Pseudomonas aeruginosa*, из металлов – медь ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).

Исследовали чувствительность *P. aeruginosa* по отношению к меди методом разведения в плотной питательной среде

сульфата меди. На среды с различными концентрациями ионов меди высевали по 15 колоний *P. aeruginosa* и инкубировали 24 ч при $t = 37^\circ\text{C}$.

Воздействие ионов меди на микроорганизмы в тройной системе «мох – сульфат меди – микроорганизм» изучали по следующей методике. Пробы мха в количестве $(0,0500-0,2000) \pm 0,0005$ г помещали в стеклянные флаконы и добавляли по 49 мл раствора сульфата меди различной концентрации, для более быстрого протекания реакции ионообменной сорбции содержимое интенсивно перемешивали. Затем в бинарную систему добавляли суспензию микроорганизмов в концентрации $3,4 \cdot 10^9$ кл./мл объемом 1,0 мл и тщательно перемешивали. Инкубацию проводили в термостате при $t = 37^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Жизнеспособность микроорганизмов определяли высевом суспензии микроорганизмов на агаризованные питательные среды с последующим подсчетом колоний на чашках Петри.

Мох, являющийся низшим растением, очень сложен по своему химическому составу. Преобладающими компонентами клеточных стенок мха являются полисахариды и их производные [15]. Прежде всего это целлюлоза, макромолекулы которой, ориентированные параллельно друг другу, образуют жесткий кристаллический каркас. Снятые нами рентгенограммы образцов мха свидетельствуют о наличии в его составе кристаллических образований модификаций целлюлозы I и целлюлозы II. А электронно-микроскопическое исследование при помощи

сканирующего микроскопа JEM-100 С выявило его весьма неоднородную морфологическую структуру и наличие различных по форме, текстуре и размерам фрагментов, составных частей. Целлюлозные цепи инкрустированы другими полисахаридами, которые не имеют кристаллической структуры, часто разветвлены и разнообразны по химическому строению. Последние, прежде всего гемицеллюлозы, представляющие собой легко гидролизуемые, меньшей молекулярной массы, чем целлюлоза, полиуглеводы на основе гексоз и пентоз, и пектины, придают им способность химически связывать положительно заряженные ионы и частицы. Пектиновые полисахариды – это сополимеры уроновых кислот и других моносахаридов. Полиуроновые кислоты представлены преимущественно поли- α -D-галактуроновой или пектовой кислотой, у которой карбоксильные группы могут быть частично этерифицированы метиловым спиртом. Неорганическая часть мхов представлена металлами (натрий, калий, магний, кальций, железо и др.), неметаллами (кремний, сера, фосфор и др.). В состав органической части, кроме этого, входят липоиды, пигменты, а также фенольное соединение сфагнол, обладающее некоторым противомикробным действием.

Результаты по определению чувствительности штаммов микроорганизмов *P. aeruginosa* по отношению к ионам меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) приведены в табл. 1.

Таблица 1
Чувствительность штаммов ($n = 15$) *Pseudomonas aeruginosa* к ионам меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Штаммы микроорганизмов	Молярность, моль/л $\cdot 10^{-5}$						
	0,8	2,0	3,2	4,0	12,0	20,0	40,0
1	++	++	++	++	-+	--	--
2	++	++	++	-+	-+	--	--
3	++	++	++	-+	-+	--	--
4	++	++	++	++	-+	--	--
5	++	++	++	++	-+	--	--
6	++	++	++	++	-+	--	--
7	++	++	++	-+	-+	--	--
8	++	++	++	-+	-+	--	--
9	++	++	++	-+	-+	--	--
10	++	++	++	++	-+	--	--
11	++	++	++	-+	-+	--	--
12	++	++	++	-+	-+	--	--
13	++	++	++	-+	-+	--	--
14	++	++	++	++	-+	--	--
15	++	++	++	-+	-+	--	--

Примечание. «+» – рост микроорганизмов, «-» – отсутствие роста.

Видно, что при концентрации ионов меди $3,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л и меньше наблюдается рост микроорганизмов; при концентрациях в интервале $(4,0-12,0) \cdot 10^{-5}$ моль/л наблюдается статическое действие, т. е. на среде с солью металла рост у части штаммов отсутствует, но при пересеве их на среду без ионов металла рост микроорганизмов возобновляется. Бактериоцидное действие наблюдается при концентрации $20,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л и выше.

В табл. 2 приведены результаты по изучению воздействия ионов меди на исследуемые штаммы микроорганизмов в присутствии различных количеств мха.

Как нами было показано ранее [3], моховой сорбент избирательно связывает двухзарядные катионы металлов, особенно переходных и тяжелых, которые способны связываться с карбоксилатными группами сорбента, кроме основного кулоновского взаимодействия дополнительным комплексообразованием. Как видно из полученных результатов (табл. 2), моховой сорбент действительно прочно связывает ионы меди из достаточно разбавленных растворов. Если минимально бактерицидная концентрация исследуемой соли (табл. 1) составляет $20,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л, то в тройной системе присутствие сорбента мха, смещает эту концентрацию до значения $3,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Если полная выживаемость исследуемых штаммов микро-организмов наблюдается при концентрации $3,2 \cdot 10^{-5}$ моль/л и менее, то введение в систему мха существенно увеличивает эту концентрацию ($2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л в исходном состоянии). Это означает, что значительная часть ионов меди химически поглощается мхом и в равновесии концентрация соли металла имеет величину $3,2 \cdot 10^{-5}$ и менее.

Для количественной характеристики протектирующего (защитного) действия растительного сорбента мха мы предлагаем ввести специальный параметр и обозначить его протектирующей способностью (ПС).

Протектирующая способность сорбента – это минимальное его количество, выраженное в граммах, при прибавлении которого к 1 л минимально бактерицидной концентрации токсичного агента, например металла, наблюдается рост микроорганизмов.

Произведем подсчет протектирующей способности мха исходя из полученных результатов. Минимально бактерицидная концентрация сульфата меди по отношению к микроорганизмам составляет $20,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л (табл. 1). Исходя из наших экспериментальных результатов, при добавлении к 50 мл раствора сульфата меди с этой минимально бактерицидной концентрацией 0,200 г и 0,100 г мха сохраняется жизнедеятельность микроорганизмов, а в присутствии 0,050 г мха наблюдается явное угнетение роста. Таким образом, 0,100 г мха полностью защищает рост микроорганизмов в объеме 50 мл токсиканта. Следовательно, для защиты микроорганизмов в объеме 1 л минимально бактерицидной концентрации этого токсиканта требуется в 20 раз больше мха, т. е. – 2 г.

Эта найденная величина и выражает численно значение протектирующей способности нашего сорбента – мха *S. cuspidatum*.

Величина протектирующей способности зависит от природы микроорганизма, его чувствительности к данному токсиканту и от химической структуры самого сорбента; последнее будет определяться в первую очередь в селективности сорбции токсиканта сорбентом.

Таблица 2

Воздействие ионов меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) на штаммы *Pseudomonas aeruginosa* в системе «мох – микроорганизмы – сульфат меди»

Навеска мха <i>S. cuspidatum</i> , г	Исходная концентрация $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, моль/л	Чувствительность штаммов <i>P. aeruginosa</i> к ионам меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	Концентрация клеток <i>P. aeruginosa</i> после культивирования, кл./мл
0	0	++	$3,9 \cdot 10^9$
0,200	0,000 05 ($0,5 \cdot 10^{-4}$)	++	$3,9 \cdot 10^9$
0,200	0,000 10 ($1,0 \cdot 10^{-4}$)	++	$1,9 \cdot 10^9$
0,200	0,000 20 ($2,0 \cdot 10^{-4}$)	++	$1,2 \cdot 10^9$
0,100	0,000 20 ($2,0 \cdot 10^{-4}$)	++	$3,1 \cdot 10^9$
0,050	0,000 20 ($2,0 \cdot 10^{-4}$)	—+	$2,0 \cdot 10^5$
0,200	0,001 60 ($1,6 \cdot 10^{-3}$)	—+	$1,0 \cdot 10^4$
0,200	0,003 0 ($3,0 \cdot 10^{-3}$)	—	0
0,200	0,004 0 ($4,0 \cdot 10^{-3}$)	—	0

Выводы

В работе исследована чувствительность 15 штаммов *P. aeruginosa* по отношению к ионам меди и показано, что минимально ингибирующая концентрация составляет $(4,0-12,0) \cdot 10^{-5}$ моль/л, минимально бактерицидная – $20,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л (в расчете на медь).

Найдено, что природное сорбционно-активное низшее растение мох *Sphagnum cuspidatum* в тройной системе «мох – микроорганизмы – сульфат меди» оказывает защитное действие на микроорганизмы, т. е. понижает чувствительность микроорганизмов к данному металлу от $3,2 \cdot 10^{-5}$ до $20,0 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Предложена новая характеристика защитного действия сорбента мха, названная нами протектирующей способностью сорбента, которая численно определяется как минимальное количество мха, выраженное в граммах, при прибавлении которого к 1 л минимально бактерицидной концентрации токсического агента наблюдается полноценный рост микроорганизмов.

Найденная в результате проделанной работы величина ПС составила 2 г.

Литература

1. Никитин Н. И. Химия древесины и целлюлозы. – М.; Л.: АН СССР, 1962. – 450 с.
2. Матвеев Н. М., Прохорова Н. В., Павловский В. А. Тяжелые металлы в растениях Самарской Луки // Самарская Лука. – 1995. – № 6. – С. 247–251.
3. Собещук О. П., Капуцкий В. Е. Сорбция металлов мхом и ее эколого-биологическая роль в природе // Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология орган. в-в. – Вып. XIII. – 2005. – С. 75–77.
4. Нифонтова М. Г. Лишайники и мхи – индикаторы радиоактивного загрязнения // Проблемы ботаники на рубеже XX–XXI вв.: Тез. докл., представл. 2 (10) Съезду Рус. ботан. в-ва. – СПб., 1998. – Т. 2. – С. 74.
5. Accumulation of metals in the cell walls of the liverwort, *Scapania undulata* / Yoshimura Etsuro, Sato Nobuyuki, Nishitawa Naoko K., Satake Kenich, Mori Satoshi // J. Environ. Sci. and Health. A. – 2000. – 35, N 6. – P. 837–847.
6. Маевська С. М., Кардыш О. Р., Дешків Л. О. Распределение свинца и кадмия в клетках гаметофита *Plagiomnium* // Укр. ботан. журн. – 2000. – 57. – № 3. – С. 310–315.
7. Loppi Stefano, Giomarelli Barbara, Bargagli Roberto Lichens and mosses as biomonitors of trace elements in a geothermal area (Mt Amiata, central Italy) // Gryptogamie. Mycol. – 1999. – 20. – N 2. – P. 119–126.
8. Sergio C., Seneca A. Biological responses of *Sphagnum auriculatum* to warter pollution by heavy metals // Cryptogamie Bryol. – 1992. – 13. – N 2. – P. 155–163.
9. Кузнецова Н. Использование растений в качестве биомониторов // Сб. науч. работ студентов и аспирантов ВГПУ. – 1997. – № 5. – С. 224–234.
10. Одум Ю. П. Экология: В 2 т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 328 с.; Т. 2. – 376 с.
11. Капуцкий В. Е. Исследование физико-химических свойств монокарбоксилцеллюлозы. – Дисс.... канд. хим. наук. – Мн.: БГУ, 1971. – 145 с.
12. Zenk Meinhart H. Heavy metal detoxification in higher plants – a review // Gene. – 1996. – 179, N 1. – P. 21–30.
13. Ларкин А. М., Коломина Т. П., Лалов В. В., Осокина Н. В. Взаимодействие ионов меди с клетками метанооксиляющих микроорганизмов // Лимитирование и ингибирование роста микроорганизмов: Всесоюз. конф. – Пущино, 1989. – С. 53.
14. Щербаков С. С., Потий В. С., Давидов Е. Р. Условия сорбции катионов тяжелых металлов препаратами клеточных оболочек дрожжей // Изв. вузов. Пищ. технология. – 1995. – № 5–6. – С. 22–26.
15. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений: В 2 т.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1986. – Т. 1. – 393 с.