



УДК 581.192:546

Е.Л. Барский, Я.В. Саванина, С.Ю. Королева, И.А. Фомина, Ю.Н. Королев, Е.С. Лобакова
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический
факультет, Россия, 119899, Москва, Ленинские горы, 1, строение 12,
E-mail: cordekor@list.ru

НЕИНВАЗИВНАЯ РЕГИСТРАЦИЯ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК В ДИАЛИЗНОЙ КУЛЬТУРЕ ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

Контроль за загрязнением водных объектов – одна из важнейших задач в экологии. Для оценки экологического состояния природных объектов предлагается подход, основанный на диализном культивировании популяций организмов. Известно, что состояние клеток при этом культивировании по ряду аспектов соответствует состоянию организмов находящихся в реальных природных условиях. Внеклеточные метаболиты, сконцентрированные в диализном мешке находятся в условиях, позволяющих обмениваться метаболитами с внешней средой, что позволяет использовать ее для биоиндикации загрязнений природной среды. Решение этой задачи не представляется возможным без использования оптических методов регистрации изменений пространственной организации макромолекул важнейших биополимеров клеток культуры. Решение было найдено в сравнительном исследовании культуры методами спектроскопии в ИК диапазоне. Критерием служили отличия в динамических характеристиках объекта, что соответствовало изменениям загрязнений в водной среде.

СПЕКТРОСКОПИЯ, ЭНТРОПИЯ, МИКРООРГАНИЗМЫ

ВВЕДЕНИЕ

Отметим ряд особенностей диализного культивирования, обосновывающие его использования в экологических исследованиях и позволяющие подойти к решению поставленной выше задачи [1].

Физиологические ответы клеточных культур цианобактерий и микроводорослей на действующие экологические факторы в значительной степени зависят от условий их культивирования. Наиболее простым методом представляется периодическое суспензионное культивирование, дающее возможность наблюдать все фазы краткого жизненного цикла и быстрого накопления биомассы. Культура иммобилизованных клеток характеризуется сниженной скоростью роста и фотосинтеза при сохранении высокой скорости метаболизма. Диффузионное культивирование предполагает отделение исследуемой суспензионной культуры клеток от внешнего объема среды мембраной с размерами пор, пропускающих соединения с определенной молекулярной массой, через которую осуществляется диффузия веществ. Культура может помещаться как в камеру, ограниченную фильтрами, так и в мешок из селективной мембраны. Данная разновидность называется диализным культивированием: диализный мешок с клетками микроорганизмов погружается в значительно больший объем «внешней среды», что обеспечивает свободное выведение продуктов обмена и поступление субстрата. Метод известен с 70-х гг. XX в. и использовался, главным образом, для изучения влияния экологических факторов на фитопланктон.

Метод пригоден для изучения разных классов микроорганизмов: цианобактерий, зеленых микроводорослей, гетеротрофных бактерий. Исследуемая суспензионная культура

находится во внутреннем объеме двойного сосуда. Особенности метода лучше проявляются при максимальном соотношении поверхности и объема диализной мембраны: лучшая форма диализного мешка не шар, а длинный цилиндр, полностью погруженный в 5 – 10-кратный объем «внешней среды».

Для диализной культуры характерно увеличение продолжительности стационарной фазы, при этом ряд ее физиологических параметров, таких как скорость фотосинтеза и содержание пигментов у автотрофов, на протяжении опыта не изменяется; скорость роста в диализной культуре значительно выше, чем в периодической. Диализная мембрана разделяет внеклеточные метаболиты на высокомолекулярные, накапливающиеся в диализном мешке, и низкомолекулярные – во внешнем объеме. Клетки, сконцентрированные в диализном мешке, находясь в стерильных условиях, но обмениваются метаболитами с «внешней средой», что позволяет использовать их для изучения взаимодействия культур на уровне продуктов метаболизма (смешанно-раздельные культуры) и наблюдать за изменением параметров роста каждой из культур. Инокулят в диализном мешке легко перемещать из одной среды в другую, что позволяет использовать его для биоиндикации загрязнений природной среды. Смешанно-раздельные культуры, благодаря взаимной регуляции компонентов, характеризуются повышенной устойчивостью к воздействию внешних факторов и способствуют как детоксикации среды, так и максимальному накоплению ряда веществ из среды в биомассе.

Рост цианобактерий и зеленых микроводорослей в диализной культуре соответствует обычной S-образной кривой. Клетки начинают расти после лаг-периода. Следующая за ним экспоненциальная фаза роста переходит в стационарную. Интенсивность роста при диализном культивировании выше, чем при периодическом, при этом длительность лаг-фазы и время перехода от экспоненциальной фазы роста к стационарной остаются приблизительно такими же.

Диализная культура цианобактерий характеризуется увеличением продолжительности стационарной фазы с сохранением при этом высокой физиологической активности клеток.

При диализном культивировании благоприятное соотношение поверхности и объема диализного мешка и внешний объем среды, в несколько раз превышающий внутренний, обеспечивают отток ингибирующих рост метаболитов во «внешний» объем и непрерывное поступление питательных веществ. В дальнейшем накопление значительной биомассы клеток и экзометаболитов в диализном мешке способствует снижению интенсивности освещения поскольку интенсивность проходящего через культуру клеток света обратно пропорциональна оптической плотности пигментов и постепенному замедлению фотосинтетической активности, а значит снижению концентрации кислорода, что существенно тормозит фотоокисление пигментов и липидов. Все эти факторы могут препятствовать деградации клеток и создают условия для «консервации» культуры.

Диализная культура цианобактерий представляются удобным объектом при экологических исследованиях, т.к.:

1) данные микроорганизмы широко распространены: «цветение» водоемов в наших широтах вызывается главным образом цианобактериями;

2) некоторые виды цианобактерий достаточно чувствительны к разнообразным воздействиям, что объясняется мелкими размерами клеток, обеспечивающими высокое соотношение поверхность/объем для воздействия токсиканта;

3) природные сообщества, преобладающим компонентом которых являются цианобактерии, удаляют из водной среды до 98% растворенных металлов и металлоидов – Cd, Zn, Cr, Mn.

Клетки в диализном мешке остаются в стерильных условиях, что позволяет изучать изменения тест-параметров культур в любых загрязненных средах, включая естественные водоемы, а также дает возможность моделирования как разового, так и постоянного сброса тяжелых металлов и других загрязнителей путем замены внешней среды и изучать воздействие повреждающих факторов в различных сочетаниях.

При индикации загрязнений различной природы можно использовать как микроорганизмы, так и клеточные культуры.

Варьируя размеры пор диализной мембраны, можно получать иные наборы экзометаболитов; смешанно-раздельные культуры могут включать иные компоненты – цианобактерии и грибы, водоросли и актиномицеты. С помощью цианобактерий можно осуществлять кондиционирование сред для поддержания роста эукариот (культуры растительных тканей, включая нефотосинтезирующие); ассоциативные культуры могут использоваться не только для накопления растворимых соединений, но и для деструкции трудноразлагаемых соединений.

На основании сказанного была экспериментально сформулирована следующая рабочая гипотеза: если мы сможем определять физиологическое состояние монокультуры в диализном мешке, то это состояние должно изменяться в зависимости от характера и степени воздействия, т.е. от загрязнения водных объектов. Причем мешок с культурой можно помещать в сосуды с отобранной пробой из водоема, либо в сам водоем, что резко сокращает время анализа. И в случае наличия «полевого» прибора можно было бы говорить об экспресс-анализе.

Итак, основным является поиск возможностей регистрировать изменение состояния культуры в мешке при загрязнения водной среды конкретного водоема.

МЕТОДИКА НЕИНВАЗИВНОЙ РЕГИСТРАЦИИ

Любые изменения среды обитания находят обязательное отражение в физиологических реакциях живой системы. Реакция проявляется либо в количественном варианте (в определенном объеме клетки изменяется количество биохимических компонентов либо их пространственная организация), либо в качественном варианте (в динамике происходит изменение векторов указанных изменений или скорости этих изменений).

Микроорганизмы рассматриваются в качестве возможной модели как одна из доминантных частей любой экосистемы и как, своего рода, собирательное понятие о всех возможных способах существования земных организмов (8 типов питания, см. [1]). Реакции многоклеточных организмов на изменения параметров среды опосредованы рядом факторов и сложны для интерпретации. Одноклеточные организмы находятся в постоянном контакте со средой и зависимы от окружающих условий в большей степени, чем мелкие многоклеточные формы, поскольку у них меньше возможностей отделить свою внутреннюю среду от внешней. Обмен веществ между клеткой микроорганизма и средой осуществляется всей ее поверхностью, поэтому внутриклеточные процессы исключительно зависят от условий среды.

Если известный принцип [2], который запрещает «избыточную» организацию для биоценозов (превышение уровня организации сообщества видов снижает приспособленность биоценоза к условиям его существования), распространить на биологические системы других структурных уровней, то можно говорить о существовании ограничения уровня организации клеточной популяции, определяемого конкретными условиями среды. Внешние условия, таким образом, определяют не только интенсивность метаболизма, но и уровень организации биосистем. Можно сказать, что организация биосистемы и ее состояние выступают как адаптация к изменившимся условиям среды существования.

Необходимость характеризовать существенные различия в состоянии клеток и в осуществляемых ими внешне однотипных процессах приводит к введению понятия о суммарных физиологических показателях. Поскольку материальным носителем жизнедеятельности биологической системы является ее структурная организация, при изучении реакций клеток на факторы воздействия необходимы неинвазивные методы исследования, т. е. обеспечивающие получение информации о степени упорядоченности живых структур без их разрушения. Свойства живой системы не являются простой суммой свойств составляющих ее макромолекул. Степень упорядоченности структур обуславливает свойства и функциональные возможности исследуемых объектов. Индикатором изменений состояния

живого организма (с учетом взаимосвязи его морфологии, физиологии и биохимии) могут служить динамические изменения его пространственной и временной структуры.

По мнению ряда исследователей [3], основа жизни – не борьба за вещество или энергию, а борьба за упорядоченность, т.е. стремление уменьшить структурную энтропию (СЭ). С точки зрения статистической физики энтропия выражает состояние системы и возрастает при переходе от менее вероятных состояний к более вероятным. Упорядоченные системы менее вероятны, и их энтропия минимальна. При несоответствии внутренних законов развития определенного фрагмента материи законам окружающей среды возникает энтропия информации (ЭИ). Изменяющееся значение ЭИ характеризует степень «понимания», то есть степень адаптации живой системы по отношению к среде обитания. Таким образом, основная разница между СЭ и ЭИ состоит в том, что первая – это мера используемых возможностей, а вторая – мера априорной неопределенной ситуации.

Для использования рассмотренного ранее в конкретных экспериментах необходимо найти параметры, отражающие изменения указанных энтропий. Поскольку энтропия – количественная мера степени хаотичности чего-либо, целесообразно обратиться к физическим понятиям изотропности и анизотропности системы.

При адаптации система осуществляет обмен информацией со средой. Для микроорганизмов такой обмен может реализоваться лишь через внешние структуры клетки (клеточные стенки, чехлы и слизистые выделения). Можно предположить, что ЭИ находит свое отражение именно во внешних структурах организма через изменение степени пространственной организации (упорядоченности) составляющих этих структур клетки. Если это так, то изменение степени пространственной организации во внешних структурах является характеристикой степени «общения» живой системы со средой обитания. При этом важна не только количественная характеристика, но и качественная, т.е. проблема распределения информации внутри клетки, на основе которой и будет решаться задача дальнейшего развития организма.

Но у живой развивающейся системы может быть достаточно низкий уровень энтропии, то есть она не находится в наиболее вероятном состоянии. Это означает, что живая система должна стремиться к наиболее вероятному состоянию при общении со средой обитания, адаптируясь к окружающей среде и устраняя конкретные с ней противоречия и уменьшая неопределенность ситуации. В итоге это приводит к изменению структурной энтропии, характеристика которой заключена в пространственной организации целых клеток. СЭ и ЭИ проявляют себя через разнонаправленные векторные изменения, меры структурированности всей клетки и внешних структур. Это соотношение может характеризовать организованность биосистемы и, следовательно, ее функциональное состояние, что и необходимо подтвердить в экспериментах.

Поскольку материальным носителем жизнедеятельности биологической системы является ее структурная организация, при изучении реакций клеток на факторы воздействия необходимы неинвазивные методы исследования, т.е. обеспечивающие получение информации о степени упорядоченности живых структур без их разрушения. Свойства живой системы не являются простой суммой свойств составляющих ее макромолекул. Степень упорядоченности структур обуславливает свойства и функциональные возможности исследуемых объектов. Индикатором изменений состояния живого организма (с учетом взаимосвязи его морфологии, физиологии и биохимии) могут служить динамические изменения его пространственной и временной структуры.

Были использованы методы спектроскопии внутреннего отражения, которые дают возможность анализировать непрозрачные объекты в любом спектральном диапазоне любыми методами, регистрирующими изменения параметров электромагнитных излучений при их взаимодействии с объектами исследований. Спектральная характеристика представляет собой своего рода кривую закона распределения, которая отражает определенные изменения в структурах клетки, происходящие при наложении внешних воздействий или в процессе отдачи ими информации. Для оценки функционального состояния клетки необходимо проанализировать содержание в клетках важнейших

биополимеров (белков, нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов), их пространственное распределение, а также структурную организацию, включая пространственную ориентацию определенных химических связей в макромолекулах.

С примерами реализации предложенной в данной работе методологии можно познакомиться в ряде публикаций [4], рассматривающих в качестве такого инструмента методы спектроскопии внутреннего отражения (СВО).

В данной работе использовались методы СВО в инфракрасном диапазоне. Спектральные характеристики, полученные в поляризованном свете, позволяют получить информацию и о преимущественной пространственной ориентации ряда химических связей в макромолекулярных компонентах клетки. Анализ проводили по полосам поглощения белков амид 1 (A_1) и амид 2 (A_2). Полученные данные можно связать с характеристиками изменений ЭИ и СЭ. Именно это узкосмысловое толкование вкладывается в понятие структурных изменений биополимеров клетки.

Экспериментальные данные по изменению анизотропии в виде ИК спектров были получены в поляризованном свете (угол падения измерительных элементов удобно выбрать равным 45° , так как для него в случае изотропного распределения молекул дихроичные отношения (A) $d_{эф1}/d_{эф2} = 2$, где $d_{эф1}$, $d_{эф2}$ – эффективные толщины исследуемого образца для параллельной и перпендикулярной компонент плоскополяризованного света). Оценка эффективной толщины проводилась по оптической плотности (D), которая связана с $d_{эф}$ зависимостью $D = \ln R = \alpha N d_{эф}$, где R – коэффициент отражения, измеряемый в опыте; α – показатель поглощения, см^{-1} ($\alpha = \epsilon C$; ϵ – экстинкция, л/см·моль; C – концентрация, моль/л); N – число отражений в элементе. Любое отклонение этого значения от $d_{эф1}/d_{эф2} = 2$ характеризует преимущественную ориентацию образца относительно плоскости падения света. В работе был использован ИК пленочный реплика-поляризатор на основе полиэтилена 1200 штрихов/мм, степень поляризации 95 – 96%, пропускание поляризатора 46 – 48%. Для регистрации сигнала использовали преобразование сигнала с ИК спектрофотометра ИКС-29 мультиметром METEX ME-22 для ввода в компьютер и последующего анализа данных на базе стандартной программы MICROSOFT EXCEL, позволяющей провести обсчет площадей поглощения. Проведены статистические обработки результатов измерений.

Динамика отличий дихроичных отношений (A) для внешних структур и целых клеток была использована как характеристика функционального состояния системы.

При изменении среды обитания биосистема пытается адаптироваться к этим изменениям, осуществляя обмен информацией со средой. В процессе адаптации изменяется и степень анизотропии биосистемы в разных ее слоях, что связано с изменением пространственной организации как целых клеток, так и их внешних структур. Степень же анизотропии можно определять с помощью регистрации спектральных характеристик, полученных при разных поляризациях электромагнитного излучения (так называемые дихроичные отношения) и получения цифровых данных. По соотношению этих данных для целых клеток и их внешних структур (A) можно характеризовать организованность биосистемы и, следовательно, ее функциональное состояние. Анализ проводили по полосам поглощения белков амид 1 (A_1) и амид 2 (A_2).

Тогда сопоставление значений A должно характеризовать изменение состояния живой системы, цифровые значения A должны характеризовать степень изменения состояния системы, а их изменения во времени характеризуют скорость этих изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пробы брались из реки Москвы в двух точках, резко отличающихся по загрязненности. Эти пробы помещались в сосуд, где располагался диализный мешок с культурой цианобактерий. Анализ культуры проводился в двух начальных фазах ее развития. Регистрировали разницу дихроичных отношений для внешних структур и целых клеток цианобактерий, находящихся в диализном мешке, как для загрязненной водной пробы, так и

для более чистой. Анализ проводили на пробах не только отличающихся по загрязненности, но и в разное время года: осень, зима, весна. Полученные данные подтверждают возможность использования предложенной методологии для анализа состояния различных природных водоемов.

В заключение следует сказать, что, вероятно, ту или иную культуру в диализном мешке следует выбирать, исходя из той задачи, которую необходимо решить, т.к. разные культуры обладают различной чувствительностью к тем или иным загрязнителям.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Диализное культивирование микроорганизмов как адекватная модель контроля. популяций при исследовании экосистем./ Лебедева А.Ф., Барский Е.Л., Саванина Я.В. и др. // Вестн. Моск. ун-та, сер. «Биология», 2010. № 2. С. 15-20.
2. Хильми Г.Ф. Основы физики биосферы. Л.: Гидрометеиздат, 1966.
3. Заличев Н.Н. Энтропия информации и сущность жизни. М.: Радиоэлектроника, 1995.
4. Малахов Ю.И., Королев Ю.Н., Калабеков А.Л. Использование методов спектроскопии нарушенного полного внутреннего отражения для анализа биологических объектов, // Измерительная техника. 2002. № 8. С. 40–45.

E.L. Barsky, Ya.V. Savanina, S.U. Koroleva, I.A. Fomina, U.N. Korolev, E.S. Lobakova

*M.V.Lomonosov Moscow State University, Biological Faculty, Russia
119899, Moscow, Leninskie Gori, 1, Bld 12, E-mail: cordekor@list.ru*

RECORDING SPECTRA IN HEMODIALYSIS CULTURE TO CONTROL WATER POLLUTION

Control of pollution of water bodies is one of the major challenges in the environment. To assess the ecological status of natural objects to the dialysis population organisms cultivation. It is known that the cell with the cultivation on some aspects of life corresponds to real-world environmental conditions. Extracellular metabolites, concentrated dialysis bag are associated with the capacity to Exchange metabolites with the exterior so that you can use it for bio-indication of pollution of the natural environment. This is not possible without the use of optical methods record changes spatial organization of macromolecules important biopolymers cell culture. A solution was found in a comparative study of culture techniques of spectroscopy in the infrared range. Test dynamic characteristics were differences in the object, which corresponded to changes in pollution in the aquatic environment.

SPECTROSCOPY, ENTROPY, MICROORGANISMS