

УДК 579.6:628.1

О. В. Крисенко, Т. В. Скляр, А. І. Вінніков, М. В. Прищепя

Дніпропетровський національний університет ім. Олесь Гончара

ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ І ЦИНКОВОГО КОМПЛЕКСУ НА ДИНАМІКУ РОСТУ БАКТЕРІЙ РОДУ *PSEUDOMONAS*

Проблема очищення стічних вод – одне з найактуальніших питань із початку століття. Особливе місце важких металів серед забруднювачів довкілля пов'язане з їх накопиченням в організмі та передачею трофічними ланцюгами, високою їх токсичністю. Розроблено сучасні технології очищення стічних вод: перспективи мають природні та найдешевші біологічні методи очищення, що являють собою інтенсифікацію природних процесів розкладання органічних сполук мікроорганізмами в аеробних або анаеробних умовах. Одні з основних – процеси нітрифікації та денітрифікації. Велика увага приділяється мікроорганізмам, здатним виконувати ці процеси. Процеси взаємодії між іонами важких металів і мікроорганізмами мають велике значення не тільки для фундаментальної науки, а і як можливе застосування у біотехнологічних процесах.

А. В. Крысенко, Т. В. Скляр, А. И. Винников, Н. В. Прищепя

Днепропетровский национальный университет им. Олесь Гончара

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И ЦИНКОВОГО КОМПЛЕКСА НА ДИНАМИКУ РОСТА БАКТЕРИЙ РОДА *PSEUDOMONAS*

Проблема очистки сточных вод – один из актуальных вопросов с начала века. Особое место тяжелых металлов среди загрязнителей окружающей среды связано с их накоплением в организме и передачей по трофическим цепям, их высокой токсичностью. Разработаны современные технологии очистки сточных вод: перспективы имеют естественные и дешевые биологические методы очистки, представляющие собой интенсификацию природных процессов разложения органических соединений микроорганизмами в аэробных или анаэробных условиях. Одни из основных – процессы нитрификации и денитрификации. Большое внимание уделяется микроорганизмам, способным выполнять эти процессы. Процессы взаимодействия между ионами тяжелых металлов и микроорганизмами представляют большой интерес не только для фундаментальной науки, а и как возможное применение в биотехнологических процессах.

A. V. Krysenko, T. V. Sklyar, A. I. Vinnikov, N. V. Prischepa

Oles Honchar Dniepropetrovsk National University

EFFECT OF HEAVY METAL IONS AND ZINC COMPLEX ON THE DYNAMICS OF GROWTH OF BACTERIA *PSEUDOMONAS*

The problem of wastewater treatment is one of the most pressing issues from the beginning of the century. A special role of the heavy metals in the pollution of the environment is due to their bioaccumulation, transfer through trophic chains, and high toxicity. Currently, advanced technologies for the wastewater treatment had been developed. Natural and cheap biological treatment methods of intensification of the natural processes of organic compounds decomposition by microorganisms under aerobic or anaerobic conditions are promising. Among important processes are nitrification and

denitrification. That's why a great attention is paid to the microorganisms that are capable to realize these processes. The processes of interaction of the heavy metals ions and microorganisms are of great interest not only from the standpoint of basic science, but also as a possible use in biotechnological processes.

Вступ

Іони важких металів (ВМ) займають особливе положення серед багатьох забруднювачів середовища. Це пов'язано з можливістю накопичення їх організмами, передачею ланцюгами живлення, а також з їх високою токсичністю [9; 11]. Токсичність ВМ відносно мікроорганізмів залежить від таких факторів як *pH*, іонна сила, природа та концентрація катіонів і аніонів, а також наявності органічних сполук, здатних взаємодіяти з металами та впливати на їх біодоступність [3; 12]. Усі метали в окисненій формі можуть взаємодіяти з мікробною клітиною. Імовірно, не існує жодного металу, який би не підлягав мікробній трансформації [6].

Акумуляція металів у більшості випадків відбувається за рахунок їх відкладання на поверхні клітин. Метали можуть зв'язуватися капсульними полісахаридами, причому в капсулі можуть акумулюватись одночасно декілька металів [14]. Наприклад, у капсулах клітин *Bacillus megaterium* АТСС 19213 виявляють катіони купруму, ртуті, аргентуму, феруму, цинку та мангану [19; 21].

Акумуляція металів на поверхні клітин може відбуватись у результаті утворення комплексу металів із білками клітинної мембрани. Багато металів утворюють на поверхні клітин нерозчинні сполуки, такі як $PbHPO_4$, $CdHPO_4$, $Pb(OH)_2$, сульфідні метали [18]. Утворення таких комплексів іноді пов'язане з активністю ферментів. Утворення фосфату кадмію спряжене з активністю фосфатази, яка індукується гліцеро-2-фосфатом і каталізує його розщеплення з утворенням HPO_4^{2-} . Цей аніон взаємодіє з Cd^{2+} з утворенням нерозчинного зв'язаного з клітинами $CdHPO_4$ [9; 21].

Об'єкт дослідження – бактерії роду *Pseudomonas* зі стічних вод, основна з яких класифікована як *P. diminuta*. Це рухомі грамнегативні палички, джгутики в них монотрихальні. Бактерії утворюють жовто-зелений флюоресціюючий пігмент [11; 24]. При зростанні на МПА утворюють колонії білого кольору. Дуже поширені в навколишньому середовищі [7; 8].

Мета цієї статті – оцінити вплив іонів важких металів і цинкового комплексу на динаміку росту бактерій роду *Pseudomonas*.

Матеріал і методи досліджень

Визначали динаміку росту бактерій роду *Pseudomonas* на субстратах із різною концентрацією *Cd*, *Cu*, *Cr*, *Ni*, *Pb* і цинкового комплексу. Для цього по чашках Петрі розливають субстрат з елективним живильним середовищем (середовище Гісса з азотумісними сполуками чи МПА) [2; 14; 21] або інше живильне середовище, що містить желатиноподібну основу, азотумісні органічні сполуки, солі сірчаної та фосфорної кислот і дистильовану воду, солі сірчаної та фосфорної кислот – магній сірчаноокислий, марганець сірчаноокислий, калій фосфорноокислий одно- та двозаміщений [13; 23]. Потім додаються різні концентрації розчинів металів і проводиться засівання розчину бактерій методом газону [14]. Культивуацію проводили в термостаті за температури +36 °С, підраховували кількість утворених колоній [9; 12].

Результати та їх обговорення

Важкі метали у природних водах перебувають у розчиненому та адсорбованому стані. Потрапляючи у воду в іонній формі, вони накопичуються в опадах у вигляді гідроксидів, карбонатів, сульфідів або фосфатів [15; 24]. Вміст різних металів у во-

доймах варіює у широких межах. Високі концентрації важких металів виявляються у верхніх шарах води [6; 17]. Токсичний вплив більшості важких металів, на які перевіряли мікроорганізми, починає сильно впливати на ріст і активність із концентрації 50 мг/дм³.

Таблиця 1

Утворення колоній на середовищах із різною концентрацією металів

Концентрація металу, мг/дм ³	Кількість клітин, 10 ⁶ /мл при додаванні Cd ²⁺	Кількість клітин, 10 ⁶ /мл при додаванні Cu ²⁺	Кількість клітин, 10 ⁶ /мл при додаванні Cr ⁶⁺	Кількість клітин, 10 ⁶ /мл при додаванні Ni ²⁺	Кількість клітин, 10 ⁶ /мл при додаванні Pb ²⁺
20	7,7 ± 0,8	8,4 ± 0,6	6,1 ± 0,7	9,3 ± 0,8	9,1 ± 0,4
30	5,3 ± 0,7	7,9 ± 0,7	4,6 ± 0,4	7,9 ± 0,6	8,3 ± 0,6
40	4,1 ± 0,5	5,6 ± 0,8	2,4 ± 0,7	6,1 ± 0,6	6,4 ± 0,7
50	2,3 ± 0,6	4,1 ± 0,5	1,5 ± 0,8	5,3 ± 0,7	5,3 ± 0,5
70	0,9 ± 0,5	2,2 ± 0,4	0,0	3,0 ± 0,6	4,5 ± 0,8
100	0,0	1,3 ± 0,7	0,0	1,6 ± 0,8	3,6 ± 0,6
120	0,0	0,0	0,0	0,9 ± 0,6	2,3 ± 0,5
150	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1 ± 0,6

Цинковий комплекс – продукт взаємодії оксиду цинку з дикалієвою (натрієвою) діоксиетилendifосфорною кислотою в содовому розчині [8; 17]. Використовується для поліпшення роботи водного обладнання, збільшує безремонтний строк служби механізмів і агрегатів, зменшує технічні витрати води, перешкоджає утворенню накипу та корозії [20; 23]. При додаванні великої дози цинкового комплексу спостерігалось порушення процесів очищення (табл. 2).

Таблиця 2

Залежність кількості клітин від концентрації цинкового комплексу

Концентрація цинкового комплексу, мг/дм ³	Кількість клітин, 10 ⁶ /мл	Концентрація цинкового комплексу, мг/дм ³	Кількість клітин, 10 ⁶ /мл
0	5,9 ± 0,8	2,3	4,4 ± 0,6
0,2	6,1 ± 0,5	2,4	4,1 ± 0,7
0,4	6,0 ± 0,7	2,5	3,9 ± 0,4
0,6	5,8 ± 0,4	2,6	4,1 ± 0,7
0,8	5,6 ± 0,6	2,7	3,8 ± 0,8
1,0	5,7 ± 0,5	2,8	3,7 ± 0,6
1,2	5,6 ± 0,5	2,9	3,6 ± 0,8
1,4	5,2 ± 0,8	3,0	3,3 ± 0,9
1,6	5,1 ± 0,6	3,1	2,1 ± 0,7
1,8	4,6 ± 0,5	3,2	1,9 ± 0,8
2,0	4,5 ± 0,4	3,3	1,4 ± 0,6
2,1	4,5 ± 0,6	3,4	0,9 ± 0,5
2,2	4,2 ± 0,5	3,5	0,0

При поступовому збільшенні концентрації цинкового комплексу в середовищі вдалося досягти резистентності мікроорганізмів до нього та виявити межі пристосування мікроорганізмів [7; 13]. Виявлено, що мікроорганізми змогли пристосуватися до концентрації цинкового комплексу 3 мг/дм³. При перевищенні цієї дози спостерігається порушення процесів життєдіяльності бактерій.

Висновки

Токсичний вплив важких металів на бактерії роду *Pseudomonas* починається з концентрації, яка перевищує 50 мг/дм³. Мікроорганізми змогли пристосуватися до

концентрації цинкового комплексу 3 мг/дм³, але при перевищенні цієї дози спостерігаються суттєві порушення їх життєдіяльності.

Бактерії, стійкі до іонів важких металів, використовуються в ряді біотехнологічних і біоремедіаційних процесів. Здавна відомий процес біологічного вилуговування руд. Ведуться інтенсивні дослідження з можливого використання бактерій в очищенні навколишнього середовища від важких металів. Одні з найперспективніших напрямів цієї галузі – біосорбція та осадження іонів металів у вигляді нерозчинних комплексів. Також ведуться роботи з використання мікроорганізмів як «біосенсорів» – для моніторингу іонів важких металів у навколишньому середовищі.

Бібліографічні посилання

1. **Авакян З. А.** Порівняльна токсичність важких металів для деяких мікроорганізмів // Мікробіологія. – 1997. – Т. 36, № 6. – С. 446–450.
2. **Дубова Н. А.** Міграція металів у прісних водах // Водні ресурси. – 1998. – № 4. – С. 185–186.
3. **Жданова Н. І.** Використання деяких ґрунтових мікроміцетів для очищення промислових стічних вод // Мікробіологічний журнал. – 1993. – Т. 55, № 3. – С. 67–73.
4. **Квасніков Є. І.** Резистентні бактерії роду *Pseudomonas* до з'єднань шестивалентного хрому і здатність до його відновлення // Мікробіологічний журнал. – 1998. – Т. 50, № 6. – С. 24–27.
5. **Квасніков Є. І.** Бактерії, що відновлюють хром в природі і в стоках промислових підприємств // Мікробіологія. – 1998. – Т. 57, № 4. – С. 680–685.
6. **Клюшнікова Т. М.** Сульфатздатність бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологічний журнал. – 1997. – Т. 54, № 2. – С. 49–54.
7. **Рода І. Г.** Біохімія і очищення стічних вод / І. Г. Рода, Г. Ф. Смирнова // Хімія і технологія води. – 1999. – Т. 11, № 2. – С. 169–172.
8. **Assessment of the potential mutagenicity of organochlorine pesticides (OCPs) in contaminated sediments from Taihu Lake, China / Z. Zhao, L. Zhang, J. Wu et al. // Mutat. Res. / Gen. Tox. and Environ. Mut. – 2010. – Vol. 696, N 1. – P. 62–68.**
9. **Bhaskar P. V.** Bacterial extracellular polymeric substance (EPS): A carrier of heavy metals in the marine food-chain / P. V. Bhaskar, N. B. Bhosle // Environ. Int. – 2006. – Vol. 32, N 2. – P. 191–198.
10. **Canovas D.** Heavy metal tolerance and metal homeostasis in *Pseudomonas putida* as revealed by complete genome analysis / D. Canovas, I. Cases, V. de Lorenzo // Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 5, N 12. – P. 1242–1256.
11. **Choudhury R.** Zinc resistance mechanisms in bacteria / R. Choudhury, S. Srivastava // Curr. Science. – 2001. – Vol. 81, N 7. – P. 768–775.
12. **Clemens S.** *Schizosaccharomyces pombe* as a model for metal homeostasis in plant cells: The phytochelatin-dependent pathway is the main cadmium detoxification mechanism / S. Clemens, C. Simm // New Phytol. – 2003. – Vol. 159, N 2. – P. 323–330.
13. **Coombs J. M.** Molecular evidence for the evolution of metal homeostasis genes by lateral gene transfer in bacteria from the deep terrestrial subsurface / J. M. Coombs, T. Barkay // Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70, N 3. – P. 1698–1707.
14. **Coombs J. M.** New findings on evolution of metal homeostasis genes: Evidence from comparative genome analysis of bacteria and archaea / J. M. Coombs, T. Barkay // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 71, N 11. – P. 7083–7091.
15. **Diels L.** New developments in treatment of heavy metal contaminated soils / L. Diels, N. van der Lelie, L. Bastiaens // Rev. Environ. Sci. Biotechnol. – 2002. – Vol. 1, N 1. – P. 75–82.
16. **Dzidic S.** Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria / S. Dzidic, V. Bedecovic // Acta Pharm. Sin. – 2003. – Vol. 24, N 6. – P. 519–526.
17. **Fabre B.** Maximum uptakes of cadmium on free and immobilized bacteria and actinomycetes cells / B. Fabre, K. Jezequel, T. Lebeau // Environ. Chem. Lett. – 2003. – Vol. 1, N 2. – P. 141–144.

18. **Faisal M.** Comparative study of *Cr (VI)* uptake and reduction in industrial effluent by *Ochrobacterium intermedium* and *Brevibacterium sp.* / M. Faisal, S. Hasnain // *Biotechnol. Lett.* – 2004. – Vol. 26, N 21. – P. 1623–1628.
19. **Green-Ruiz C.** Mercury (*II*) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus sp.* from a tropical estuary // *Bioresour. Technol.* – 2006. – Vol. 97, N 15. – P. 1907–1911.
20. **Ibrahim Z.** Bioaccumulation of silver and the isolation of metal-binding protein from *P. diminuta* / Z. Ibrahim, W. A. Ahmad, A. B. Baba // *Braz. Arch. Biol. Technol.* – 2001. – Vol. 44, N 3. – P. 223–225.
21. **Identification** of a regulatory pathway that controls the heavy-metal resistance system *czc* via promoter *czcNp* in *Ralstonia metallidurans* / C. Große, A. Anton, T. Hoffmann et al. // *Arch. Microbiol.* – 2004. – Vol. 182, N 2–3. – P. 109–118.
22. **Interactions** of chromium with microorganisms and plants / W. Carpentier, K. Sandra, I. de Smet et al. // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2001. – Vol. 25, N 3. – P. 335–347.
23. **Microbial** reduction and precipitation of vanadium by *Shewanella oneidensis* / W. Carpentier, K. Sandra, I. De Smet et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69, N 6. – P. 3636–3639.
24. **Tolerance** to various toxicants by marine bacteria highly resistant to mercury / J. De, N. Ramaiah, A. Mesquita, X. N. Verlekar // *Mar. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 5, N 2. – P. 185–193.

Надійшла до редколегії 21.03.2012