

Д14-2002-130

А. И. Белокобыльский*, Э. И. Гинтури*, Н. Е. Кучава*,
Е. И. Киркесали, Л. М. Мосулишвили*,
М. В. Фронтасьева, С. С. Павлов, Н. Г. Аксенова

**АККУМУЛЯЦИИ СЕЛЕНА И ХРОМА КЛЕТКАМИ
SPIRULINA PLATENSIS В ДИНАМИКЕ РОСТА**

Направлено в «Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry»

*Институт физики им. Э. Л. Андроникашвили АН Грузии, Тбилиси

Введение

В последнее время все большее число исследований, выполненных в области биохимии, микробиологии и медицины, свидетельствуют об исключительно важной роли следовых элементов в функционировании живых систем. Избыток или недостаток тех или иных жизненно важных элементов (таких как Se, Zn, I, Cr, Cu и др.) зачастую ведет к серьезным нарушениям естественных процессов как в организме человека, так и в любой живой системе, включая микроорганизмы [1,2].

В этой связи изучение особенностей взаимодействия следовых элементов с живыми системами и их эндогенного включения в биоконплексы представляет значительный интерес. В качестве модели живой системы была выбрана сине-зеленая микроводоросль *Spirulina platensis* (*Sp. pl.*) и изучалось ее взаимодействие с такими жизненно важными элементами, как селен и хром.

Благодаря богатому составу и свойствам *Sp. pl.* широко используется в качестве пищевой биологически активной добавки (БАД), благотворно влияя на нормализацию процессов организма и его защитных функций [3,4]. Она способна биогенно включать необходимые элементы в свои биоконплексы в процессе роста в питательной среде, а также служить в некотором роде биологическим фильтром, аккумулируя их в нетоксичной форме и заданных дозах при естественном росте биомассы.

Особенности взаимодействия *Sp. pl.* с селеном и возможность его целенаправленного эндогенного включения в биомассу *Sp. pl.* изучались авторами ранее с использованием нейтронного активационного анализа (НАА) [5,6]. НАА также применялся нами в исследованиях взаимодействия хрома с биомассой *Sp. pl.* Выбор этих элементов обуславливался их важной ролью в некоторых жизненных функциях человеческого организма, а также практическими аспектами возможного использования биомассы *Sp. pl.*, обогащенной Se или Cr.

В данной работе предложены исследования по изучению взаимодействия *Sp. pl.* с селеном и хромом одновременно при культивации клеток в питательной среде, содержащей соответствующие соединения этих элементов.

Как известно, при взаимодействии живых систем с различными следовыми элементами одновременно в одних случаях могут наблюдаться явления синергизма, а в других – антагонизма. С этой точки зрения изучение поведения Se и Cr при их одновременной аккумуляции клетками *Sp. pl.* представляет особый интерес.

Следует учитывать, что процессы аккумуляции металлов клетками микроорганизмов могут протекать во времени по-разному. Время связывания металла зависит от механизма этих процессов. Связывание металлов клеточной поверхностью по типу адсорбции, не зависящее от температуры и не требующее энергозатрат, происходит быстро – в течение промежутков времени от нескольких секунд до часа. Активный транспорт металла внутрь клеток, требующий энергозатрат и зависящий от температуры, происходит медленнее – в течение суток и более [7].

Исходя из этих закономерностей выбирались экспериментальные условия для исследования кинетики процессов аккумуляции Se и Cr клетками *Sp. pl.*

Эксперимент

Культивация клеток и пробоподготовка

В экспериментах использовался штамм сине-зеленой микроводоросли *Spirulina platensis* IPPAS B-256, полученный из альгеологической коллекции Института физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН.

Культивация клеток *Sp. pl.* проводилась в накопительном режиме в стандартной водно-солевой питательной среде Заруха при температуре +34°C, постоянной освещенности 3000 люкс, обеспечиваемой люминесцентными лампами, и перемешивании на установке УВТМ-12-250. Se(IV) и Cr(III) вводили в среду культивирования в форме селенита натрия (Na_2SeO_3) и уксусно-кислого хрома ($\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COOH})_3$).

В связи с тем, что сохранение "естественных" свойств биомассы *Sp. pl.*, характерных для среды Заруха без всяких добавок, в ходе эксперимента по аккумуляции Se(IV) и Cr(III) было одним из важнейших условий, проводился постоянный микроскопический контроль состояния клеток в трихомах *Sp. pl.*, а ее белковый состав проверялся гель-электрофорезом в полиакриламидном геле.

По тем же соображениям предварительно определялись необходимые концентрации Se(IV) и Cr(III) в питательной среде, обеспечивающие аккумуляцию этих элементов при сохранении естественного прироста биомассы и ее качества. Для этого исследовалась динамика роста клеток *Sp. pl.* в питательной среде, содержащей соединения Se(IV) и Cr(III) в аналогичных концентрациях в интервале 1–100 мг/л, для каждого в отдельности. Исследования показали, что в обоих случаях увеличение биомассы *Sp. pl.* носит линейный характер и рост концентраций нагрузки до 10 мг/л практически не влияет на прирост и качество трихомов *Sp. pl.* Существенные изменения прироста биомассы наблюдались при концентрациях 50–100 мг/л – появлялись хлорозные клетки и увеличивалось число коротких трихомов. По сравнению с контрольными образцами на 10–20% снижалось содержание хлорофилла. Таким образом, для селена была выбрана концентрация 5 мг/л, а для хрома – 3 мг/л.

В первом эксперименте культивация *Sp. pl.* проводилась в питательной среде с добавлением селенита натрия в концентрации Se(IV) 5 мг/л.

Во втором эксперименте в питательную среду при культивации *Sp. pl.* добавлялся уксусно-кислый хром в концентрации Cr(III) 3 мг/л.

В третьем эксперименте культивация проводилась в присутствии тех же соединений хрома и селена одновременно в аналогичных концентрациях. Во всех трех экспериментах начальная концентрация инокулята *Sp. pl.* составляла 0,4 г/л. Культивация проводилась в течение 4 суток. Во всех трех экспериментах пробы для анализа отбирались по прошествии 1, 2, 3 и 4 суток.

Урожай биомассы собирали путем центрифугирования при 3000 g в течение 20 мин при 4 °С, с последующим промыванием бидистиллированной водой и центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин.

Полученные таким образом образцы подвергались лиофильной сушке на специальном лиофилизаторе, разработанном авторами ранее [8], а затем элементный состав этих образцов определялся с помощью нейтронного активационного анализа.

В течение всех экспериментов проводился микроскопический контроль состояния *Sp. pl.*

Количественное определение содержания хлорофилла в биомассе проводилось по Реббелену в 85% экстракте ацетона, белковый состав исследовался методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле по методу Леммли [9].

Анализ

Содержание селена и хрома в полученных образцах определялось методом эпитеплового нейтронного активационного анализа (ЭНАА) на импульсном быстром реакторе ИБР-2 в ЛНФ ОИЯИ (Дубна) при потоке нейтронов $10^{12} \text{ н}/(\text{см}^2 \cdot \text{с})$.

Характеристики каналов облучения и пневмотранспортной системы на ИБР-2 даны в работе [10]. Методика ЭНАА образцов *Sp. pl.* описана в работах [5,6].

Контроль качества аналитических измерений проводился с помощью аттестованных стандартов, специально предназначенных для анализа биологических образцов: лишайника (IAEA, Lichen-336), донных отложений (IAEA SDM-2Т) и датского мха (ДК-1).

Обработка данных ЭНАА и определение концентраций селена и хрома проводились с помощью методики и программ, разработанных и используемых в ЛНФ ОИЯИ [11].

Обсуждение результатов

Результаты ЭНАА образцов для трех описанных экспериментов представлены на рис. 1, 2 и 3. На рис. 1 показана динамика роста концентрации Se в биомассе *Sp. pl.*, культивируемой в питательной среде с нагрузкой селенитом натрия при концентрации Se 5 мг/л.

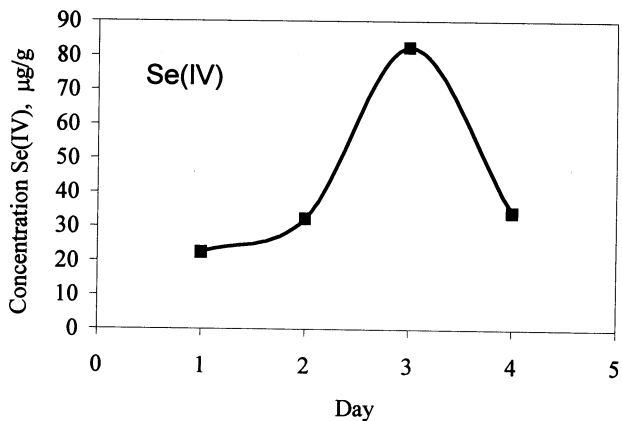


Рис. 1. Динамика накопления Se(IV) клетками *Spirulina platensis*

На рис. 2 дана аналогичная зависимость для хрома в виде уксуснокислого хрома с концентрацией Cr(III) 3 мг/л.

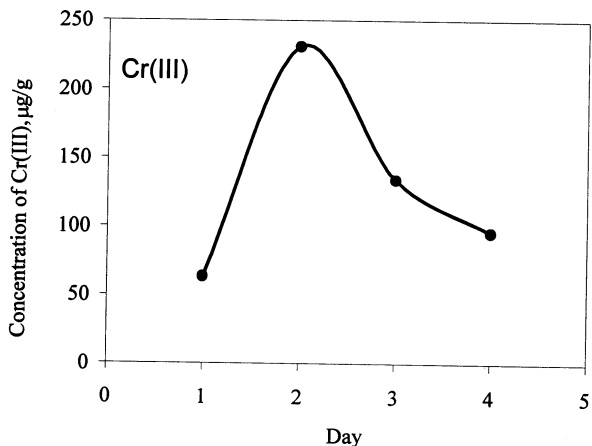


Рис. 2. Динамика накопления Cr(III) клетками *Spirulina platensis*

На рис. 3 показаны результаты, полученные при комбинированном воздействии Se(IV) и Cr(III) в аналогичных концентрациях в питательной среде.

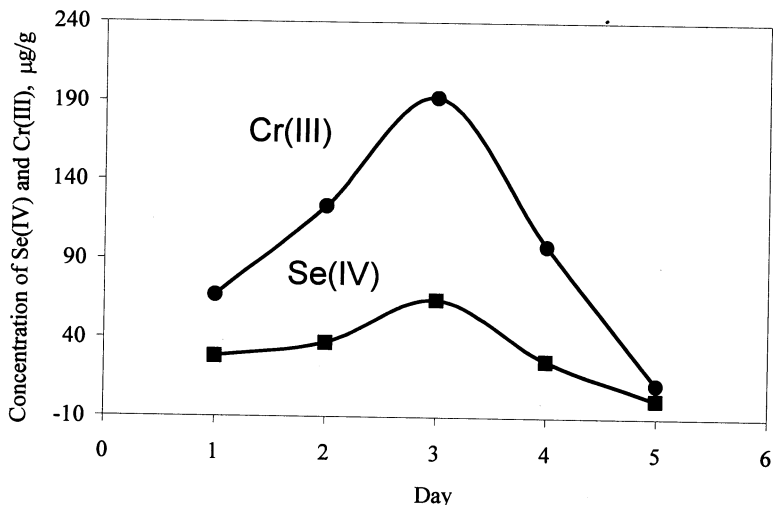


Рис. 3. Динамика накопления Se(IV) и Cr(III) клетками *Spirulina platensis*

Как видно из полученных результатов, скорость аккумуляции Cr(III) больше скорости аккумуляции Se(IV) при раздельном воздействии (рис. 1 и 2). При комбинированном воздействии накопление Cr(III) в биомассе *Sp. pl.* идет в течение того же времени, что и Se(IV). При этом *Sp. pl.* более интенсивно и быстро накапливает Cr(III) как при раздельном, так и при комбинированном воздействии. Это может быть связано с тем, что, находясь в органическом соединении ($\text{Cr}(\text{CH}_3\text{COOH})_3$), хром легче проникает в клетки, чем селен, находящийся в питательной среде в форме неорганического соединения (Na_2SeO_3).

Общий характер кривых аккумуляции Se(IV) и Cr(III) при их комбинированном воздействии на клетки *Sp. pl.* сохраняется, однако наблюдается четкая картина антагонизма, проявляющегося в существенном снижении аккумуляции Se(IV) в присутствии Cr(III). Так как Se(IV) в форме SeO_3^{2-} должен проникать в клетки *Sp. pl.* по анионным транспортным каналам, а Cr(III) в форме Cr^{3+} – по катионным, то они не являются конкурентами в процессах мембранного транспорта в клетки. Поэтому наблюдаемый антагонизм селена и хрома в ходе аккумуляции, по всей вероятности, связан с процессами внутриклеточного метаболизма.

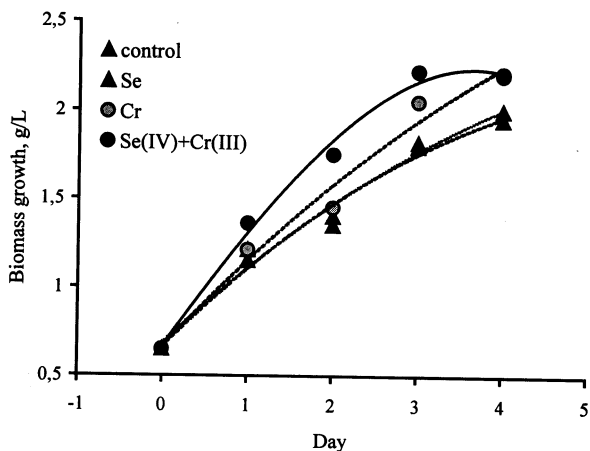


Рис. 4. Динамика роста биомассы *Spirulina platensis* при нагрузке питательной среды Se(IV) и Cr(III)

Как показали результаты изучения динамики роста *Sp. pl.*, приведенные на рис. 4, существенных различий в приросте биомассы для трех рассматриваемых экспериментов не наблюдается. Во всех случаях идет увеличение роста биомассы вплоть до 4-го дня. Здесь следует отметить, что при аккумуляции тяжелых металлов живыми системами лишь 30–50% клеток популяции участвует в их накоплении [7].

Характер полученных кривых аккумуляции (рис. 1–3) с учетом динамики роста биомассы (рис. 4) позволяет предположить, что во всех случаях интенсивный рост биомассы и одновременное включение исследуемых элементов в клетки *Sp. pl.* приводят к уменьшению их концентрации как в питательной среде, так и в общем количестве биомассы.

Можно предположить, что при дополнительном неоднократном введении соединений Se(IV) и Cr(III) в питательную среду характер кривых аккумуляции был бы аналогичен кривым роста биомассы.

Микроскопический контроль образцов суспензии *Sp. pl.*, отбираемых во всех экспериментах ежедневно, показал, что во всех случаях клетки *Sp. pl.* цитологически не отличались от контрольных.

Содержание хлорофилла в биомассе *Sp. pl.* и белковый состав по сравнению с контролем также не менялись.

Выводы

1. Изучена динамика аккумуляции Se(IV) и Cr(III) клетками *Spirulina platensis* при раздельном и комбинированном воздействии в питательной среде во время культивации.
2. Определены условия комбинированного включения селена и хрома в биомассу *Spirulina platensis* в процессе культивации с сохранением естественного качества и свойств *Spirulina platensis*.
3. Установлено взаимное антагонистическое влияние Se(IV) и Cr(III) в процессе культивации *Spirulina platensis* в питательной среде с комбинированной нагрузкой соединениями этих элементов, приводящее к подавлению аккумуляции Se(IV).

* * *

Работа выполнена при поддержке МАГАТЭ (проект IAEA-11528 (RBF)) и МНТЦ (ISTC), проект G-408.

Литература

1. Trace elements in human nutrition and health. World Health Organization. Geneva. 1996.
2. H.A. Schroeder, D.V. Frost, I.I. Balassa. - Essential trace metals in man. *J. Chron. Dis.*, (1970), Vol. 23, 227-243.
3. A. Vonshak. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell Biology and Biotechnology*. Taylor&Francis, 1997.
4. A. Belay, Y. Ota, K. Miyakawa, H. Shimamatsu. - Current Knowledge on Potential Health Benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.*, (1993), No. 5, 235-241.
5. L.M. Mosulishvili, Ye.I. Kirkesali, A.I. Belokobylsky, A.I. Khizanishvili, M.V. Frontasyeva, S.F. Gundorina, C.D. Oprea. Epithermal neutron activation analysis of blue-green algae *Spirulina platensis* as a matrix for selenium-containing pharmaceuticals. *JRNC* (2002), Vol.252, No. 1, 15-20.
6. L.M. Mosulishvili, E.I. Kirkesali, A.I. Belokobylsky, A.I. Khizanishvili, M.V. Frontasyeva, S.S. Pavlov, S.F. Gundorina. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. *JINR Preprint D14-2001-39*. Dubna, 2001.
7. О.Ю. Сенцова, В.Н. Максимова. Действие тяжелых металлов на микроорганизмы. - *Успехи микробиологии*, (1985), вып. 20, 227-252.
8. L.M. Mosulishvili, V.S. Nadareishvili, N.E. Kharabadze, A.I. Belokobylsky. Facility for lyophilization of biological preparatoinis. Patent USSR N 779765, Bull. 42, (1980).
9. U. K. Leammli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the hesd of bacteriophage T4. *Nature*, (1970), Vol. 227, 680-685.
10. M. V. Frontasyeva, S. S. Pavlov. Analytical investigations at the IBR-2 reactor in Dubna. *JINR Preprint E14-2000-177*, Dubna, 2000.
11. T. M. Ostrovnyaya, L. C. Nefedyeva, V. M. Nazarov, S. B. Borrakov and L. P. Strelkova. Software for INAA on the basis of relative and absolute methods using nuclear data base. - In: Activation analysis in environment protection. D 14-93-325, Dubna, 1993, 319-326.

Получено 5 июня 2002 г.

Белокобыльский А. И. и др.

D14-2002-130

Аккумуляция селена и хрома клетками *Spirulina platensis*
в динамике роста

Описаны результаты исследований динамики процессов аккумуляции Se(IV) и Cr(III) клетками сине-зеленой микроводоросли с помощью эпитеплового нейтронного активационного анализа. Изучено влияние селена и хрома на некоторые биохимические свойства биомассы *Spirulina platensis*. Выявлен антагонистический характер взаимодействия Se(IV) и Cr(III) при их комбинированном использовании во время культивации *Spirulina platensis*, сопровождающейся подавлением процесса аккумуляции Se(IV).

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им. И. М. Франка ОИЯИ и Институте физики им. Э. Л. Андроникашвили АН Грузии.

Препринт Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 2002

Перевод авторов

Belokobylsky A. I. et al.

D14-2002-130

Se(IV) and Cr(III) Accumulation Process in Dynamics
by the Cells of *Spirulina Platensis*

The ENAA results of the Se(IV) and Cr(III) accumulation process in dynamics by the cells of blue-green alga *Spirulina platensis* are reported. The influence of selenium and chromium on some biochemical features of *Spirulina platensis* biomass was studied. The antagonistic character of Se(IV) and Cr(III) interaction was revealed while their combined introduction into the nutrient medium in the process of *Spirulina platensis* cultivation. In this process Se(IV) accumulation was eliminated.

The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR, and at the E. L. Andronikashvili Institute of Physics of the Georgian Academy of Sciences, Tbilisi.

Preprint of the Joint Institute for Nuclear Research. Dubna, 2002

Редактор *М. И. Зарубина*
Макет *Е. В. Сабаевой*

ЛР № 020579 от 23.06.97.

Подписано в печать 27.06.2002.

Формат 60 × 90/16. Бумага офсетная. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 0,44. Уч.-изд. л. 0,52. Тираж 210 экз. Заказ № 53398.

Издательский отдел Объединенного института ядерных исследований
141980, г. Дубна, Московская обл., ул. Жолио-Кюри, 6.