



УДК 579.26+612.015.4

© 2007

О. Ф. Рильський, П. І. Гвоздяк

Вплив іонів важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій

(Представлено академіком НАН України В. С. Підгорським)

The pigment synthesis loss is observed under influence of heavy metal (HM) ions on bacteria in the hard culture medium. After the recultivation of such bacteria on a medium without HM ions, the pigment synthesis renews. It is lost again by cultivation on the medium with HM ions, but with rather higher their concentration. The loss of the bacterial pigment synthesis under influence of HM ions may be used for the environment HM pollution monitoring.

Багато які бактерії утворюють вторинні метаболіти, що становлять значний науковий та практичний інтерес. У процесі культивування бактерії накопичують антибіотики, полісахариди, вітаміни, пігменти та інші речовини, які використовуються в медицині, ветеринарії, сільському господарстві, харчовій та нафтогазодобувній промисловості, імунології тощо. Певний інтерес становлять пігменти, що, як виявилось, можуть виконувати ще й функцію індикаторів забруднення довкілля.

Вплив природних факторів на пігментоутворюючу здатність бактерій відносно добре вивчено, тому є певна зацікавленість у дослідженні дії на них антропогенних чинників. Одним із таких факторів є забруднення довкілля іонами важких металів, спектр дії яких на різні організми проявляється дуже широко — від деякої стимуляції росту до токсичності та мутагенності [1, 2].

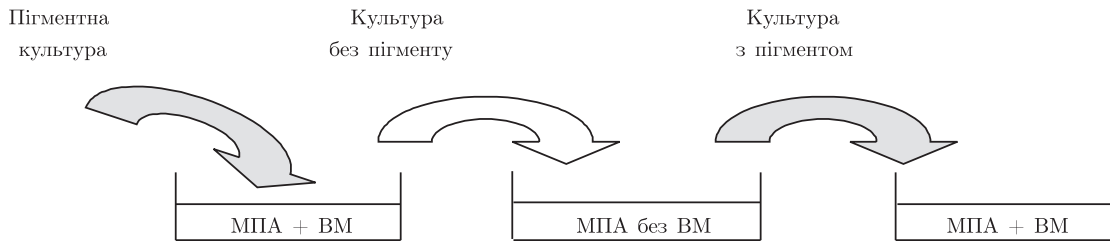
Метою наших досліджень було вивчення впливу концентраційних рядів іонів деяких важких металів (ВМ) на пігментсинтезуючу здатність бактерій родів *Pseudomonas* і *Serratia*. Тест-об'єктами були пігментні бактерії роду *Pseudomonas*: *Ps. aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Ps. fluorescens* var *pseudoiodinum*, а також *Serratia marcescens*, люб'язно надані нам з колекції відділу мікробіології очищення води Інституту колоїдної хімії та хімії води НАН України.

Досліджували водні модельні розчини, що містили іони важких металів: Ni, Cr, Cu, Pb, Ag, Al, Zn, Cd у концентраціях 5 — 300 мг/дм³.

Тверде живильне середовище — м'ясопептонний агар (МПА) готували на воді без ВМ (контроль) та з певним вмістом іонів ВМ. Концентрація іонів Cr⁶⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ у середовищі становила 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150 мг/дм³, Ag⁺ — від 5 до 15 мг/дм³, Cd²⁺ —

від 5 до 50 мг/дм³, Al³⁺ — від 50 до 300 мг/дм³. Застиглий у чашках Петрі МПА засівали суцільним газоном колекційними пігментоутворюючими 18-годинними культурами, інкубували протягом 24 год в термостаті при 36–37 °С та візуально порівнювали інтенсивність забарвлення посіву в досліді та контролі.

Для з'ясування здатності бактеріальної культури, що втратила пігмент на середовищі з ВМ, відновлювати пігментоутворення при поверненні її на МПА без металу використовували таку схему пересівів:



У зв'язку із загостренням екологічної ситуації вивчення взаємодії іонів ВМ з клітинами мікроорганізмів становить значний інтерес.

Останнім часом виконано багато робіт з акумуляції та адсорбції іонів ВМ клітинами грибів, бактерій, рослин тощо [3–6]. Однак дивним видається той факт, що автори цих і багатьох інших робіт не звертали уваги на вплив іонів ВМ на пігментоутворюючу здатність бактерій, а в нечисленних публікаціях, де згадується про цей феномен, матеріали викладено у вигляді коротких повідомлень і не носять системного характеру [7, 8].

Відомо, що пігменти бактерій є вторинними метаболітами і належать до різноманітних хімічних сполук. Найбільшим пігментним розмаїттям відрізняються бактерії роду *Pseudomonas*, які у переважній більшості здатні до синтезу феназинових пігментів, зокрема таких, як геміціанін, йодинін, феназин-1-карбоксилова кислота, хлорорафін, оксихлорорафін, аеругінозин А, аеругінозин В тощо [9–11]. Окремі представники роду *Pseudomonas* утворюють флуоресціюючі пігменти — піовердини, а також каротиноїдні пігменти, меланіни та флуоресціюючі пігменти флавоноїдної групи.

Широко відомі яскраво-червоні бактерії *Serratia marcescens* завдячують своєму забарвленню продуцизовану. Саме через яскравість барви, насиченість кольору, стійкість синтезу пігменту як об'єкти дослідження нами вибрано *Serratia marcescens* та деякі види бактерій роду *Pseudomonas*.

Досліди з клітинами *Pseudomonas aeruginosa*, *Ps. fluorescens*, *Ps. fluorescens* var *pseudodiodinum*, *Serratia marcescens* (табл. 1) продемонстрували зниження інтенсивності забарвлення культури з підвищенням концентрації всіх використаних іонів ВМ у твердому живильному середовищі. Втрата пігментації та утворення безбарвних колоній спостерігається при концентраціях, що на 10–20% нижчі за ті, що взагалі блокують ріст бактерій. Такий ефект відмічається у всіх досліджених штамів бактерій: спочатку припиняється синтез пігментів, а потім, при більш високих концентраціях ВМ, настає повне інгібування життєдіяльності. При цьому у всіх бактерій найбільший пригнічуючий вплив щодо пігментсинтезуючої здатності виявляв Cr⁶⁺ (30–40 мг/дм³), а найнижчий (100–150 мг/дм³) — Pb²⁺.

Цікаво було також з'ясувати, чи відновлюється здатність до синтезу пігментів у бактерій, узятих із знебарвлених колоній та пересіяних на МПА без ВМ. Виявилось, що добові культури всіх штамів, що втратили пігмент під впливом іонів ВМ, після посіву на МПА без

металу відновлюють здатність до пігментоутворення, причому інтенсивність (яскравість) забарвлення стає навіть дещо більшою, ніж у контролі.

При повторних пересівах цих культур на МПА з іонами ВМ знову спостерігається втрата пігменту, але вже з більш високими концентраціями цих металів. Різниця пігментінгібуючих концентрацій іонів ВМ при першому і другому пасажах на МПА з металами становить 15–20%.

Одержані результати дозволяють припустити, що блокування синтезу пігментів відбувається на фізіолого-біохімічному, а не на генетичному рівнях, бо після повернення культур на повноцінне середовище без металу пігментсинтезуюча здатність відновлювалася у всіх бактерій.

Іони важких металів здатні блокувати шляхи утворення пігментів, однак це блокування не є летальним для клітин. Оскільки попередником компонентів пігментів феназинового ряду є шикімова кислота, то можна припустити, що блокування їх утворення ВМ відбува-

Таблиця 1. Вплив іонів важких металів на ріст і пігментоутворення бактерій роду *Pseudomonas* та *Serratia marcescens*

| Концентрація металів, мг/дм ³ | Cu ²⁺ | | Cr ⁶⁺ | | Ni ²⁺ | | Pb ²⁺ | |
|--|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|------------------|---------|
| | ріст | пігмент | ріст | пігмент | ріст | пігмент | ріст | пігмент |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> | | | | | | | | |
| 20 | ++++ | ++++ | +++ | + | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 30 | ++++ | +++ | ++ | - | ++++ | +++ | ++++ | ++++ |
| 40 | +++ | ++ | ++ | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 50 | ++ | ++ | + | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 70 | + | + | - | - | ++ | + | +++ | +++ |
| 100 | + | - | - | - | ++ | - | +++ | ++ |
| 150 | - | - | - | - | + | - | ++ | + |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | | | | | | | |
| 20 | ++++ | ++++ | +++ | + | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 30 | ++ | + | ++ | - | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| 40 | ++ | + | ++ | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 50 | + | + | + | - | +++ | +++ | +++ | +++ |
| 70 | + | - | - | - | +++ | ++ | +++ | ++ |
| 100 | + | - | - | - | ++ | + | +++ | ++ |
| 150 | - | - | - | - | + | - | ++ | + |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> var. <i>pseudoiodinum</i> | | | | | | | | |
| 20 | ++++ | ++++ | +++ | +++ | ++++ | +++ | ++++ | ++++ |
| 30 | ++++ | + | ++ | + | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| 50 | + | + | + | - | +++ | + | +++ | ++ |
| 70 | + | - | + | - | + | - | ++ | + |
| 100 | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 150 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marcescens</i> | | | | | | | | |
| 20 | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 30 | ++++ | ++++ | ++++ | +++ | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ |
| 40 | +++ | +++ | ++ | - | +++ | +++ | +++ | ++ |
| 50 | ++ | ++ | - | - | +++ | +++ | ++ | + |
| 70 | + | - | - | - | +++ | +++ | ++ | + |
| 100 | - | - | - | - | +++ | ++ | ++ | + |
| 150 | - | - | - | - | + | - | ++ | + |

Примітка. Ріст: +++++ – суцільний; ++++ – добрий; ++ – помірний; + – слабкий; – – відсутній. Пігментоутворення: +++++ – інтенсивне; ++++ – добре; ++ – помірне; + – слабе; – – відсутнє.

ється на рівні синтезу хоризмової кислоти, яка утворюється з шикімату. Відомо також, що у мутантів *Ps. aeruginosa*, заблокованих на різних ділянках синтезу ароматичних кислот, хоризмат було визначено як пункт відгалуження від ароматичного шляху до піоціаніну, а блоки між шикіматом і хоризматом у цієї культури запобігають утворенню піоціаніну при рості на середовищі з необхідними амінокислотами та шикіматом, тоді як порушення біосинтезу ароматичних амінокислот після хоризмової кислоти не впливає на синтез піоціаніну [12–14]. З цього можна зробити висновок, що механізми блокування синтезу пігментів у всіх *Pseudomonas* аналогічні, бо всі ці пігменти належать до феназинового ряду.

Підсумовуючи результати досліджень, можна стверджувати, що під дією іонів ВМ втрачається пігментсинтезуюча здатність бактерій при рості на твердому живильному поживному середовищі (МПА). Втрата пігменту тест-культурами відбувається при меншій концентрації іонів ВМ, ніж повне припинення росту культури бактерій. Після культивування бактерій на середовищі з іонами ВМ пігментоутворююча здатність відновлюється при наступному пересіві культури на тверде середовище без металу. При подальшому пересіві бактеріальних культур на МПА з металом (після відновлення пігментоутворюючої здатності) має місце повторна втрата пігменту, але при дещо більших концентраціях цього металу. Втрата пігментоутворюючої здатності бактеріями під впливом іонів ВМ може бути використана для оцінки ступеня забруднення ними оточуючого середовища.

1. Пасична О. О. Порівняльна характеристика дії важких металів на вищі водянні та нитчасті водорості // Наук. зап. Терноп. пед. ун-ту ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. Спец. вип.: гідроекологія. – 2001. – № 3. – (14). – С. 222–224.
2. Пасичная Е. А. Токсичность меди для гидрофитов: аккумуляция, влияние на фотосинтез, дыхание, пигментную систему // Гидробиол. журн. – 2001. – **37**, № 3. – С. 93–107.
3. Пирог Т. П. Роль экзополисахаридов *Acinetobacter sp.* в защите клеток продуцента от действия тяжелых металлов // Микробиология. – 1997. – **66**, № 3. – С. 341–346.
4. Подгорский В. С., Касаткина Т. П., Лозовая О. Г. Дрожжи – биосорбенты тяжелых металлов // Микробиол. журн. – 2004. – **66**, № 1. – С. 91–103.
5. Никовская Г. Н., Ульберг З. Р., Стрижак Н. П. Коллоидно-химические закономерности взаимодействия урана (VI) с клетками металлорезистентной культуры бактерий *Bacillus cereus* ВКМ 4368 // Коллоид. журн. – 2002. – **64**, № 2. – С. 194–200.
6. Пат. 59098 Україна. Спосіб очищення води від радіонуклідів / Б. Ю. Корнілович, П. І. Гвоздяк, Л. М. Спасьонова та ін. – Опубл. 15.08.2003. – Бюл. № 8.
7. Рубан Е. Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. – Москва: Наука, 1986. – 199 с.
8. Лебедева Т. С., Сытник К. М. Пигменты растительного мира. – Киев: Наук. думка, 1986. – 96 с.
9. Holstein U., McLames D. Biosynthesis of phenarines // J. Org. Chem. – 1973. – **38**, No 6. – P. 3415–3417.
10. Holstein U., Krisov G., Mock D. Biosynthesis of phenarines. 1. The role of phenarine – 1,6-dicarboxylic acid // Tetrahedron Lett. – 1976. – **37**. – P. 3268–3270.
11. Calhoun D., Carson M., Yensen R. The branch point for pyocyanin synthesis mutants in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. – 1974. – **117**, No 1. – P. 312–314.
12. Hassen A., Saidi N., Cherif M. Effect of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis* // Bioresource Technology. – 1998. – **65**, No 1–2. – P. 73–82.
13. Furman C. R., Owusu V. I., Tsang Y. C. Inhibitory effect of some transition metal ions on growth and pigment formation of *Serratia marcescens* // Microbios. – 1984. – **40** (159). – P. 45–51.
14. Феофилова Е. П. Пигменты микроорганизмов. – Москва: Наука, 1974. – 242 с.

Запорізький національний університет
Інститут колоїдної хімії та хімії води
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 23.06.2006