

**УДК 576.851.315**

**А. М. Кацев, Э. П. Панова, Г. Н. Кацева**

## **ПРИМЕНЕНИЕ ЧЕРНОМОРСКИХ СВЕТЯЩИХСЯ БАКТЕРИЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ**

Светящиеся бактерии являются разнородной группой микроорганизмов, которая включает в себя одиннадцать видов и четыре рода: *Vibrio*, *Photobacterium*, *Shewanella* (*Alteromonas*) и *Photorhabdus* (*Xenorhabdus*) [1]. Все они, кроме *Photorhabdus*, являются морскими представителями.

Использование светящихся бактерий для аналитических целей имеет ряд преимуществ: живые фотобактерии сами являются источником стабильной и яркой люминесценции, которая легко регистрируется с помощью не сложных приборов (на основе фотодиодов или фотоумножителей). Интенсивность свечения бактерий тесно связана с состоянием их метаболизма. Большое число физических, химических и биологических факторов, влияющих на клеточное дыхание, синтез белков, липидов, нуклеиновых кислот, состояние клеточной мембраны и др. влияют на бактериальную биолюминесценцию и могут быть измерены посредством ее регистрации [2, 3].

Разработанные в настоящее время методы биолюминесцентного анализа основаны на применении живых светящихся бактерий, выделенных из них люцифераз, а также генов люминесцентной системы. Одна из них - это методика определения токсичности воды на бактериях *Photobacterium phosphoreum* (*Cohn*) *Ford*, принятая недавно на Украине (КНД 211.1.4.060-97) [4].

Целью работы было выделение и изучение новых Черноморских штаммов светящихся бактерий и оценка перспективности их использования анализа острой и хронической токсичности.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Светящиеся бактерии выделяли в летний период из морских биопроб, сделанных на глубине до 10 метров и свежельвовленной рыбы, в различных районах Крыма. Микробиологические исследования [5] проводили не позднее, чем через сутки после извлечения образцов из морской среды.

Идентификацию полученных бактериальных изолятов проводили в соответствии с существующими рекомендациями по определению бактерий семейства *Vibrionaceae* [6] и рекомендациями по быстрой идентификации фотобактерий [2].

Фотобактерии культивировали в колбах в режиме постоянного перемешивания при температуре 18-20<sup>0</sup>С. Через сутки процесс останавливали,

бактериальную массу осаждали центрифугированием при 5000 об/мин, 30 мин и отмывали 3% раствором хлорида натрия. Бактерии суспендировали в небольшом количестве 3% хлорида натрия и разрушали клетки трехкратной ультразвуковой обработкой по 30 с, используя дезинтегратор UD-11 ("Techpan", Польша). Субклеточные структуры осаждали центрифугированием при 5000 об/мин 30 мин. Из супернатанта осажждением сульфатом аммония 30-75% от насыщения выделяли белковую фракцию, содержащую люциферазу. Полученные препараты использовали для изучения кинетики люциферазной реакции с альдегидами: тетрадеканалем, додеканалем (Fluka, Switzerland) и деканалем (Aldrich, Germany). Биолюминесценцию инициировали добавлением фотовосстановленного ФМН H<sub>2</sub> [7].

Оценку чувствительности выделенных штаммов светящихся бактерий к различным токсическим соединениям проводили по рекомендациям для теста Microtox (фирмы "AZUR Environmental", США) [8], а также с учетом методических рекомендаций, принятых на Украине [4]. При определении острой токсичности использовали 5-и 15-и минутную инкубацию, а при изучении токсичности замедленного действия (хроническая токсичность) результаты анализировали через 16 – 18 ч. В последнем случае в пробы вносили компоненты питательной среды для создания условий селективного роста светящихся бактерий [9].

Измерения биолюминесценции проводили с использованием люминометра БМЛ-8801 (СКТБ "Наука". Россия). Количество клеток светящихся бактерий оценивали по оптической плотности при 660 нм на спектрофотометре СФ-46 (ЛОМО, Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате микробиологических исследований 50 морских биопроб из различных районов Черноморского побережья Крыма (1998-1999 гг.) были выделены 4 штамма светящихся бактерий. Три штамма были получены из образцов *Squalus acanthias* (катран), а один штамм был выделен из *Rapana thomasiama* (рапана). Используемая методика исследования позволяла выявить, в основном морских представителей светящихся бактерий и не была ориентирована на выделение пресноводных видов.

Все выделенные штаммы были Грамотрицательны и хорошо росли на стандартной среде для фотобактерий с 3%-м содержанием NaCl при температуре 15 – 20° С. Два штамма, выделенные от *Squalus acanthias*, имели форму коротких и толстых палочек, были оксидазоотрицательными, образовывали включения β-полиоксибутирата; не образовывали пигментов и не ферментировали D-маннит. Эти штаммы были отнесены к виду *Photobacterium phosphoreum* и названы соответственно *Ph. phosphoreum* K1 и *Ph. phosphoreum* K3 (цифры отражают временную последовательность выделения штаммов).

Два других штамма при микроскопическом анализе имели форму вытянутых, изогнутых палочек, на агаризованных средах образовывали желтый пигмент, не накапливали β-полиоксибутират, были оксидазоположительными. Штаммы по-разному утилизировали D-маннит и имели разный температурный оптимум. Один из штаммов, названный *V. fischeri* P1 (выделенный из *Rapana*

*thomasiana*) был отнесен к типичным представителям *Vibrio fischeri*, так как рос при 30°C и ферментировал D-маннит. Другой пигментобразующий штамм был назван *V. fischeri* K2 и обладал рядом не типичных свойств: не ферментировал D-маннит и не рос при 30°C (возможно, он мог быть отнесен к *V. logei*). Более подробно характеристики выделенных штаммов представлены в работе [10].

Одним из дополнительных признаков, который используется для идентификации фотобактерий, является характер кинетики люциферазной реакции с алифатическими альдегидами с различной длиной углеводородного радикала. Установлено, что в пределах одного вида эта характеристика изменяется очень незначительно, что позволяет использовать ее в систематике [7]. Были получены графические зависимости люминесценции люцифераз из выделенных штаммов, от времени в присутствии трех альдегидов и фотовосстановленного ФМН Н<sub>2</sub>. Результаты, выраженные в виде времени полузатухания люминесценции *in vitro* ( $\tau_{1/2}$ ) представлены в таблице 1.

Таблица 1. Время полузатухания люминесценции экстрактов фотобактерий, иницируемой ФМНН<sub>2</sub> в реакции с различными альдегидами ( $\tau_{1/2}$ ).

Штаммы	Время полузатухания биолюминесценции люцифераз, $\tau_{1/2}$ , с		
	Тетрадеканаль	Додеканаль	Деканаль
<i>Ph.phosphoreum</i> K1	1,60	4,35	5,15
<i>V. fischeri</i> K2	0,75	3,70	10,05
<i>Ph.phosphoreum</i> K3	1,75	3,30	4,65
<i>V. fischeri</i> P1	0,80	2,00	6,35
<i>Ph. phosphoreum</i> (Cohn) Ford	1,45	2,40	2,65

Согласно существующей классификации, люциферазы из выделенных штаммов по реакции с додеканалем могут быть отнесены к ферментам с “быстрой кинетикой”, характерной для представителей родов *Photobacterium* и *Vibrio* [7]. Реакция люцифераз с тетрадеканалем показала, что штаммы одного вида обладают близкими значениями  $\tau_{1/2}$ . Это подтвердило правильность проведенной идентификации выделенных штаммов светящихся бактерий и позволило дополнительно различить рода *Vibrio* и *Photobacterium*.

Основным потребителем биотестов на основе светящихся бактерий во всем мире является экология. Лиофилизированные светящиеся бактерии *V. fischeri* NRRL В-11177 под торговым названием MICROTOX<sup>®</sup> и их мутанты широко используются во многих странах для оценки токсичности и мутагенности водных сред [3]. Анализ заключается в измерении интенсивности люминесценции бактериальной суспензии в присутствии образца и сравнении результатов с

контрольными значениями, рис. 1. Различают острую токсичность, как уровень свечения бактерий после 5 - 30 минутного воздействия токсического фактора, рис. 1 А; и хроническую токсичность, которую выявляют через 16 - 18 ч культивирования светящихся бактерий в присутствии токсиканта, рис.1 В. Для количественной оценки токсичности была использована характеристика  $EC_{50}$  - концентрация токсиканта, при которой наблюдается 50%-е ингибирование биолюминесценции фотобактерий (по аналогии с  $LD_{50}$ , используемой для оценки токсичности на животных), однако возможно использование и других характеристик, например,  $EC_{20}$  или  $EC_{80}$ .

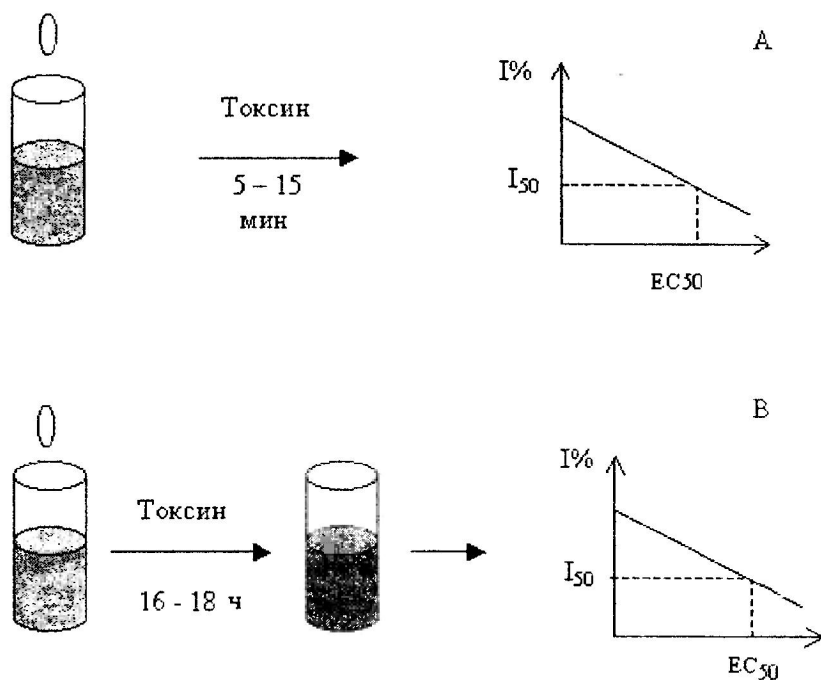


Рис. 1. Схема биолюминесцентного анализа токсичности: А - острая токсичность; В - хроническая токсичность.

Чувствительность биолюминесцентных методов определения токсичности зависит, прежде всего, от характеристик тест-штаммов. Оценка чувствительности выделенных штаммов к действию сульфата цинка, фенола, додецилсульфата натрия и бихромата калия [10] показала перспективность их использования в качестве биоиндикаторов. Дополнительно изучали действие солей пяти тяжелых металлов в тестах на острую и хроническую токсичность.

Таблица 2.  
Острая токсичность солей (сульфатов) тяжелых металлов

Штаммы	ЕС <sub>50</sub> , мг/л				
	кадмий	кобальт	медь	никель	цинк
<i>Ph.phosphoreum</i> K1	33,0	100,0	60,0	15,0	30,0
<i>V. fischeri</i> K2	60,0	370,0	13,0	2,0	130,0
<i>Ph.phosphoreum</i> K3	37,0	75,0	53,0	5,0	15,0
<i>V. fischeri</i> P1	47,0	100,0	65,0	3,0	5,0

По уровню острой токсичности (таблица 2) для изучаемых штаммов, ионы тяжелых металлов могут быть расположены следующим образом: никель > кадмий ≈ цинк ≈ медь > кобальт. Наибольшей чувствительностью, сравнимой с существующими аналогичными тестами, отличался штамм *Ph.phosphoreum* K3.

Результаты действия ионов тяжелых металлов на рост и биолюминесценцию некоторых из выделенных штаммов светящихся бактерий (хроническая токсичность) представлены в таблице 3. В целом этот более долгосрочный тест обладал в 3 – 16 раз большей чувствительностью, чем краткосрочный тест (в среднем в 7 раза). Расположение металлов по уровню хронической токсичности несколько отличалось от предыдущего теста: кадмий > цинк > кобальт > медь, что свидетельствует о неодинаковом механизме проявления их токсичности.

Сравнение результатов двух тестов показали, что соли кадмия и меди обладают большей способностью ингибировать рост бактерий (хроническая токсичность), чем биолюминесценцию. Соли никеля и цинка, напротив, в большей степени ингибируют биолюминесценцию светящихся бактерий чем их рост, то есть обладают большей острой токсичностью.

Таблица 3.  
Хроническая токсичность солей (сульфатов) тяжелых металлов

Штаммы	ЕС <sub>50</sub> , мг/л				
	кадмий	кобальт	медь	никель	цинк
<i>Ph.phosphoreum</i> K3	2	23	20	-	5
<i>V. fischeri</i> K2	4,5	2	5,5	-	6,3
<i>Ph.phosphoreum</i> Cohn (Ford)	2	11	27	-	2,5

## ВЫВОДЫ

Таким образом, выделенные Черноморские штаммы светящихся бактерий могут эффективно использоваться для быстрой оценки острой и хронической токсичности, вызванной тяжелыми металлами. Перспективным подходом, по-видимому, остается подбор штаммов для изучения токсичности конкретного объекта.

### **Список литературы**

1. Bergey's manual systematic bacteriology.-Baltimore etc.: Williams and Wilkins, 1984. – Vol. 1. – 964 p.
2. Гительзон И. И., Родичева Э. К., Медведева С. Е. и др. Светящиеся бактерии. - Новосибирск: Наука, 1984. - 279 с.
3. Aruldoss JA, Viraraghavan T. Toxicity testing of refinery wastewater using Microtox.// Bull Environ Contam Toxicol.- 1998.- 60, №3.- P.456-463.
4. КНД 211.1.4.060-97 Визначення токсичності води на бактеріях *Photobacterium phosphoreum* (Cohn) Ford. – 21.05.97.
5. Методы общей бактериологии. Т.1 /Под ред. Ф. Герхардта и др.- М.: Мир, 1983. – 536 с.
6. Определитель бактерий Берджи. Т. 1./Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, С. Уильямса. – М.: Мир, 1997.- 432 с.
7. Воробьева Т. И., Заворуев В. В., Межевикин В. В., Примакова Г. А. Кинетические свойства люцифераз и таксономия светящихся бактерий // Микробиология.- 1982.- Т. 51.- Вып.3.- С.420-423.
8. ISO/TC 147/SC 5/WGI № 110. Microtox test.
9. Gellert G. Sensitivity and significance of luminescent bacteria in chronic toxicity testing based on growth and bioluminescence // Ecotoxicol. Environ. Saf. – 2000. - V. 45 – N 1. – P.87-91.
10. Кацев А. М. Некоторые характеристики Черноморских светящихся бактерий и их прикладное значение.// Прикладн биохимия и микробиология. - 2002. - №2. - С.15-18.

*Поступила в редакцию 10.12.2001 г.*