

БІОСЕНСОРИ

BIOSENSORS

PACS: 87.64.CC, 87.17.EE

УДК535.33/.34: 579.083.13

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА СВІТЛОРОЗСІЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ ЦИКЛУ СІРКИ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

“О. І. Білий, ^аО. М. Василів, ^бВ. Б. Гетьман, ^бС. О. Гнатуш

а — Львівський національний університет імені Івана Франка, факультет електроніки, кафедра фізичної та біомедичної оптики, вул. Драгоманова.50, м. Львів, 79005, Україна,
Тел.: (0322)-39–4227, e-mail: bilyi@electronics.wups.lviv.ua

б — Львівський національний університет імені Івана Франка, біологічний факультет, кафедра мікробіології, вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна

ВПЛИВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА СВІТЛОРОЗСІЮЮЧІ ВЛАСТИВОСТІ БАКТЕРІЙ ЦИКЛУ СІРКИ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

О. І. Білий, О. М. Василів, В. Б. Гетьман, С. О. Гнатуш

Анотація. У роботі досліджено вплив деяких солей важких металів на світлорозсіюючі властивості сірководновляювальних бактерій *Desulfuromonas acetoxidans*. Встановлено залежність між концентраційними змінами та відносним вмістом клітин у вибраному діапазоні розмірів за внесення кадмій сульфату, купрум сульфату, цинк сульфату та плюмбум нітрату.

Ключові слова: *Desulfuromonas acetoxidans*, світлорозсіюючі властивості, купрум, кадмій, плюмбум, цинк

THE INFLUENCE OF HEAVY METALS ON LIGHT SCATTERING PROPERTIES OF SULFUR CYCLE BACTERIA *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

O. I. Bilyy, O. M. Vasylyv, V. B. Getman, S. O. Hnatysh

Abstract. In this work the influence of some heavy metal salts on light scattering properties of sulfur-reducing bacteria *Desulfuromonas acetoxidans* has been investigated. Concentration changes and relative content of the cells *D. acetoxidans* in the set intervals of sizes under the influence of cadmium sulfate, copper sulfate, zinc sulfate and lead nitrate have been observed.

Keywords: *Desulfuromonas acetoxidans*, light scattering properties, copper, cadmium, lead, zinc

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА СВЕТОРАСSEИВАЮЩИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ ЦИКЛА СЕРЫ *DESULFUROMONAS ACETOXIDANS*

А. И. Билый, О. М. Василев, В. Б. Гетьман, С. А. Гнатуш

Аннотация. В работе исследовано влияние некоторых солей тяжелых металлов на светорассеивающие свойства серовосстанавливающих бактерий *Desulphuromonas acetoxidans*. Установлена зависимость между изменением концентрации и относительным содержанием клеток в заданном диапазоне размеров при внесении кадмий сульфата, купрум сульфата, цинк сульфата и плумбум нитрата.

Ключевые слова: *Desulphuromonas acetoxidans*, светорассеивающие свойства, купрум, кадмий, плумбум, цинк

1. Вступ

У наш час існує проблема забруднення навколишнього середовища солями важких металів, що є наслідком негативного антропогенного впливу. Вони потрапляють у навколишнє середовище при видобутку і переробці корисних копалин, разом зі стічними водами металургійних і гальванічних виробництв, а також із газоаерозольними викидами транспортних засобів та при експлуатації теплових електростанцій. Сполуки важких металів впливають на всі компоненти біоценозів.

Desulphuromonas acetoxidans — безбарвні сіркобактерії, що населяють збагачені сіркою водні середовища. Це грамнегативні строгі анаероби, здатні відновлювати сірку до гідроген сульфіді. Їх розміри наступні: ширина: 0,4–0,8; довжина: 1–4 мкм; форма клітин від паличкоподібних до овальних [1]. Клітини даних бактерій розглядають як високоефективний елемент мікробіоанодних паливних комірок, що забезпечують перетворення більше 80 % електронів, утворених в процесі окиснення ацетату, до електричного струму [2].

Сірковідновлювальні бактерії відіграють важливу роль у біогеохімії осадових середовищ, оскільки вони приймають участь у відновному осадженні токсичних металів. Проблема дослідження взаємодії сірковідновлювальних бактерій із важкими металами є актуальною, оскільки використання даних мікроорганізмів, резистентних щодо високих концентрацій важких металів у навколишньому середовищі, дозволить нейтралізувати токсичність кінцевого продукту дисиміляційного відновлення сірки — гідроген сульфіді, та іонів важких металів внаслідок їх часткового зв'язування з утворенням нерозчинних осадів

Відомо, що світлорозсіюючі властивості бактерійних суспензій визначаються такими фізичними параметрами клітин як їх показник заломлення, форма та розміри [3]. Розсіювання світла біологічними клітинами мікронних розмірів визначається явищем дифракції світла і є суттєвим лише при куті розсіювання близьким до 0 градусів. Інтенсивність розсіювання світла у цьому випадку визначається об'ємом клітини. Інтенсивність розсіювання світла під прямим кутом залежить від ряду фізичних факторів, зокрема особливостей поверхні клітини, зокрема, рівня її структуризації. Відомо, що основними складовими біологічних клітин будь-якої природи є нуклеїнова кислота, організована в ядро чи нуклеоїд, цитоплазма та мембрана, що мають відмінні показники заломлення. Показники заломлення бактерійних клітин, отримані авторами [4], свідчать, що не можна говорити про абсолютне значення показника заломлення для бактерій даного виду, так як спостерігається розкид його значень у межах даної популяції бактерій. При цьому крива розподілу для різних видів бактерій за значеннями показника заломлення має нормальний характер. Показник заломлення бактерійної клітини визначається біохімічним складом цитоплазми, що змінюється в широких межах, і залежить від осмолярності навколишнього середовища.

Іншим важливим параметром для оцінки світлорозсіюючих властивостей суспензій бактерійних клітин є їх розмірний розподіл. Визначення останнього оптичними методами, за літературними даними, можливе в рамках теорії Релея [5], теорії розсіювання Мі [6] і теорії Релея-Ганса [7, 8]. Подібність за значенням показників заломлення цитоплазми бактерійних клітин та навколишнього середовища, що відповідає критерію застосування теорії Релея-

Ганса, дозволяє стверджувати, що дана модель є сприйнятливою для опису процесів розсіяння світла мікробіологічними об'єктами. Інформацію про розміри досліджуваних частинок у рамках даних теоретичних моделей можна отримати методом так званого статичного розсіяння світла. При даному підході, про розмір частинки судять за значенням параметра амплітуди імпульсу інтенсивності розсіяного світла, який реєструється фотоелектричною системою пристрою, в результаті акту розсіяння світла часткою [9]. Надійну інформацію про розміри досліджуваних частинок, у рамках даних теорій, можна отримати з кутових залежностей діаграм розсіяння світла. У випадку мікробіологічних об'єктів, коли показник заломлення клітин бактерій n незначно відрізняється від показника заломлення води n_0 — середовища, у якому поміщені досліджувані мікроорганізми, відношення інтенсивностей розсіяного світла I_{RG} до падаючого світла I_0 міняється за законом $[(n-n_0)/n_0]^2 \approx I_{RG}/I_0$. Проведена оцінка зміни інтенсивності світлового потоку для водного розчину бактерійної культури *Escherichia coli* у рамках теорії Релея-Ганса при довжині хвилі He-Ne лазера 0,6328 мкм, де показники заломлення становлять $n = 1,3539$ і $n_0 = 1,3318$, дає значення $[(n-n_0)/n_0]^2 \approx I_{RG}/I_0$, рівне $25,7 \times 10^{-5}$ [10, 11]. Цей результат свідчить, що величина сигналу світла, що розсіюється бактеріями, є на п'ять порядків нижча, за інтенсивність падаючого променя, а тому метод статичного розсіяння світла для досліджування бактерійних клітин практично не застосовується.

Тому метою нашої роботи було дослідити вплив кадмій сульфату, цинк сульфату, плюмбум нітрату, купрум сульфату та цинк сульфату на сірководновлюбляльні бактерії *Desulfuromonas acetoxidans*, використовуючи новий метод отримання інформації про світлорозсіюючі параметри клітин на основі їх розмірного розподілу та відносного вмісту.

2. Методологія

Для визначення розмірного розподілу частинок в [12] запропоновано метод, який базується на реєстрації змін інтенсивності розсіяного світла, шляхом статистичного набору змін амплітуди та тривалості імпульсів для частинок заданого розміру, побудові на основі одержаних даних вимірювання кореляційної

функції, що виражає статистичні характеристики інтенсивності розсіяння світла досліджуваними частинками, і одержання розподілу частинок за розмірами, шляхом розв'язування інтегрального рівняння Фредгольма першого роду:

$$F(U, t) = \int_{r_{\min}}^{r_{\max}} K(U, t, r) n(r) d(r), \quad (1)$$

де r_{\min} і r_{\max} — верхня й нижня межі діапазону розмірів частинок, що реєструються;

$n(r)$ — функція розподілу частинок за розмірами;

$K(U, t, r)$ — функція розподілу нормованих значень амплітуд і тривалості реєстрованих імпульсів розсіяного світла калібрувальних частинок, що є результатом попереднього зондування потоку рідини, монохроматичним когерентним світлом полімерних латексів заданого розміру, і відомим показником заломлення.

Однак, даний метод не дозволяє з високою точністю оцінити кількісні зміни мікробіологічних об'єктів у процесі їх культивування. Це зумовлено появою похибок через виміри розсіюючих параметрів домішкових частинок, зокрема продуктів розпаду, утворених в процесі метаболізму бактерій, що виділяються у культуральне середовище, яке містить досліджувані клітини. У [13] було показано, що дані похибки можна мінімізувати шляхом проведення аналізу за наступною методикою. Відібрані для досліджень мікробіологічні об'єкти культивують у рідинному ростовому середовищі та визначають часову залежність зміни кількості клітин і фонових часток у рідинному ростовому середовищі. Для цього, досліджуване рідинне поживне середовище з мікробіологічними об'єктами, і без них, розводять у однакових пропорціях в одній із високочистих рідин: фізіологічний розчин, 5 % розчин глюкози, або деіонізована вода; окремо визначають загальну кількість мікробних клітин і фонових частинок у високочистій рідині, що їх містить, та загальний розмірний розподіл фонових часток у високочистій рідині, яка не містить мікробних клітин. У вибраному інтервалі розмірів визначають: кількість мікробних клітин, їх відносний вміст шляхом розрахунку відношення кількості клітин у певному розмірному діапазоні, до їх загальної концентрації, і будують залежності змін кількості мікробних клітин та їх відносно-

го вмісту у вибраному інтервалі розмірів, з часу культивування.

З метою дослідження впливу Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} та Pb^{2+} на світлорозсіюючі параметри клітин сірководновловлювальних бактерій *D. acetoxidans* з використанням описаного методу, зразки для досліджень отримували за наступною методикою. Клітини даних бактерій вирощували у пробірках об'ємом 20 мл у модифікованому середовищі Постгейта С [14] при температурі 28°C за анаеробних умов із внесенням солей досліджуваних металів у наступних концентраціях: 0,5 мМ, 1,0 мМ, 1,5 мМ, 2,0 мМ та 2,5 мМ (у перерахунку на концентрацію іонів металу). На середині експоненціальної (логарифмічної) фази росту (4-та доба культивування), відбирали 1 мл суспензії бактерій із зон найвищої концентрації клітин у пробірках і проводили вимірювання за допомогою пристрою ПРМ-6М, розробленого у нашій лабораторії.

3. Результати та обговорення

Результати вимірювання розмірного розподілу клітин бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу купрум сульфату представлені на рис 1. З гістограм розподілу клітин видно, що крива розподілу є в межах 0,4–1,4 мкм, а максимум розподілу зі збільшенням концентрації металу зміщується в область менших розмірів і відповідає 0,58 мкм для мінімальної концентрації та 0,5 мкм для максимальної концентрації. При цьому, зі збільшенням концентрації металу відносний вміст клітин меншого розміру зростає, крива розподілу зміщується в область менших розмірів, а півширина кривої розподілу спадає.

При дослідженні змін розмірного розподілу клітин *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу іонів Кадмію, Плюмбуму та Цинку криві розподілу є у межах 0,4–1,8 мкм, і для всіх концентрацій практично співпадають. При цьому їхній максимум відповідає значенню 0,58 мкм. Порівняльні залежності змін розмірного розподілу клітин *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу іонів усіх досліджуваних металів при мінімальній концентрації металу (0,5 мМ) та максимальній концентрації металу (2,5 мМ) приведені відповідно на рис. 2 та рис. 3.

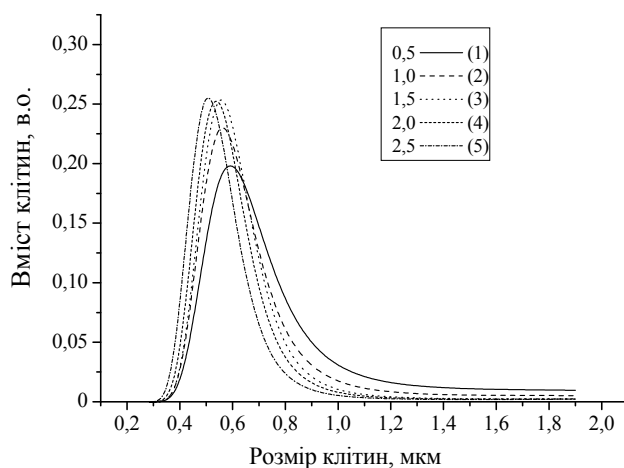


Рис. 1. Концентраційні залежності змін розмірного розподілу клітин сірководновловлювальних бактерій *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу іонів Купруму: (1) — концентрація Cu^{2+} — 0,5 мМ, (2) — 1,0 мМ, (3) — 1,5 мМ, (4) — 2,0 мМ та (5) — 2,5 мМ

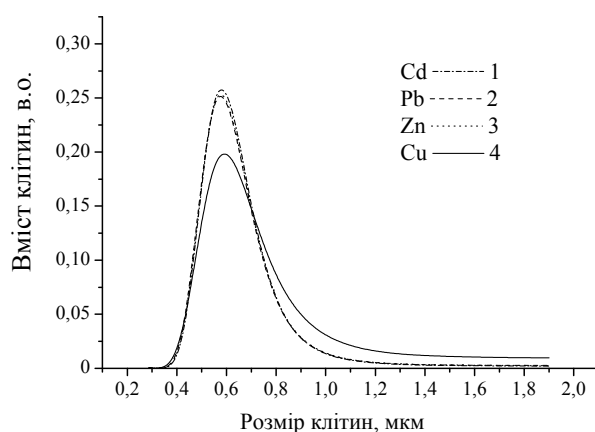


Рис. 2. Порівняльні залежності змін розмірного розподілу клітин *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу іонів Кадмію — 1, Плюмбуму — 2, Цинку — 3 та Купруму — 4 при мінімальній концентрації металу 0,5 мМ

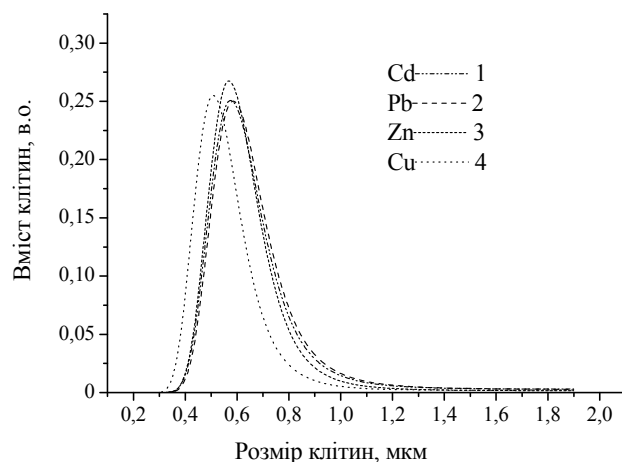


Рис. 3. Порівняльні залежності змін розмірного розподілу клітин *Desulfuromonas acetoxidans* за впливу іонів металів Кадмію — 1, Плюмбуму — 2, Цинку — 3 та Купруму — 4 при максимальній концентрації металу 2,5 мМ

Висновок

Аналіз отриманих результатів свідчить, що за наявності іонів досліджуваних металів у ростовому середовищі супроводжується як змінами розмірного розподілу клітин бактерій *Desulfuromonas acetoxidans*, так і змінами їх світлорозсіюючих властивостей. Найсуттєвіші зміни за концентраційними залежностями спостерігаються за внесення купрум сульфату в культуральне середовище.

Список літератури

1. Определитель бактерий Берджи: Пер. с англ. В 2т./ Под.ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снитта, Дж. Стейли, С. Уильямса. — М.: Мир, 1997. Т.1—432с., Т.2—368с.
2. Tender L. M., Gray S. A., Groveman E. G. The first demonstration of a microbial fuel cell as a viable power supply: Powering a meteorological buoy. // *J. Power Sources*. — 2008. — Vol. 179, № 3. — P. 571–575.
3. Сидько Ф. Я., Лопатин В. Н., Парамонов Л. Е. Поляризационные характеристики взвесей биологических частиц. //Новосибирск: Наука. Сиб. Отд-ние, 1990. — 120 с.
4. Фихман Б. А. Микробиологическая рефрактометрия. — М.: Медицина, 1967. 280 с.
5. Yguerabide J., Yguerabide E. E. Light-scattering sub-microscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications. // *Analytical Biochemistry*. — 1998. — Vol. 262, No.2. — P. 137–156.
6. Murray J., Hukins D. W., Evans P. Application of Mie theory and cubic splines to the representation of light scattering patterns from bacteria in the logarithmic growth phase. // *Phys. Med. Biol.* — 1979. — Vol. 24, No.2. — P. 408–415.
7. Koch L. Theory of the angular dependence of light scattered by bacteria and similar-sized biological objects. // *J. Theor. Biol.* — 1968. — Vol. 18, No.1. — P. 133–156.
8. Katz A., Alimova A., Xu M., Rudolph E., Shah M. K., Savage H. E., Rosen R. B., McCormick S. A., Alfano R. R. Bacteria size determination by elastic light scattering. // *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. — 2003. — Vol. 9, No.2. — P. 277–287.
9. Schdrtl W. : Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions // Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007. — 191 pp.
10. Bilyi O. I., Getman V. B., Kostyukevych S. O. New method for investigation of cells and other biological objects in analytical cytology. // *Proc. SPIE*. — 2001. — Vol. 4260. — P. 249–254.
11. Білий О. І., Гетьман В. Б., Коцюмбас І. Я., Рожко М. С. Новий оптичний метод контролю вмісту бактерій у рідинних розчинах. // *Біофізичний вісник*. — 2001. — Вип. 1(8). — С. 121–126.
12. Білий О. І., Гетьман В. Б., Матвійчук Я. М. Метод визначення розподілу мікрочастинок за розмірами в дисперсних середовищах. // *Вимірювальна та обчислювальна техніка в технологічних процесах*. 2001. — № 2. — С. 23–26.
13. Kotsyumbas I. Ya., Kushnir I. M., Bilyy R. O., Yarynovska I. H., Getman V. B., Bilyi A. I. Light scattering application for bacterial cell monitoring during cultivation process. // *Proc. SPIE*. — 2007. — Vol. 6631. — P. 66311I–8I–8.
14. Biebl H., Pfennig N. Growth of sulfate-reducing bacteria with sulfur as electron acceptor. // *Arch. Microbiol.* — 1977. — Vol. 112. — P.115–117.