

UDC 579.69

### **Effect of Iron Fe (II) and Fe (III) in a Binary System Evaluated Bioluminescent Method**

<sup>1</sup> Elena Sorokina<sup>2</sup> Tatiana Yudina<sup>3</sup> Vadim Danilov

<sup>1</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, Russia  
School of Biology, 119899 Moscow, Leninskie Gory, 1, build. 12  
PhD, research associate  
E-mail: sorokina\_ev77@mail.ru

<sup>2</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, Russia  
School of Biology, 119899 Moscow, Leninskie Gory, 1, build. 12  
PhD, research associate  
E-mail: tp-uydina@mail.ru

<sup>3</sup> M. V. Lomonosov Moscow State University, Russia  
School of Biology, 119899 Moscow, Leninskie Gory, 1, build. 12  
Dr. (Biology), Professor, main research associate  
E-mail: vsdanil@mail.ru

**Abstract.** The effect of iron ions Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup> on the bioluminescent recombinant strain of *Escherichia coli* in a single-component and binary system. Found that for the bacteria *E. coli* Fe<sup>3+</sup> ions are more toxic than Fe<sup>2+</sup>. Under the combined effect of iron toxicity increases, the percentage of luminescence quenching increases, but the value is much less than the sum of the indicator for the Fe<sup>2+</sup> and Fe<sup>3+</sup>. The biological effect of insertion of iron is not proportional to their content in the mixture.

**Keywords:** bioluminescence; recombinant strain *Escherichia coli*; toxicity; iron ions; the combined effect.

**Введение.** Одним из самых прогрессивных методов определения биологической активности различных веществ является метод с использованием люминесцентных бактерий. Любое изменение в метаболизме клеток приводит к быстрому изменению интенсивности свечения бактерий, поскольку фермент люцифераза, обеспечивающий биoluminesценцию, прямо или опосредовано реагирует на любое воздействие на клетку [1, 2]. Данный метод широко распространен для определения интегральной токсичности всех химических веществ и их смесей и позволяет следить за процессом в режиме реального времени. Тушение люминесценции бактерий пропорционально токсическому действию исследуемого агента [3, 4]. Одной из модификаций такого теста является использование не морских люминесцентных бактерий, а рекомбинантного биoluminesцентного штамма *Escherichia coli*. В таком варианте не требуется обязательной добавки NaCl, часто искажающей определение токсичности [5].

Железо играет важную роль в биологических системах, являясь необходимым катализатором многочисленных биологических реакций, связанных с переносом электронов и при функционировании ферментов [6]. Для железа наиболее характерны две разновидности ионов, а именно, Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup>. Обе эти формы железа, как и любое другое вещество, при определенных концентрациях становятся токсическими, поэтому их содержание в организме должно поддерживаться на определенном низком уровне. Высокое содержание железа в воде ухудшает ее органолептические свойства и приводит к неблагоприятному воздействию на организм [7]. Предельно допустимая концентрация (ПДК) по общему железу составляет 0.3 мг/л [6].

Предметом нашего исследования являлась оценка токсичности каждого вида железа Fe<sup>2+</sup> и Fe<sup>3+</sup> и при их совместном действии в бинарной системе, с помощью люминесцентного бактериального теста.

**Материалы и методы:** В экспериментах использовали бактериальный тест «Эколюм» («Иммунотек», Москва) разработанный в лаборатории биологически активных веществ МГУ им. М.В. Ломоносова. Тест-система представляет собой лиофилизированные бактерии *E. coli*, K12 TG1(pF1) со встроенными генами полного *CDABE lux*-оперона люминесцентной системы из бактерий *V. fischeri* 6 МГУ [8]. Во флакон с лиофильно высушенными бактериями для их регидратации вносили 10 мл стерильной дистиллированной воды (рН 7.0) и получали «маточную суспензию». Из нее путем разбавления водой готовили рабочую суспензию бактерий с конечной концентрацией клеток  $(2-3) \times 10^7$  кл/мл. Для измерения интенсивности свечения формировали пробу, которая содержала: 0.1 мл суспензии бактерий и 0.9 мл дистиллированной воды (контроль) или такой же объем токсиканта (проба) [9, 10]. В качестве токсикантов использовали соли  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в диапазоне концентрации от 0.5 до 20 мг/мл, в расчете на ионы  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ .

Для изучения бинарной системы готовили смесь ионов железа  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ . Каждая проба содержала концентрацию  $\text{Fe}^{2+}$ , вызывающую почти 50 % (в эксперименте 47 %) тушения интенсивности свечения бактерий, и изменяли концентрацию другого иона  $\text{Fe}^{3+}$  в диапазоне концентраций от 0.12 до 8.0 мг/л. Такая постановка опыта позволила проследить за возможным действием ионов железа как в сторону аддитивности и синергизма (рост тушения свечения), так и антагонизма (уменьшение тушения свечения) [11].

Токсическое действие определяли по ингибированию биолюминесценции бактерий за 30-минутный период экспозиции. Индекс токсичности вычисляли по формуле:

$$T = (I_0 - I) / I_0 * 100 \quad (1)$$

где  $I_0$  и  $I$  - интенсивность биолюминесценции в отсутствие и присутствие токсиканта [8]. Каждый эксперимент проведен в трех независимых опытах.

Использовали общепринятый показатель эффективной концентрации  $EC_{50}$ , вызывающей 50% ингибирование интенсивности свечения бактерий [1]. Вычисления  $EC_{50}$  проводили по Г - функции по формуле:

$$\Gamma = 100 \times (I_0 - I) / I \quad (2)$$

где  $I_0$  и  $I$  - интенсивность свечения в отсутствии и присутствии токсиканта.

Процент снижения интенсивности свечения рассчитывали по формуле:

$$(I/I_0) \times 100\% \quad (3)$$

Интенсивность биолюминесценции бактерий измеряли на люминометрах Luminometer 1251 BioOrbit (Финляндия) и «Биотокс-10» (Россия).

Реактивы:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  марки х.ч. и ч.д.а. Фирма Sigma.

**Результаты и обсуждения.** В работе исследовали влияние ионов железа  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  на динамику изменения индекса токсичности (рис. 1). Данные показывают, что интенсивность свечения снижается при воздействии ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в диапазоне концентраций от 0.1 до 20 мг/л. Определена величина  $EC_{50}$ , которая составляет для  $\text{Fe}^{2+}$  8.5 мг/л, для  $\text{Fe}^{3+}$  1.2 мг/л соответственно. Как видно отклик люминесцентных бактерий на ионы железа разный (рис. 1). При малых концентрациях до 2 мг/л наблюдается резкое увеличение индекса токсичности  $\text{Fe}^{3+}$ , в то время для  $\text{Fe}^{2+}$  изменения индекса менее значительны. По нашим наблюдениям индекс токсичности  $\text{Fe}^{3+}$  выходит на величину 100 уже к 10 мин измерения. На основании полученных данных по влиянию ионов железа можно сделать вывод, что для бактерий *E. coli* ионы  $\text{Fe}^{3+}$  более токсичны и, следовательно, их биологическая активность более выражена, чем у ионов  $\text{Fe}^{2+}$ .

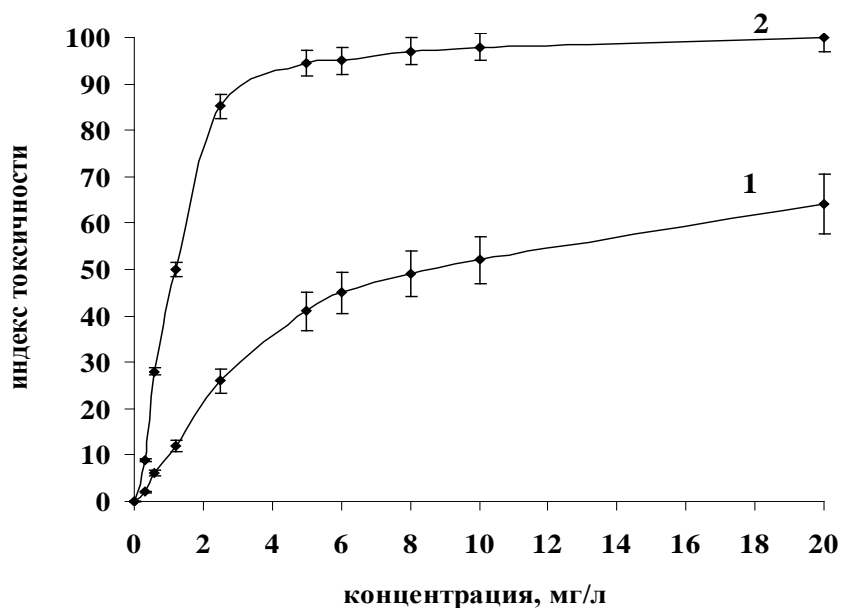


Рис. 1. Зависимость величины индекса токсичности от концентраций ионов  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  при 30 мин экспозиции. Кривая 1 -  $\text{Fe}^{2+}$ , кривая 2 -  $\text{Fe}^{3+}$

Следующим этапом исследования было изучение действия ионов железа  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  в смеси (бинарная система). В работе влияние ионов железа в смеси оценивали относительно теоретической кривой аддитивности, которая показывает, что было бы, если бы была истинная аддитивность, при которой суммируются значения процента снижения свечения, вызываемые каждым ионом в отдельности. К бактериям вносили одновременно постоянную концентрацию  $\text{Fe}^{2+}$  8.4 мг/л, дающую тушение свечения на 47% (рис. 2) и возрастающие концентрации  $\text{Fe}^{3+}$  в диапазоне концентраций выбранных на основании данных полученных ранее (рис. 1).

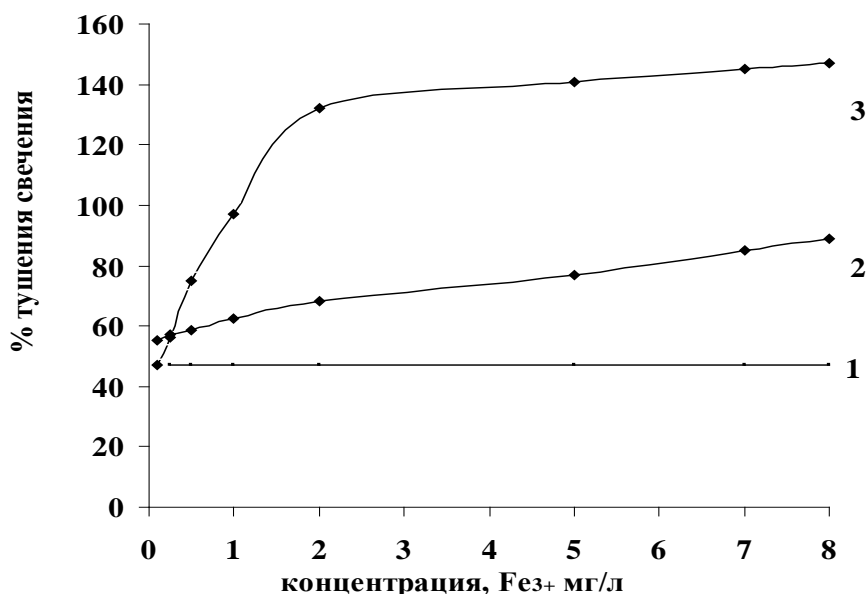


Рис. 2. Зависимость процента снижения свечения от концентрации железа в бинарной системе

Концентрация  $\text{Fe}^{2+}$  = 8.5 мг/л (кривая 1), концентрации  $\text{Fe}^{2+}$ :  $\text{Fe}^{3+}$  в разных соотношениях (кривая 2), теоретическая кривая аддитивности смеси  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$  вычислена из данных, представленных на рис. 1 (кривая 3). Погрешность измерений не превышала 5%.

В бинарной системе увеличение концентрации ионов  $Fe^{3+}$  до 8 мг/л приводит к росту процент тушения свечения (кривая 2) и общий токсический эффект  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  составляет 89 %. Из теоретической кривой аддитивности (кривая 3) видно, если ионы  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  действуют независимо друг от друга, то в смеси при концентрации  $Fe^{3+}$  8мг/л и  $Fe^{2+}$  8.5 величина процента снижения светового потока составляет 147% (рис. 2). В реальном эксперименте, как видно из кривой 2 мы видим гораздо меньшее значение процента снижения свечения. Следовательно, увеличение токсического действия в бинарной системе есть и это мы видим по росту процента тушения свечения, но токсический эффект значительно меньше, чем значения получаемые при истинной аддитивности.

Полученные результаты совместного действия ионов  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  можно объяснить, предположив наличие специфических рецепторов для каждого вида ионов железа, а также рецепторов, которые обладают родством к обоим ионам. Возможно, между двумя этими видами ионов, возникают сложные механизмы конкуренции за рецепторы, что приводит к эффекту снижения общего токсического действия. СанПиН, приводит данные по ПДК общего железа без учета количества его разных форм. В нашем исследовании показано отсутствие суммирования процента тушения светового потока (токсичности) ионов  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  как при истинной аддитивности и значение токсичности не пропорционально содержанию вносимых токсических компонентов, при этом в ПДК подразумевается пропорциональный эффект. Токсичность  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  в смеси зависит от соотношения вносимых ионов и это не учитывается в ПДК для железа [8].

Таким образом, можно сделать следующие выводы. Во-первых, ионы  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  по-разному взаимодействуют с бактериями. Скорость взаимодействия клеток с  $Fe^{3+}$  намного больше, как и индекс токсичности. Токсический эффект более выражен у ионов  $Fe^{3+}$ , чем у ионов  $Fe^{2+}$ . Во-вторых, при комбинированном действии ионов  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  токсичность возрастает, процент тушения свечения увеличивается, но эти значения гораздо меньше, чем сумма данных показателей для  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$ . Биологический эффект вносимых ионов железа не пропорционален их содержанию в смеси. В бинарной системе менее токсичные ионы  $Fe^{2+}$  не дают проявить максимальную активность ионов  $Fe^{3+}$ , приводя к снижению токсического эффекта, относительно теоретической аддитивности.

#### Примечания:

1. Johnson, B.T. Microtox acute toxicity test / B. T. Johnson // In: Small-scale Freshwater Toxicity Investigations (Blaise C. and Ferard J.-Feds), 2005. № 1. P. 69-105.
2. Данилов, В.С. Бактериальная биолюминесценция / В.С. Данилов и Н.С. Егоров. Москва: Изд-во МГУ, 1990. 152 с.
3. Bulich, A.A. Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents / A. A. Bulich, M. M Greene, D. L. Isenberg // In Aquatic Toxicology and Hasard Assessment: Fourth Conference, ASTM STP 737, American Society for Testing and Materials, 1981. P. 338-347.
4. Bulich, A.A. Use of the luminescent bacterial system for the rapind assessment of aquatic toxicity / A.A. Bulich, D. L. Isenberg // Advances in Instrumentation, 1980. № 35. P. 35-40.
5. Chang, J.C. Use of the Microtox assay system for environmental samples / J. C. Chang, P. B. Taylor, F. R. Leach // Bull Environ Contam Toxicol, 1981. Vol. 26. №2. P. 150-156.
6. Sritharan, M. Iron as a candidate in virulence and pathogenesis in mycobacteria and other microorganisms / M. Sritharan // J. of Microbiology and Biotechnology, 2000. № 16. P. 769-780.
7. Hutchinson, T.C. Heavy metal toxicity and algal bioassays / T.C. Hutchinson, P.M. Stokes // In Water Quality Parameters. American Society for Testing and Materials, Special Technical Publication, 1975. № 573. P. 320-343.
8. Санитарно-Эпидемиологические правила и нормативы СанПиН 2.1.4.1074-01 Москва, 2002.
9. Vlasova, I.I. New approach for specific determination of antibiotics by use of luminescent *Escherichia coli* and immune serum / I. I. Vlasova, T.V.Asrieli, E. M. Gavrilova, V.S. Danilov // Applied and Environmental Microbiology, 2004. Vol. 70. № 2. P. 1245-1248.
10. Ревазова Ю.А. Методика определения токсичности химических веществ, полимеров, материалов и изделий с помощью биотеста «Эколюм» / Ю.А. Ревазова,

Е.М. Севостьянова, В.С. Данилов. М: ФГУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора, 2007. 17 с.

11. Qureshi, A.A. Evaluation and refinement of the microtox test for use in toxicity screening. In: Toxicity screening procedures using bacterial systems / A.A. Qureshi, R.N. Coleman, J.H. Papan. Marcel Dekker, N.Y., 1984. P. 1-22.

#### References:

1. Danilov V.S. Bakterial'naya bioluminestsentsiya / V.S. Danilov i N.S. Egorov. Moskva: Izd-vo MGU, 1990. 152 с.

2. Sanitarno-Epidemiologicheskie pravila i normativy SanPiN 2.1.4.1074-01 Moskva, 2002.

3. Revazova Yu.A. Metodika opredeleniya toksichnosti khimicheskikh veshchestv, polimerov, materialov i izdelii s pomoshch'yu biotesta «Ekolyum» / Yu.A. Revazova, E.M. Sevost'yanova, V.S. Danilov. M.: FGUZ «Federal'nyi tsentr gigeny i epidemiologii» Rospotrebnadzora, 2007. 17 s.

УДК 579.69

### Исследование действия ионов железа $Fe^{2+}$ и $Fe^{3+}$ биоломинесцентным методом в бинарной системе

<sup>1</sup> Елена Владимировна Сорокина

<sup>2</sup> Татьяна Петровна Юдина

<sup>3</sup> Вадим Степанович Данилов

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия  
119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12

Кандидат биологических наук, научный сотрудник  
E-mail: sorokina\_ev77@mail.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия  
119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12

Кандидат биологических наук, научный сотрудник  
E-mail: tp-yudina@mail.ru

<sup>3</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия  
119991, г. Москва, ул. Ленинские горы, д.1, стр. 12

Доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник  
E-mail: vsdanil@mail.ru

**Аннотация.** Исследовано действие ионов железа  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$  на биоломинесцентном рекомбинантном штамме *Escherichia coli* в однокомпонентной и в бинарной системе. Установлено, что для бактерий *E. coli* ионы  $Fe^{3+}$  более токсичны, чем  $Fe^{2+}$ . При комбинированном действии ионов железа токсичность возрастает, процент тушения свечения увеличивается, но это значение гораздо меньше, чем сумма данного показателя для  $Fe^{2+}$  и  $Fe^{3+}$ . Биологический эффект вносимых ионов железа не пропорционален их содержанию в смеси.

**Ключевые слова:** биоломинесценция; *Escherichia coli*; токсичность; ионы железа; бинарная система.