

МИКРООРГАНИЗМЫ – ИНДИКАТОРЫ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Исполнитель работы: Смольников Игорь (6 кл.),
МОУ «Лицей № 3», г. Гатчина
Руководители работы: Мирошкина С. М., Вербенко В. Н.

Введение

Ни для кого не секрет, что человек своей производственной деятельностью постоянно загрязняет окружающую среду токсичными металлами и радионуклидами. Промышленные и радиоактивные отходы выбрасываются в атмосферу и воду, в почву и подземные горизонты, где нередко их концентрация превышает предельно допустимые нормы, особенно вблизи городских и промышленных центров. Очевидно, что вместе с тем растет потребность в новых биологических методах обезвреживания этих отходов. Отсюда понятен огромный интерес к участию микроорганизмов в трансформации металлов, металлоидов и радионуклидов, таких как уран, нептуний и технеций.

Радиоактивные отходы образуются при добыче, переработке радиоактивной руды и отработанного ядерного топлива, а также в ходе медицинской диагностики и научных исследований. При добыче радиоактивной руды урану сопутствует радий, молибден, селен и большое количество сульфатов. При переработке ядерного топлива, помимо продуктов ядерного распада актинидов (америция, плутония, кюрия, тория, нептуния и урана) и неактинидов (стронция, цезия и технеция), накапливаются и нерадиоактивные вещества – нитраты, сульфаты, карбонаты и др. соли этих металлов (табл. 1) [1]. Эти «сопутствующие» отходы изменяют кислотно-щелочные условия среды, а затем и видовой состав популяции растений и микроорганизмов. А используемые для разделения урана и плутония керосин и т. д. часто образуют устойчивые комплексы с актинидами, которые мигрируют в окружающую среду.

Взаимодействие микроорганизмов с металлами или радионуклидами изучается уже достаточно давно, поэтому их механизм во многом известен, но интерес к ним по-прежнему не уменьшается.

Живые бактерии, грибы способны не только к адсорбции или образованию комплексов, но и к активной их трансформации. Например, множество микроорганизмов поглощают уран. Во многих случаях в реакциях с радионуклидами участвуют ферменты. Это очень важно, так как в этом случае микроорганизмы обеспечивают возникновение комплексов, которые легко осаждаются в илах и осадках, что делает их доступными для дальнейшей очистки. Для того, чтобы использовать микроорганизмы для задач очистки окружающей среды (биоремедиации), необходимо знать максимальные концентрации тяжелых металлов, к которым микробы проявляют толерантность.

Таблица 1

Основные составляющие радиоактивных отходов

Свойства	
Уран	Обнаруживается в растворах выщелачивания, отходах при производстве и переработке ядерного топлива
Селен	Сопутствует урану в растворах выщелачивания
Торий	Продукт распада урана, отходы производства и переработки топлива
Радий	Низкоактивные отходы при добыче топлива, очень трудно перерабатывать
Плутоний	Образуется в реакторе (высокоактивный = ВА), отходы при переработке
Америций	Основной изотоп (ВА) при ядерном распаде ^{241}Pu
Нептуний	Основная проблема ^{237}Np , образуется при распаде ^{241}Am
Цезий	Продукт ядерного распада (ВА)
Стронций	Продукт ядерного распада (ВА)
Рутений	Продукт ядерного распада, создает проблемы при захоронении топлива, образует нитрозильный комплекс
Цирконий	Продукт ядерного распада с очень большим периодом полураспада, образуется при растворении покрытия топлива
Технеций	Продукт ядерного распада с длинным периодом полураспада, чрезвычайно мобилен в окружающей среде
Кюрий	Образуется в очень небольших количествах
Железо	Присутствует в избыточных количествах при переработке ядерного топлива, добавляется в PUREX-процессе
Трибутил-фосфат	Используется при переработке отработанного урана, а также при разделении урана и плутония
Керосин	Растворитель для ТБФ. Часто образует эмульсию с водой
Карбонаты	Используются как моющее средство для удаления ТБФ. Образует трудно удаляемые комплексы с актинидами
Сульфаты	Присутствуют в больших количествах при добыче урана
Нитраты	Присутствуют в огромных количествах при производстве и переработке ядерного топлива
EDTA и др.	Специально добавляется при очистке оборудования, образует очень сильные комплексы с актинидами, отвечает за мобильность и миграцию в окружающей среде

В нашей работе мы использовали 3 вида микроорганизмов.

1. *Escherichia coli* AB 1157 (кишечная палочка – дикий тип) (рис. 1).

2. *Escherichia coli* KS0160 (кишечная палочка – радиустойчивый мутант).

3. *Deinococcus radiodurans* (рис. 2) – грамм-положительная бактерия, которая чрезвычайно устойчива и к воздействию перекисей, и к ионизирующей радиации. А. Павлов и др. из Физико-технического института им. Иоффе РАН доказали, что она способна выдерживать давление, в 16000 раз превышающее давление атмосферы. Она также является экстремофилом, способна не только выживать в экстремальных условиях, но и пребывать в них постоянно. *D. radiodurans* была обнаружена впервые в 1956 г. сотрудником Орегонской сельскохозяйственной опытной станции – Артуром Андерсоном. Считается, что это один из самых жизнестойких микроорганизмов на нашей планете. Эта бактерия способна существовать в условиях постоянной радиации, достигающей 6000 рад/час, а также может пережить облучение 1,5 млн рад, что в 3000 раз больше смертельного порога для человека [2]. Помимо того, она сверхустойчива к окислению супероксиданион-радикалами и ультрафиолетовому излучению. Обезвоживание ей тоже нипочем. Под микроскопом *Deinococcus radiodurans* напоминает какие-то ягоды: потому и название бактерии переводится с латыни как «странная ягода устойчивая к радиации» (рис. 2.).

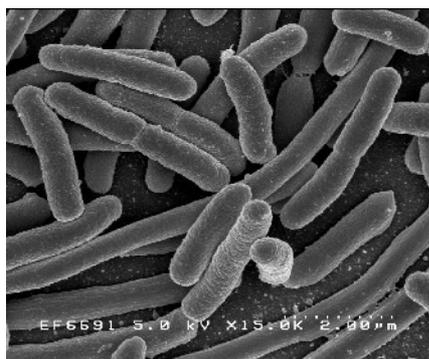


Рис. 1. *Escherichia coli*



Рис. 2. *Deinococcus radiodurans*

Кроме того, в нашей работе мы использовали химические вещества, такие как:

1. Хлористый цезий (CsCl_2) (м. в. 168,5)
2. Хлористый кадмий (CdCl_2) (м. в. 112,41)
3. Уксуснокислый свинец $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$ (м. в. 207,21)
4. Сульфат меди ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (м. в. 249,6)
5. Сульфат цинка ($\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) (м. в. 287,38)

Цель работы – исследование чувствительности бактерий к солям тяжелых металлов, опасных для окружающей среды.

Ход работы

1. Взвешивали необходимое количество химического вещества и готовили исходные концентрированные растворы.
2. Делали разбавление раствора до рабочей концентрации.
3. В пробирку наливали различное количество раствора и доводили агаром с аминокептидом (АП) до 30 мл.
4. В каждую из чашек Петри разливали АП-агар с различными концентрациями растворов солей.
5. Чашка Петри разделялась на три зоны.
6. В определенную для вида зону с помощью микропипетки наносили по три пробы по 10 микролитров.
7. Чашки Петри помещались в термостат на сутки при температуре 32° С.

Схема опыта

- I. Три вида клеток выращивали в жидкой питательной среде [3]. Объектом были выбраны:
 1. *E. coli* AB1157
 2. *E. coli* KS0160 (радиоустойчивый мутант)
 3. Почвенная бактерия *D. radiodurans* – экстремофил.
- II. На следующие сутки смотрели чашки Петри и фотографировали результаты.

Результаты

Результаты эксперимента представлены в таблице 2 и на рисунках 3–6.

Таблица 2

Чувствительность бактерий к солям тяжелых металлов

Химические агенты	Клетки	Концентрация/Рост			
		25 mM	10 mM	5 mM	2,5 mM
CuSO ₄					
	AB1157	---	++	+++	+++
	KS0160	---	++	+++	+++
	<i>D. radiodurans</i>	---	++	+++	+++
ZnSO ₄		100 mM	10 mM	5 mM	1 mM
	AB1157	---	+	+++	+++
	KS0160	---	--	++	+++
	<i>D. radiodurans</i>	---	++	++	+++

Продолжение табл. 2

Химические агенты	Клетки	Концентрация/Рост			
		20 mM	10 mM	5 mM	2 mM
PbAc					
	AB1157	---	---	+++	+++
	KS0160	---	---	++	+++
	<i>D. radiodurans</i>	---	---	+++	+++
CdCl ₂		2 mM	1 mM	0,2 mM	0,1 mM
	AB1157	---	---	++	+++
	KS0160	---	--	+++	+++
	<i>D. radiodurans</i>	---	---	---	---
CsCl ₂		100 mM	10 mM	5 mM	
	AB1157	---	---	+++	
	KS0160	---	---	---	
	<i>D. radiodurans</i>	---	---	---	

Примечания: +++ – рост бактерий такой же, как на чашке без соли;
 ++ – хороший рост бактерий;
 + – плохой рост;
 --- – отсутствие роста.

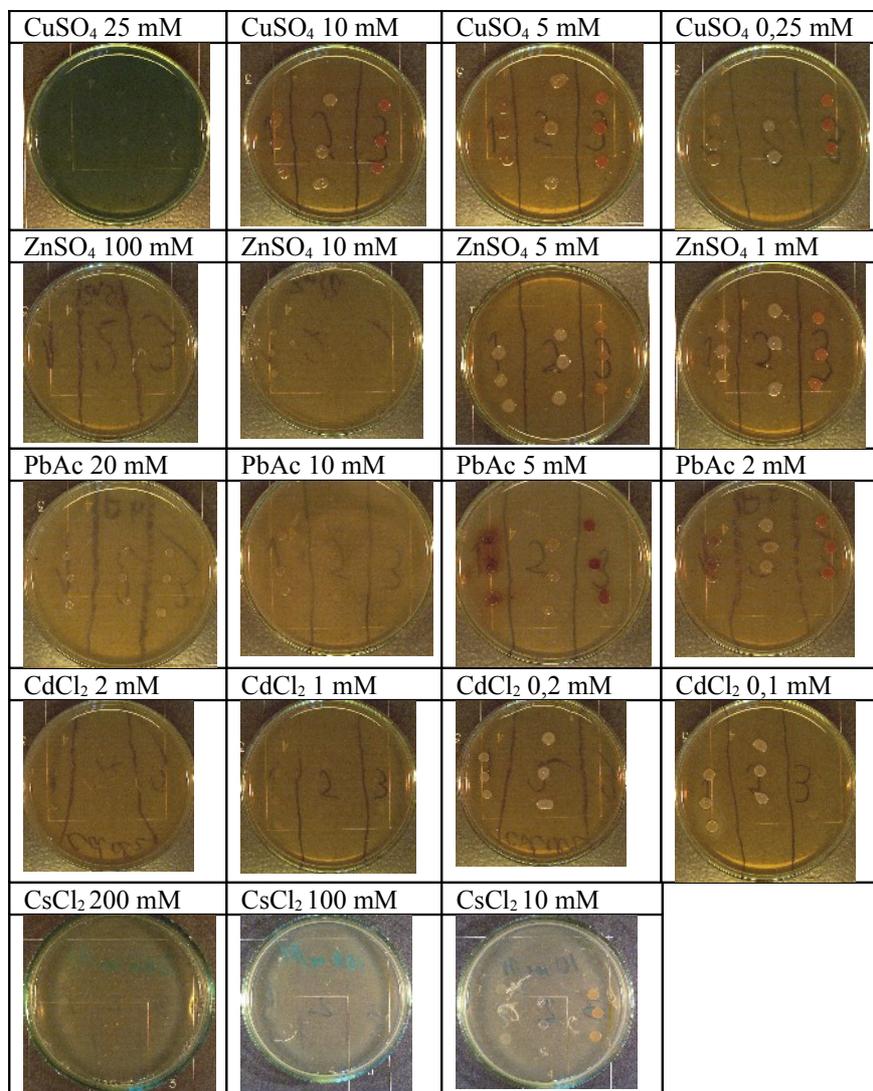


Рис. 3. Чувствительность микроорганизмов к солям тяжелых металлов
 На каждой чашке Петри слева направо: *E. coli* AB1157, *E. coli* KS0160
 (радиоустойчивый мутант), *D. radiodurans* – экстремофил

Выводы

1. Как показали наши исследования CuSO_4 вызывает летальный исход при концентрации 25 мМ для всех видов бактерий. А предельно допустимой по данным литературы считается концентрация 10 мМ.

2. На среде, содержащей ZnSO_4 , выживают бактерии при концентрации 5 мМ. При этом наиболее устойчивы к этому химическому соединению клетки *D. radiodurans*.

3. Уксуснокислый свинец имеет предельно допустимую концентрацию 5 мМ для всех видов бактерий.

4. Среди солей соляной кислоты CsCl_2 обладает летальным действием для всех 3-х видов при концентрации 10 мМ, при концентрации 5 мМ выживает только *E. coli* AB1157.

5. Как показали наши опыты CdCl_2 является наиболее токсичным соединением. При этом его максимально допустимая концентрация установлена в 500 раз меньше, чем для CsCl_2 . Суперустойчивая к радиоактивному воздействию *D. radiodurans* не выдерживает концентрацию CdCl_2 даже равную 0,1 мМ. Следовательно, самым опасным для метаболизма клеток из представленных в работе химических соединений является CdCl_2 . Предельно допустимой концентрацией, при которой способны жить бактерии, является 0,2 мМ CdCl_2 .

6. По совокупности тестов самой устойчивой к ядовитым химическим соединениям тяжелых металлов бактерией является дикий тип *E. coli* AB1157.

Практические выводы

Существует много различных, но дорогостоящих методов для измерения токсичности различных химических соединений. Наш метод определения выживаемости бактерий на твердой питательной среде, содержащей различные соли химических элементов, является вполне доступным и дешевым и может быть рекомендован для практического применения в тест-системах. Достаточно приготовить питательную среду, содержащую аликвоты воды из исследуемых рек и озер, и проверить выживаемость на них бактерий, чтобы установить наличие токсичных веществ. Предварительные результаты можно будет получить уже на следующий день. Этот метод не заменяет подходы аналитической химии, так как не идентифицирует химические вещества, но применим в экспресс-системах.

Использованная литература

1. Хижняк Т. В. Природа, 2005, № 11, с. 14–20.
2. Narumi I. Unlocking radiation resistance mechanisms: still a long way to go. Trends in Microbiology, 2003, v. 11, N 9, p. 422–425.
3. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. Москва, 1976, с. 25–33, 112–115.