

УДК 634.7:581.524.1

Рильський О.Ф., Костюченко Н.І., Подкопайло С.Ф., Домбровський К.О. (Україна, Запоріжжя)

НАУКОВЕ ОБГРУНТУВАННЯ ПРОКАРІОТИЧНОЇ БІОІНДИКАЦІЇ ЗАБРУДНЕННЯ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ ПРИРОДНОГО СЕРЕДОВИЩА

Сучасне загострення екологічної ситуації є однією з найважливіших проблем, що обумовлює необхідність вивчення механізмів адаптації та резистентності організмів до важких металів (ВМ) як одних із найнебезпечніших забруднень.

Існуюча на даний момент система оцінки стану довкілля за гранично допустимими концентраціями (ГДК) хімічних речовин не є оптимальною, тому що це, насамперед, санітарно-гігієнічні ГДК тільки для людини. Для оцінки ж стану природного середовища доцільно використовувати критерії, які характеризують не тільки концентрацію того або іншого хімічного компонента, але й інформують про вплив техногенних факторів на характерні (специфічні) ознаки організмів-індикаторів.

Екологічний моніторинг як система спостережень, оцінки й прогнозу антропогенних змін у біологічних системах не може бути оптимізованим без визначення строгого ряду індикаторних організмів у групі редуцентів, які є кінцевою і водночас початковою ланкою для продуцентів і консументів. Тільки встановлення такого ряду індикаторних організмів, їх глибоке вивчення у всіх трьох складових «живої речовини» біосфери – консументів, продуцентів, редуцентів, - може дати системну відповідь на запитання про ступінь впливу того або іншого антропогенного фактора на живу природу. На сьогодні область прокаріот-редуцентів є найменш вивченою й представленою в системі організмів-індикаторів.

Особливістю прокаріот-редуцентів є висока динамічність за рахунок високої швидкості обороту біомаси та великої площі взаємодії клітини з оточуючим середовищем, чутливість до різних факторів антропогенного впливу на середовище, зокрема, до дії токсичних металів. Різноманіття редуцентів дозволяє здійснювати пошук індикаторів саме серед цієї групи. Необхідним є пошук такої групи організмів, які могли б дати швидко й наочну інформацію про стан досліджуваного середовища. Такою групою організмів-індикаторів серед редуцентів-прокаріот можуть бути пігментсинтезуючі бактерії. Саме яскравість кольору, його насиченість і стійкість синтезованого пігменту можуть бути визначальними у виборі цієї групи для індикації забруднення довкілля.

Втрата пігменту у бактерій може служити не тільки добре спостережуваною зміною ознаки, але й показником значних змін на рівні біосинтезу компонентів клітин, тобто може бути об'єктивним індикатором стану забруднення як води, так і ґрунту.

Особливий інтерес представляють пігменти, які можуть виконувати ще й індикаторну функцію забруднення навколишнього середовища. Аналізуючи реакції пігментсинтезуючих мікроорганізмів на певні антропогенні стресори і порівнюючи їх з правильно підібраним контролем, можна зробити висновки про стан довкілля. Цінність пігментів бактерій як об'єкту дослідження також полягає в невирішеності для багатьох з них питання про їхнє функціональне призначення.

Метою нашої роботи було наукове обґрунтування механізмів блокування синтезу пігментів бактерій під впливом іонів важких металів (ВМ), та експериментальне використання пігментсинтезуючих бактерій як індикаторів забруднення природного середовища.

Для досягнення вказаної мети були поставлені наступні задачі:

- вивчення впливу різних концентрацій металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій;
- дослідження вірогідних механізмів блокування синтезу пігментів бактерій під дією металів;
- створення моделі “синтетичного” ряду токсичності металів за інтенсивністю впливу на пігментсинтезуючу здатність бактерій.

Об'єкт дослідження – пігментсинтезуюча здатність бактерій в умовах забруднення оточуючого середовища важкими металами. Предметом дослідження були пігментсинтезуючі мікроорганізми: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* var. *iodinum* та інші.

Пігментсинтезуючі бактерії вирощували на МПА в чашках Петрі з додаванням розчинів досліджуваних іонів металів різних концентрацій. Тверде живильне середовище – м'ясо-пептонний агар (МПА) готували на воді без ВМ (контроль) та з певним вмістом іонів ВМ. Концентрація іонів металів у середовищі становила від 0,5 до 5000 мг/дм³. Застиглий у чашках Петрі МПА засівали суцільним газоном колекційними пігментсинтезуючими 18-годинними культурами, інкубували протягом 24 годин в термостаті при 27-29 °С та візуально порівнювали інтенсивність забарвлення посіву в досліді та контролі.

Метали, вплив яких на пігментсинтезуючу здатність бактерій вивчався нами, мають різну електронну структуру. З урахуванням цього ці метали згруповано таким чином:

- р-елементи Al, Sn, Pb, Te;
- d-елементи з незаповненими d-орбіталями – V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Mo;
- d-елементи з заповненими d-орбіталями – Cu, Ag, Zn, Cd, Hg;
- радіоактивні f-елементи (актиноїди) Th і U.

Вплив іонів металів першої групи (р-елементи) на пігментсинтезуючу здатність бактерій показано на прикладі *Serratia marcescens* (таблиця 1).

Таблиця 1 – Вплив іонів ВМ на ріст і пігментутворення *Serratia marcescens*

Концентрація металів мг/дм ³	Al ³⁺		Sn ²⁺		Pb ²⁺		Te ²⁺	
	ріст*	пігмент*	ріст	пігмент	ріст	пігмент	ріст	пігмент
20	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++
30	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+++	±
50	++++	+++	+++	++	++++	++++	+	-
60	++++	+++	++	+	++++	++++	-	-
80	+++	++	+	-	++++	++++	-	-
100	+++	+	+	-	++++	+++	-	-
120	++	+	-	-	++++	+++	-	-
200	+	±	-	-	++++	++	-	-
250	+	-	-	-	+++	++	-	-
450	-	-	-	-	++	+	-	-
900	-	-	-	-	+	-	-	-
950	-	-	-	-	-	-	-	-

Примітка: ++++ – суцільний ріст або пігментутворення; +++ – добрий ріст або пігментутворення; ++ – помірний ріст або пігментутворення; + – слабкий ріст або пігментутворення; – – відсутність росту та/або пігментутворення; ± – наявність пігментних і безпігментних колоній.

Такий ефект відмічається у всіх досліджених штамів бактерій при дії іонів металів інших груп: спочатку припиняється синтез пігментів, а потім, при більш високих концентраціях ВМ, настає повне інгібування життєдіяльності.

Досліджуючи питання стосовно механізмів блокування синтезу пігментів іонами важких металів прийшли до висновку, що наявність реакційних центрів в молекулах попередників синтезу пігментів вказує на те, що вони можуть виконувати функцію “пасток” вільних радикалів. У циклі синтезу феназинових пігментів (піоціанін, йодинін і ін.) роль “пастки” вільних радикалів може виконувати такий важливий центраболіт, як шикімова кислота, у молекулі якої є 4 реакційних центри, здатних взаємодіяти з вільними радикалами: три з них представлені метиленовими групами, що містять електроноакцепторні замісники (-ОН), які підсилюють реакційну здатність атомів водню, і одна незаміщена метиленова група (-CH₂-). Результатом такого перемикання потоку вільних радикалів на пастки (попередники пігментів) є припинення синтезу пігментів, що дозволяє «пережити» в безпігментному стані стрес, визваний даною концентрацією металу. Концентраційний інтервал від моменту втрати пігменту до повного інгібування життєдіяльності клітини в конкретних умовах даного середовища і є той запас міцності клітини, що дарує їй синтез пігментів.

Проаналізувавши вірогідні чинники, що найбільш впливають на токсичність тих чи інших металів, та враховуючи реакцію організмів різних еволюційних рівнів (в тому числі і пігментсинтезуючих бактерій) на метали, ми прийшли до висновку, що для побудови «синтетичних рядів токсичності», близьких до об'єктивного відображення їх токсичної природи, необхідно враховувати наступні фактори (таблиця 2):

Таблиця 2 – Узагальнена таблиця рядів токсичності металів

max		min
	Ряд токсичності по відношенню до пігментсинтезуючої здатності бактерій Hg, Ag, Cd, Cr, V, Cu, Co, Sn, Ni, Al, Zn, Fe, Pb, Mn, Mo	
	Ряд розчинності солей металів, найбільш поширених забруднень довкілля Sn, Cu, Co, Zn, Ag, Cd, Pb, Ni, Al, Mn, Mo, Hg, V	
	Ряд атомних радіусів металів Ni, Co, Fe, Cr, Cu, Mn, V, Mo, Zn, Ag, Cd, Sn, Mg, Hg, Pb	
	Ряд металів за хелатоутворюючою здатністю Hg, Pb, Zn, Cd, Fe ³⁺ , Cu, Ni, Co, Fe ²⁺ , Mn, Mg	
	Ряд металів за силою зв'язування з білками клітини Mg, Zn, Fe ³⁺ , Co, Cr, Mo, Fe ²⁺ , Cu	
	Ряд загальної токсичності металів по відношенню до організмів, побудований за даними літератури Hg, Ag, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co [1] Ag, Cu, Ni, Ba, Cr, Hg, Pb, Cd [2]	

Створення синтетичних рядів токсичності металів на базі отриманих результатів за інгібуванням пігментсинтезуючої здатності бактерій важкими металами здійснювали за допомогою лінійного математичного програмування зі створенням n-розмірної площини.

Розрахунок порядку елементів в синтетичному ряді проводили, використовуючи лінійне рівняння типу:

$$Z^i = a_1^i x_1^i + a_2^i x_2^i + a_3^i x_3^i + a_4^i x_4^i + a_5^i x_5^i + a_6^i x_6^i + \dots + a_n^i x_n^i$$

x – номер по порядку металу в ряду

a – вагові коефіцієнти, отримані методом експертної оцінки

Отриманий після розрахунків «синтетичний» ряд токсичності металів має вигляд:

Синтетичний ряд токсичності металів по відношенню до клітини бактерій
Ag, Hg, Cu, Cd, Zn, Co, Ni, Pb

Блок порівняння рядів (таблиця 3):

Таблиця 3 – Порівняльна таблиця рядів токсичності та «синтетичного» ряду металів

Ряд блокування синтезу пігментів Hg, Ag, Cd, Cu, Co, Ni, Zn, Pb
Синтетичний ряд токсичності металів по відношенню до клітини бактерій Ag, Hg, Cu, Cd, Zn, Co, Ni, Pb
Ряд загальної токсичності металів по відношенню до організмів, побудований за даними літератури Hg, Ag, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co

Розраховуючи коефіцієнт кореляції [3, 4] між побудованим «синтетичним» рядом токсичності металів і рядом блокування пігментсинтезуючої здатності бактерій, отримуємо $r = 0,56$ (при $S_r = 0,05$).

Коефіцієнт кореляції між рядом загальної токсичності металів по відношенню до організмів, побудованим за даними літератури, та «синтетичним» рядом токсичності, складає $r = 0,48$ (при $S_r = 0,1$).

Таким чином, коефіцієнт кореляції $r = 0,56$ підтверджує високий ступінь подібності рядів, що порівнювалися, а це у свою чергу вказує на те, що побудований «синтетичний» ряд токсичності може бути віднесений до чинників, що об'єктивно відображають ступінь токсичності металів.

Отримані результати дозволили зробити наступні висновки:

Встановлено, що під дією іонів важких металів (ВМ) відбувається втрата пігментсинтезуючої здатності бактерій, що може бути використано для оцінки ступеня забруднення оточуючого середовища цими екологічно небезпечними забрудненнями. Блокування синтезу пігментів у тест-культур проходить при меншій концентрації іонів важких металів, ніж припинення росту бактерій. Для більшості металів ця різниця в концентраціях складає 15-25 %.

Бактеріальна клітина, рятуючись від потоку вільних радикалів, з якими не впоралися супероксиддисмутаза, каталаза, шапірони, глутатіон, метилеритрит циклопірофосфат (МЕЦ), механізми дерепресії ділянок ДНК, відповідальних за синтез антиоксидантів, використовує ще одну лінію оборони – пігменти і їхні попередники. Результатом такого перемикання потоку вільних радикалів на пастки (попередники пігментів) є припинення синтезу пігментів, що дозволяє «пережити» в безпігментному стані стрес, визваний даною концентрацією металу. Концентраційний інтервал від моменту втрати пігменту до повного інгібування життєдіяльності клітини в конкретних умовах даного середовища і є той запас міцності клітини, що дарує їй синтез пігментів.

Враховуючи вірогідні чинники, що найбільше впливають на токсичність тих чи інших металів, та проаналізувавши реакцію організмів різних еволюційних рівнів (у тому числі і пігментсинтезуючих бактерій) на метали, за допомогою лінійного математичного програмування побудовано «синтетичний ряд токсичності металів», що є найбільш близьким до об'єктивного відображення їх токсичної природи.

На базі отриманих в дослідженнях результатів розроблено пристрій для проведення моніторингу забруднення води з застосуванням іммобілізованих пігментсинтезуючих бактерій. Запропоновано біофільтр для очищення природних і стічних вод від важких металів з використанням пігментсинтезуючих бактерій.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Квасников Е. И. / Е. И. Квасников, Н. С. Серпокрьлов, Т. М. Ключникова и др. Биологическая очистка хромсодержащих промышленных сточных вод. – К.: Наук. думка, 1990. – 112 с.
2. Кушкевич І. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів / І. Кушкевич, С. Гнатуш, С. Гудзь // Вісник львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2007. – Вип. 45. – С. 3–28.
3. Гмурман В. Е. Руководство к решению задач по теории вероятностей и математической статистике / В. Е. Гмурман. – М.: Высшая школа, 1979. – 400 с.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия: [учебное пособие для биол. спец. ВУЗов] / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с.

УДК: 616-022.8:581.162.3

Родінкова В.В., Кременська Л.В., Білоус О.С., Паламарчук О.О. (Україна, Вінниця)

ПІЛКОВИЙ ПРОГНОЗ ЯК ЗАСІБ ПРОФІЛАКТИКИ СЕЗОННОЇ АЛЕРГІЇ У ВІННИЦІ

Актуальність питання: Незважаючи на бажання лікарів та пацієнтів подолати прояви сезонної алергії, незважаючи на арсенал лікарських засобів та профілактичних методів, які для цього використовуються, кількість людей у світі, чутливих до пилку рослин, неухильно зростає [1]. Так, за прогнозами ВООЗ, до 2020 року майже 100% жителів 20 найбільших міст світу будуть уражені сезонною алергією [2]. Адже саме цивілізація є тригером алергенності пилку: оболонка пилкових зерен вітрозапильних дерев та трав, які ростуть у містах, пошкоджується мікрочастками, пилом, утвореним, зокрема, викидами транспорту, мілкими