

Использованием дрожжей *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* в качестве индикатора токсичности наноматериалов на основе соединений цинка.

Секция: Экологический мониторинг.

Выполнила:

Сергеева Ольга Станиславовна,

ученица класса М-11-1

МБОУ «Лицей№2» г. Чебоксары.

Научный руководитель:

Тихонова Лариса Александровна,

учитель биологии и экологии

МБОУ «Лицей№2» г. Чебоксары.

Чебоксары, 2020

Оглавление

Введение.....	2
Глава 1. Обзор литературы по теме исследования.	4
1.1. Характеристика наночастиц на основе цинка цинка.	4
1.2. Обоснование выбора объекта для биотестирования.	4
1.3. Материалы и методы.	5
Глава 2. Ход исследования.....	7
2.1. Этапы исследования:	7
2.2. Результаты исследования по методике №1.	7
2.3. Результаты исследования по методике №2.	8
Глава 3. Итоги исследования.	9
Использованная литература:	11
Приложения	12

Введение.

Мы живем в период бурного развития нанотехнологий, которые призваны стать основным прорывом в области высоких технологий. Нанотехнологии могут преобразовать не только производство, но и человеческую жизнь. В то же время необходимо понять, что наноструктурные материалы могут вызывать загрязнение окружающей среды[1].

Применение дрожжей *S. cerevisiae* как индикатора токсичности наночастиц способно наглядно показать и оценить результат влияния человеческой деятельности на окружающую среду. Из этого и следует **актуальность** темы проекта.

Гипотеза: негативное влияние наночастиц тяжёлых металлов на метаболизм дрожжей зависит от концентрации наночастиц в растворе.

Цель: изучить влияние наночастиц на основе цинка на дрожжевую клетку.

Задачи нашей работы:

1. Изучение свойств наночастиц тяжёлых металлов.
2. Исследование морфологии дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae* на USB и СЗМ микроскопах.
3. Экспериментальное исследование зависимости концентрации цинка в растворе на скорость пенообразования дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Оценка объёма образованной пены под влиянием растворов солей цинка в разной концентрации.
5. Анализ полученных результатов.

Методы:

1. Анализ научной литературы на данную тематику.
2. Проведение серий экспериментов по методикам Вятчина О.Ф., Жданова Г.О., Стом Д.И. И.В. Луцаева, С.Н. Моргалев и Ларина С. Л., Будко Е. В., Хабарова А. А.
3. Качественный анализ полученных результатов.
4. Сравнение результатов.

Предмет исследования: влияние растворов солей цинка разной концентрации на жизнедеятельность дрожжевых клеток.

Объект исследования: дрожжевые клетки.

Практическая значимость работы: на основании полученных данных можно была выявлена оптимальная концентрация наноматериалов в растворе с целью снижения их негативного влияния на окружающую среду.

Теоретическая значимость работы: при помощи изучения воздействия наноматериалов на живые организмы, возможно их безопасное использование без нанесения ущерба биосфере и здоровью человека. Также мы считаем, что возможно использование дрожжей в качестве индикатора на наличие в воде токсичных наноматериалов.

Новизна данного исследования заключается в том, что токсичность наноматериалов в данный момент не до конца изучена.

Глава 1. Обзор литературы по теме исследования.

1.1. Характеристика наночастиц на основе цинка цинка.

Среди микронутриентов, критически необходимых для поддержания нормального уровня гомеостаза живого организма особенно выделяется цинк. Дополнительное введение микроэлемента проводится, как правило, с применением растворимых ионизированных соединений. Это связано с пониманием общих механизмов транспорта металлов через перемещение ионов посредством семейства переносчиков Zip и Znt[2]. Однако, с развитием технологий диспергирования, возрос интерес к исследованию биологической активности микро- и наноразмерных малорастворимых соединений.

Результат биологической активности соединений цинка может быть продемонстрирован на культуре хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Исходя из биологического действия элемента, активность его соединений может проявляться в угнетении ферментов или в их активации[4]. Учитывая зависимость биологического действия соединений от размера и морфологии частиц, возникает необходимость исследования активности предложенных нами частиц неорганических соединений цинка разной степени диспергирования в отношении дрожжей[1].

1.2. Обоснование выбора объекта для биотестирования.

Для оценки токсичности солей тяжелых металлов широко используют различные эукариотические микроорганизмы. Особенно перспективным объектом для биотестирования служат дрожжи *S. cerevisiae*, которые являются одноклеточными микроорганизмами, обладающими высокой скоростью роста[3]. В то же время, у дрожжей, как у эукариотических организмов, высокая степень гомологии клеточной организации и обмена веществ с высшими эукариотами. Применяют дрожжи и для биотестирования тяжелых металлов[2]. Большинство биотестов основаны

на определении цитотоксического и генотоксического эффектов, на подавлении метаболической активности дрожжей. Эти приемы биотестирования достаточно трудоемки, требуют специального оборудования и особых условий. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* служат удобной эукариотической моделью для определения токсичности наноматериалов, так как обладают большой скоростью роста[4].

1.3. Материалы и методы.

1. Методика О.Ф. Вятчина “Биотестирование пенообразующей активности дрожжей”.

В качестве тест-объекта использовали препарат сухих пекарских дрожжей «Саф-Момент» (ООО «Саф-Нева», Россия) и культуру *S. cerevisiae*, выделенную авторами из этого препарата. Для проведения исследований брали следующие соли тяжелых металлов (хч): $Zn(COOH)_2$, $Zn(SO_4)_2$ [1]. При оценке токсичности исследуемых солей тяжелых металлов определяли их влияние на рост *S. cerevisiae*. Для культивирования дрожжей использовали среду YEPD следующего состава (г/л): глюкоза — 20,0; пептон — 10,04 дрожжевой автолизат — 5,0.

В колбах объемом 250 мл готовили по 50 мл жидкой среды YEPD и добавляли в нее соли тяжелых металлов так, чтобы их конечная концентрация в среде составляла: 0,001; 0,01; 1,0. В качестве контроля брали среду YEPD без добавления солей тяжелых металлов. [2] Среды засеивали суспензией *S. cerevisiae* в количестве 1% (от общего объема) и инкубировали в стационарных условиях при температуре +30 °С. Количество жизнеспособных клеток дрожжей в средах определяли через 24 ч. Влияние солей тяжелых металлов на выживаемость дрожжей оценивали после 3-часового экспонирования дрожжевых суспензий с добавлением 0,0001—10 г/л тестируемых токсикантов. Количественный учет жизнеспособных клеток дрожжей осуществляли по методу Коха. При

исследовании действия солей тяжелых металлов на длительность lag-фазы *S. cerevisiae* измеряли оптическую плотность культуральной жидкости через каждые 30 мин в течение 12 ч. Воздействие исследуемых солей тяжелых металлов на пенообразующую активность *S. cerevisiae* определяли по авторскому экспресс-приему. Для этого в 20 мл раствора исследуемой соли тяжелого металла вносили 1,36 г сухих дрожжей, тщательно перемешивали и добавляли 0,4 г глюкозы. Приготовленную реакционную смесь разливали по 3 мл в мерные пробирки объемом 10 мл каждая, инкубировали в течение 15 мин при температуре +20°C, затем определяли объем образовавшейся пены. Контролем служила суспензия дрожжей с глюкозой без внесения солей тяжелых металлов[1].

2. Методика С. Л. Ларина “Влияние соединений цинка на подъемную силу тест культуры *S. cerevisiae*”.

Активность дрожжей определена по ускоренному методу определения подъемной силы. От средней пробы дрожжей хлебопекарных прессованных высокоактивных «Премиум» (ОАО «Комбинат пищевых продуктов») отбирали навеску, к которой прибавляли массу исследуемого соединения. Полученную массу замешивали в тесто с приданием ему формы шарика, шарик помещали в стакан с водой и термостатировали. Количество параллельных опытов составило 5-6. При отсутствии всплытия наблюдения продолжали не менее 1,5 часов. В работе использованы промышленные образцы соединений цинка: ZnO , $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $Zn(OH)_2$ и образцы, полученные в лабораторных условиях[2].

Глава 2. Ход исследования.

2.1. Этапы исследования:

1. Формулировка темы, определение цели, задач, объекта и предмета исследования (сентябрь 2019 г);
2. Постановка проблемы, выдвижение гипотезы - (сентябрь 2019 г);
3. Определение методов исследования - (сентябрь 2019 г);
4. Сбор и систематизация полученного материала - (октябрь 2019 г);
5. Подготовка к проведению экспериментов, поиск необходимых материалов - (ноябрь 2019 г);
6. Проведение серии экспериментов - (декабрь 2019 г);
7. Анализ полученных данных - (январь 2020 г).

2.2. Результаты исследования по методике №1.

Методика №1. "Сравнительная оценка чувствительности разных тест-функций *Saccharomyces cerevisiae* к солям тяжелых металлов" показало следующее. В ходе эксперимента мы выяснили, что активирующее действие на культуру *S.cerevisiae* в эксперименте объяснимо влиянием ионов цинка, необходимых для нормального функционирования дрожжевой клетки и позитивного влияния на ферменты. Это объясняет активное пенообразование в пробирке №4, с концентрацией соединений цинка 0.001 г/л (Приложение №1). При повышении концентрации цинка в растворе происходит ингибирование деятельности ферментов дрожжевой клетки, из-за чего пенообразование в пробирке №2-3 заметно уменьшается (Приложение №2). Следовательно, оптимальная концентрация соединений цинка в растворе – 0.01 г/л (Приложение №3).

2.3. Результаты исследования по методике №2.

Методика №2. Активирующее действие на культуру *S.cerevisiae* в эксперименте объяснимо сочетанием необходимой для нормального функционирования дрожжевой клетки концентрации соединения и позитивного влияния на ферменты, содержащие в своем составе ионы цинка. Основываясь на времени адаптации ферментативного комплекса дрожжевой культуры, следует отметить, что все соединения, представленные в эксперименте, оказывают ингибирующее действие на ферменты, что проявляется в уменьшении скорости газообразования. (Приложение №4). На первом этапе сбраживания участвуют только ферменты, локализованные на поверхности клеточной стенки дрожжевой клетки, ориентируясь на скорость. Затем после перестройки ферментативного комплекса, включаются ферменты локализованные внутри клетки.[3] В процессе эксперимента образцы ZnO синтезированный (рис. 2, кривая 3) и Zn(OH)₂ гелеобразный (рис. 2, кривая 5) при начальной концентрации вызывали гибель тест-культуры (о чем говорит отсутствие стартовой точки на графике). Такое явление могло наблюдаться, только в случае ингибирования и внешних и внутренних ферментов, что говорит о проникновении большого количества соединения внутрь клетки. Резкое угнетение жизнедеятельности дрожжевой культуры в присутствии наночастиц ZnO и Zn(OH)₂, по видимости, связано с повышенным образованием активных форм кислорода, который в свою очередь угнетает активность ферментативных систем (Приложение №5).

Глава 3. Итоги исследования.

На наш взгляд, соединения цинка оказывают стабильное ингибирующее воздействие на культуру *S.cerevisiae*. При повышении концентрации соединений в растворе процесс происходит значительно быстрее, что говорит о том, что ингибирующее действие растёт с концентрацией соединений цинка в растворе.

Таким образом:

- 1) Анализ литературы показал, что дрожжи являются удобной эукариотической моделью для определения токсичности наноматериалов.
- 2) Главные особенности дрожжевых грибов заключаются в том, что они являются одноклеточными микроорганизмами, обладающими высокой скоростью роста. В то же время, у дрожжей, как у эукариотических организмов, высокая степень гомологии клеточной организации и обмена веществ с высшими эукариотами.
- 3) Преимуществами тест-реакции по подавлению пенообразующей активности дрожжей являются техническая простота, экспрессность (время тест-отклика составляет 15 мин), минимальные материальные затраты, отсутствие необходимости специального микробиологического оборудования, питательных сред, поддержания культуры в жизнеспособном состоянии. Предложенная реакция может быть использована в качестве экспрессного биотеста для оценки токсичности наноматериалов.
- 4) Ацетат цинка при содержании 0,001—0,01 г/л не оказывали влияния на продолжительность лаг-фазы. Повышение концентрации до 0,1 г/л приводило к подавлению роста культуры. Наибольшее пенообразование наблюдалось в пробирках, с меньшей

концентрацией соединений цинка в растворе. Сульфат цинка оказывает более выраженное ингибирующее воздействие на дрожжевую клетку, чем ацетат цинка.

- 5) Таким образом, воздействие наночастиц металлов на окружающую среду - это чрезвычайно важная и актуальная работа, необходимая для установления научно обоснованных допустимых диапазонов концентраций наноматериалов.

Гипотеза исследования подтвердилась. Действительно, негативное влияние наночастиц тяжёлых металлов на метаболизм дрожжей зависит от концентрации наночастиц в растворе.

Исходя из приведённых результатов мы пришли к выводу, что необходима своевременная оценка значимости и опасности нанотехнологий, чтобы поддержать положительный эффект от их внедрения.

Использованная литература:

1. Вятчина О.Ф., Жданова Г.О., Стом Д.И. И.В. Луцаева, С.Н. Моргалев. Сравнительная оценка чувствительности разных тест-функций *Saccharomyces cerevisiae* к солям тяжелых металлов.
2. Ларин С. Л., Будко Е. В., Хабаров А. А. Влияние разноразмерных соединений цинка на подъемную силу тест-культуры *Saccharomyces cerevisiae* //Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – №. 5 (47) Часть 5. – С. 180-185.
3. Луцаева И. В., Моргалев Ю. Н. Изучение воздействия наночастиц TiO₂ и Al₂O₃ на бактерии *Pseudomonas fluorescens* и *Bacillus mucilaginosus* //Вестник Томского государственного университета. Биология. – 2009. – №. 4 (8).
4. Павленко В.В., Демидова Л.А., Трубачева Л.Я., и др. Метод оценки токсичности и мутагенности сточных вод и химических соединений // Методы биотестирования вод. Черноголовка, 1988. С. 73—77.

Приложения

Приложение №1. Результаты исследования №1.

Таблица 1. Пенообразовательная активность дрожжей, опыт 1.

	Объём образовавшейся пены	Концентрация раствора	Раствор
Пробирка №4	0.5 см	0.001 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂
Пробирка №3	0.3 см	0.01 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂
Пробирка №2	0.25 см	0.1 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂
Пробирка №1	0.23 см	1 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂

Таблица 2. Пенообразовательная активность дрожжей, опыт 2.

	Объём образовавшейся пены	Концентрация раствора	Раствор
--	---------------------------------	--------------------------	---------

Пробирка №4	0.55 см	0.001 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂
Пробирка №3	0.45 см	0.01 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂
Пробирка №2	0.37 см	0.1 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂
Пробирка №1	0.2 см	1 г\л	Zn(CH ₃ COOH) ₂

Таблица 3. Пенообразовательная активность дрожжей опыт 3.

	Объём образовавшейся пены	Концентрация раствора	Раствор
Пробирка №4	0.6 см	0.001 г\л	Zn(SO ₄) ₂
Пробирка №3	0.54 см	0.01 г\л	Zn(SO ₄) ₂
Пробирка №2	0.45 см	0.1 г\л	Zn(SO ₄) ₂
Пробирка №1	0.4 см	1 г\л	Zn(SO ₄) ₂

Таблица 4. Пенообразовательная активность дрожжей, опыт 4.

	Объём образовавшейся пены	Концентрация раствора	Раствор
Пробирка №4	0.57 см	0.001 г\л	Zn(SO4)2
Пробирка №3	0.54 см	0.01 г\л	Zn(SO4)2
Пробирка №2	0.45 см	0.1 г\л	Zn(SO4)2
Пробирка №1	0.4 см	1 г\л	Zn(SO4)2

Приложение №2. Результаты исследования №2.



Рис. 1. Образцы в первый день опыта.
дня.

Рис. 2. Образцы спустя 3

Приложение №3. Исследование оптических свойств суспензии при помощи фотометра.

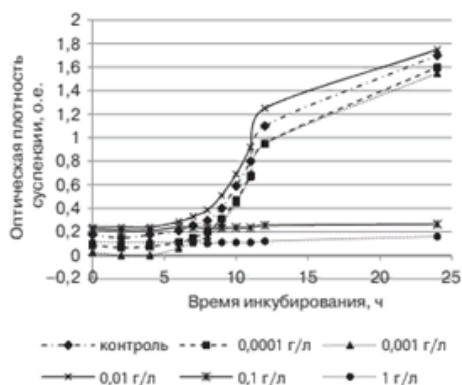
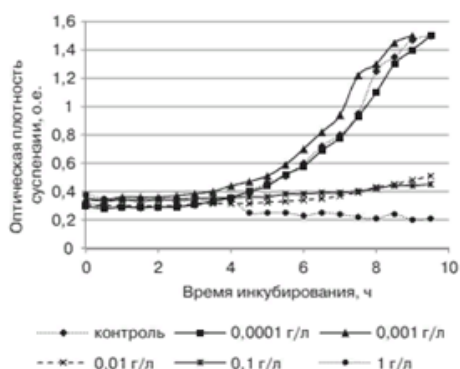


Диаграмма 1. Оптические свойства. Пробирка №1.

Диаграмма 2.

Оптические свойства. Пробирка №2.

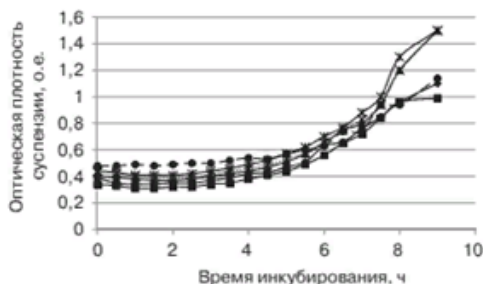
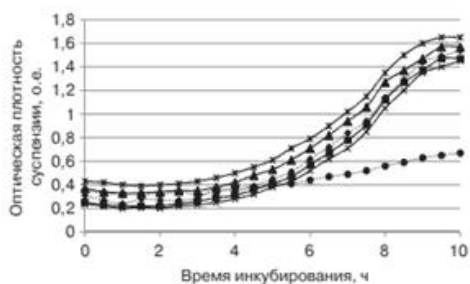


Диаграмма 3. Оптические свойства. Пробирка №3.

Диаграмма 4.

Оптические свойства. Пробирка №4.

Приложение 4.

Таблица 5. Зависимость времени всплытия шарика от соединения цинка, находящегося в растворе. Опыт 1.

	ZnO	Zn(OH) ₂	ZnSO ₄
Время всплытия	7 мин	20 мин	15 мин
Масса шарика	1 г	1 г	1 г

Таблица 6. Зависимость времени всплытия шарика от соединения цинка, находящегося в растворе. Опыт 2.

	ZnO	Zn(OH) ₂	ZnSO ₄
Время всплытия	9 мин	24 мин	17 мин
Масса шарика	1 г	1 г	1 г

Приложение №5.

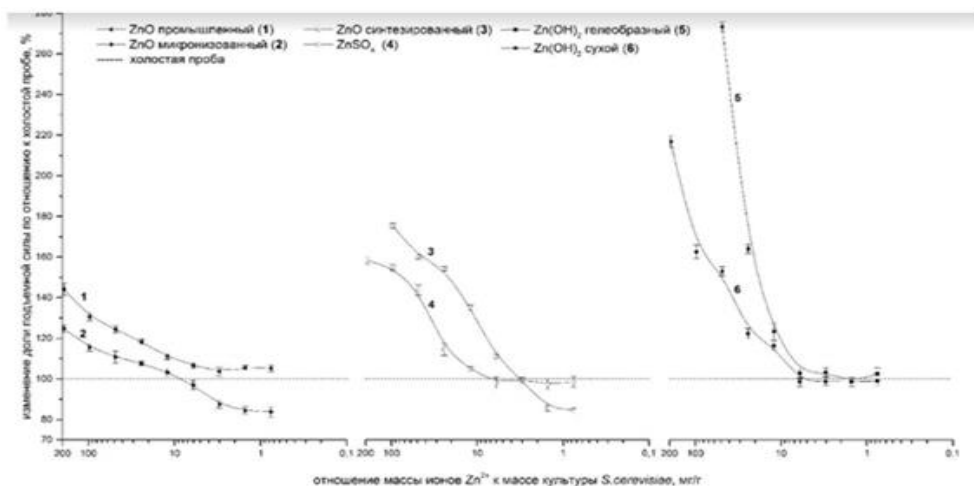


Диаграмма 5. Зависимость степени изменения подъемной силы тест-культуры.