

УДК 579.8:546.4

О. Ф. Рильський

Запорізький національний університет

УТВОРЕННЯ МАЛОНОВОГО ДІАЛЬДЕГІДУ ПІД ДІЄЮ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ЯК ІНДИКАТОРА РУЙНУВАННЯ ПІГМЕНТСИНТЕЗУВАЛЬНИХ МЕМБРАННИХ ЦЕНТРІВ БАКТЕРІЙ

Встановлено, що з ростом концентрацій іонів металів Hg^{2+} та Cu^{2+} у живильному середовищі зростає концентрація малонового діальдегіду у клітинах бактерій *Serratia marcescens*. Різке зростання концентрації малонового діальдегіду ($Hg^{2+} - 14,37 \pm 0,76$ та $Cu^{2+} - 24,75 \pm 0,59$) збігається з концентраціями, з яких починається втрата пігментсинтезувальної здатності бактерій під впливом цих металів. Це свідчить, що одним із вірогідних механізмів втрати пігментів у бактерій може бути ураження вільними радикалами пігментсинтезувальних ділянок мембран.

А. Ф. Рыльский

Запорожский национальный университет

ОБРАЗОВАНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ КАК ИНДИКАТОРА РАЗРУШЕНИЯ ПИГМЕНТСИНТЕЗИРУЮЩИХ МЕМБРАННЫХ ЦЕНТРОВ БАКТЕРИЙ

Установлено, что с ростом концентраций ионов металлов Hg^{2+} и Cu^{2+} в питательной среде увеличивается концентрация малонового диальдегида в клетках бактерий *Serratia marcescens*. Резкое увеличение концентрации малонового диальдегида ($Hg^{2+} - 14,37 \pm 0,76$ и $Cu^{2+} - 24,75 \pm 0,59$) совпадает с концентрациями, с которых начинается потеря пигментсинтезирующей способности бактерий под влиянием этих металлов. Это свидетельствует, что одним из вероятных механизмов потери пигментов у бактерий может быть повреждение свободными радикалами пигментсинтезирующих участков мембран.

A. F. Rylsky

Zaporizhzhya National University

FORMATION OF MALONIC DIALDEHYDE UNDER HEAVY METALS INFLUENCE AS AN INDICATOR OF DESTRUCTION OF PIGMENT- SYNTHESIZING MEMBRANOUS CENTRES OF BACTERIA

It was established that with Hg^{2+} and Cu^{2+} ions' concentrations increasing in a nutrient medium the concentration of malonic dialdehyde in cells of bacteria *Serratia marcescens* increases. The sharp raise of malonic dialdehyde (14.37 ± 0.76 for Hg^{2+} and 24.75 ± 0.59 for Cu^{2+}) coincides with metals' concentrations which entail the loss of pigment-synthesizing ability of bacteria. It specifies that one of possible mechanisms of pigments loss in bacteria can be a damage by free radicals of pigment-synthesizing sections of membranes.

Вступ

Важкі метали – один із найнебезпечніших поллютантів навколишнього середовища, кількість яких у довкіллі постійно зростає. Зважаючи на те, що метали є важливою складовою частиною земної кори та широко розповсюджені в біосфері, вірогідно з

прадавніх часів багато з них стали використовуватися клітинами організмів різних еволюційних рівнів як необхідні компоненти для нормального функціонування живих систем. У ході еволюції бактерії адаптувалися до підвищеного вмісту іонів металів у навколишньому середовищі.

Виділяють декілька механізмів стійкості бактерій до іонів важких металів: позаклітинний бар'єр, активний транспорт іонів металів із клітини, відновлення іонів металів, внутрішнє та зовнішнє зв'язування іонів металів специфічними компонентами клітини в цитоплазмі або в периплазматичному просторі чи у зовнішній мембрані [5; 8; 10].

Незважаючи на існуючі механізми захисту від підвищених концентрацій металів у середовищі, за дуже високих концентрацій починається руйнування клітинних структур. Важливий індикатор руйнування мембранних структур – поява малонового діальдегіду (МДА), який з'являється в результаті перекисного окислення ліпідів. У відповідь на різні стресові впливи (зневоднення, ультрафіолетове опромінення, високі концентрації важких металів, низькі та високі температури), у клітинах відбувається збільшення вмісту МДА, що пов'язано з активацією у цих умовах вільнорадикальних реакцій. МДА – біфункціональний альдегід, здатний утворювати шифові основи з аміногрупами білка, виступаючи як зшивальний агент. У результаті утворюються нерозчинні білок-ліпідні комплекси, що мають назву пігментів зношення або ліпофусцинів. Таким чином, вміст МДА може бути показником активності окисних процесів, зумовлених кисневими радикалами [1; 3; 7].

Відомо, що пігменти бактерій *S. marcescens* локалізуються в мембрані та клітинній стінці [9; 11]. Тому пошкодження мембранних структур вільними радикалами, які утворюються при «металевому» стресі, можуть призводити до зниження пігментсинтезувальної здатності бактерій та появи малонового діальдегіду в клітині.

Зважаючи на це, мета нашої роботи – встановити зв'язки між впливом металів на пігментсинтезувальну здатність бактерій та концентрацією МДА в бактеріальній культурі.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використовували 18-годинну культуру бактерій *Serratia marcescens* MP-141, отриману з колекції мікроорганізмів відділу мікробіології очищення води Інституту колоїдної хімії та хімії води НАН України. Контролем були бактерії, вирощені на твердому середовищі МПА без металу.

Культивування проводили в термостаті при температурі +28...+29 °С. Бактерії засівали на поверхню МПА, приготування якого вели на розчинах солей металів. Щільність бактеріальної суспензії була 10^6 кл./мл. Бактеріальну культуру засівали суцільним газоном. Облік результатів проводили через 48 годин культивування. У дослідженнях використовували солі: $Cu(NO_3)_2$ та $Hg(NO_3)_2$.

Визначення вмісту МДА у бактеріальній біомасі засноване на його реакції з 2-тіобарбітуровою кислотою (ТБК), у результаті якої утворюється забарвлений продукт із максимумом поглинання при $\lambda = 532$ нм.

Бактеріальну біомасу отримували шляхом змиву культури *S. marcescens* з МПА та 15-хвилинного центрифугування при $n = 7\ 000$ обертів/хв. Наважку бактеріальної біомаси (0,35 г) подрібнюють і розтирають у фарфоровій ступці з 3 мл дистильованої води. До гомогенату додають 3 мл трихлороцтової кислоти (ТХО) й гомогенізують вдруге. З отриманого гомогенату відбирають у мірні пробірки з притертими пробками 2 проби по 2 мл. До однієї з них додають рівний об'єм (2 мл) ТХО і цю пробу у подальшому використовують як контроль при спектрофотометрії. До другої проби додають 2 мл розчину ТБК. Проби прогривають 30 хв на киплячій водяній бані, потім

охолоджують і центрифугують 10 хв при 3000 об./хв. Супернатант відбирають шприцом у пробірки та аналізують значення оптичної густини на спектрофотометрі СФ-42 ($\lambda = 532$ нм).

Кількість МДА (X) в бактеріальній біомасі виражають у наномолях МДА на 1 г сухої маси та розраховують за формулою:

$$X = \frac{D_{532} * 1000000 * V * A}{H * \varepsilon},$$

де X – кількість МДА у бактеріальній біомасі (нмоль/г), D_{532} – значення оптичної густини при ($\lambda = 532$ нм), V – об'єм реакційної суміші (мл), A – відношення загального об'єму витяжки до об'єму проби, взятої для визначення МДА, H – наважка бактеріальної біомаси (г), ε – молярний коефіцієнт екстинції, рівний 155 000 л/(см·моль) [6].

Статистична обробка отриманих результатів проведена стандартними методами варіаційної статистики [4].

Результати та їх обговорення

Попередніми нашими дослідженнями встановлено, що пігментсинтезувальна здатність *S. marcescens* пригнічується повністю за концентрації Cu^{2+} в межах 90–100 мг/л, а ріст культури припиняється при 120–140 мг/л. Зважаючи на це, для дослідження зв'язку пігментсинтезувальної здатності бактерій *S. marcescens* із рівнем маломовного діальдегіду в клітинах були вибрані концентрації 80 та 100 мг/л: 80 мг/л Cu^{2+} – концентрація, яка межує з початком втрати пігментсинтезувальної здатності клітин, а 100 мг/л – концентрація, за якої пігмент не синтезується.

Аналіз отриманих результатів (табл.) показує, що за концентрації 80 мг/л Cu^{2+} у середовищі концентрації МДА в контролі ($11,24 \pm 1,50$) і в досліді ($10,87 \pm 0,49$) достовірно не відрізняються. А для культури бактерій *S. marcescens*, що зазнала впливу Cu^{2+} в концентрації 100 мг/л, – вміст МДА становить $24,75 \pm 0,59$, що більше ніж удвічі перевищує концентрацію МДА в контролі ($11,24 \pm 1,50$).

Таблиця

Вплив Cu^{2+} на пігментсинтезувальну здатність *S. marcescens* та утворення МДА

Показники	Контроль на МПА	Концентрація Cu^{2+} , мг/л	
		80	100
Ріст	++++	+++	+
Пігмент	++++	+	–
МДА	$11,24 \pm 1,50$	$10,87 \pm 0,49$	$24,75 \pm 0,59$

Примітки: ++++ – суцільний ріст або пігментоутворення, +++ – добрий ріст або пігментоутворення, ++ – помірний ріст або пігментоутворення, + – слабкий ріст або пігментоутворення, – – відсутність росту або пігментоутворення.

Це свідчить, що наявність у живильному середовищі іонів Cu^{2+} у концентрації 80 мг/л ще не викликає суттєвого пошкодження мембранних структур, на яких відбувається синтез продигіозину – пігменту *S. marcescens*. Таке пошкодження починається лише за концентрації Cu^{2+} 100 мг/л, що збігається з утратою пігментсинтезувальної здатності.

Як у випадку з Cu^{2+} , так і у випадку Hg^{2+} попередньо встановлювали концентрацію Hg^{2+} , з якої втрачається синтез пігменту в *S. marcescens* та припиняється ріст культури. Втрата синтезу пігменту спостерігається за концентрації ртуті 1,5–2,0 мг/л, а припинення росту культури – з 2,5–3,0 мг/л. Тому у досліді використано концентрації 0,5 мг/л, за якої пігментсинтезувальна здатність майже не відрізняється від контролю, і 1,5 мг/л – концентрація, з якої починається повна втрата пігменту.

Отримані результати свідчать, що рівень МДА за дії іонів Hg^{2+} зростає пропорційно концентрації металу. За концентрації Hg^{2+} 0,5 мг/л вміст МДА становить $12,15 \pm 0,69$ нм/г, а за концентрації Hg^{2+} 1,5 мг/л – $14,37 \pm 0,76$ нм/г.

Встановлена залежність є достовірною лише для концентрації іонів Hg^{2+} – 1,5 мг/л. Ці дані корелюють (із ростом концентрації металу зростає концентрація МДА) із результатами дослідів, які проводились на рослинах [2; 7].

Висновки

Значне зростання концентрації МДА в клітинах *S. marcescens* (до $24,75 \pm 0,59$ – Cu^{2+} , до $14,37 \pm 0,76$ – Hg^{2+}) відповідає концентраціям металів, з яких спостерігається втрата пігментсинтезувальної здатності бактерій. Така залежність між зростанням концентрації МДА та втратою пігменту вказує на те, що одним із вірогідних механізмів втрати пігментсинтезувальної здатності бактерій може бути ураження вільними радикалами пігментсинтезувальних ділянок на мембранах.

Бібліографічні посилання

1. **Герасько Т. В.** Вплив препарату АОК-М на пероксидне окиснення ліпідів у насінні та в проростках озимої пшениці / Т. В. Герасько, В. В. Калитка // Фізіологія і біохімія культурних рослин. – 2006. – Т. 38, № 6. – С. 339–343.
2. **Калинкина Л. Г.** Развитие окислительного стресса в клетках *Chlorella stigmatophora* и их обесцвечивание при ингибировании гликолатного пути на фоне засоления / Л. Г. Калинкина, Т. Б. Ясюкова // Физиология растений. – 2001. – Т. 48, № 5. – С. 746–752.
3. **Колупаєв Ю. С.** Вплив екзогенного кальцію на інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів в колеоптилях озимої пшениці і їх теплостійкість / Ю. С. Колупаєв, Ю. В. Карпець // Фізіологія і біохімія культурних рослин. – 2003. – Т. 35, № 1. – С. 68–72.
4. **Лакин Г. Ф.** Биометрия. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.
5. **Механизмы выживания бактерий** / О. В. Бухарин, А. Л. Гинцбург, Ю. М. Романова, Г. И. Эль-Регистан. – М. : Медицина, 2005. – 367 с.
6. **Мусієнко М. М.** Спектрофотометричні методи в практиці фізіології, біохімії та екології рослин / М. М. Мусієнко, Т. В. Паршикова, П. С. Славний. – К. : Фітосоціоцентр, 2001. – 245 с.
7. **Платонова А. А.** Вміст маленового діальдегіду та активність антиоксидантних ферментів у проростках гороху за дії йонів кадмію / А. А. Платонова, С. С. Костишин // Фізіологія і біохімія культурних рослин. – 2000. – Т. 32, № 2. – С. 146–149.
8. **Bruins M. R.** Microbial resistance to metals in the environment / M. R. Bruins, S. Kapil, F. W. Oehme // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2000. – Vol. 45, N 2. – P. 198–207.
9. **Burkholderia cenocepacia** C5424 produces a pigment with antioxidant properties using a homogenisate intermediate / K. E. Keith, L. Killip, P. He et al. // Journal of Bacteriology. – 2007. – Vol. 189, N 24. – P. 9057–9065.
10. **Microbial** reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis* / W. Carpentier, K. Sandra, I. De Smet et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, N 6. – P. 3636–3639.
11. **Possible** involvement of red pigments in defense against mercury in *Pseudomonas* K-62 / H. Fujimori, M. Kiyono, K. Nobuhara, H. Pan-Hou // FEMS Microbiology Letters. – 1996. – Vol. 135. – P. 317–321.

Надійшла до редколегії 14.06.2010