

БЕЛІКОВА О.Ю.^{1✉}, МАТВЄЄВА Н.А.², ЯСТРЕМСЬКА Л.С.³, ТАШИРЕВ О.Б.¹¹ Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 154, e-mail: tach2007@ukr.net² Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Україна, м. Київ, 03143, вул. Академіка Заболотного, 148, e-mail: joyna56@gmail.com³ Національний авіаційний університет, Україна, 03680, м. Київ, просп. Космонавта Комарова, 1, e-mail: lsyastremskaya@gmail.com

✉ belikova.e.y@gmail.com, (050) 772-77-47

ВИЗНАЧЕННЯ СТІЙКОСТІ АЗОТФІКСУВАЛЬНИХ МІКРООРГАНІЗМІВ ҐРУНТУ ЕКВАДОРУ ДО ТОКСИЧНИХ МЕТАЛІВ (CrO_4^{2-} , Ni^{2+} , Cu^{2+})

Мета. Метою роботи було визначення стійкості азотфіксувальних мікроорганізмів, ізольованих із ризосфери бромелії (Еквадор), до дії токсичних металів. **Методи.** Мікроорганізми ізолювали на поживному середовищі Ешбі. Отримані штами культивували на середовищі з Cu^{2+} (Cu(II) цитрат) від 50 до 500 мг/л за катіоном із кроком 50; Ni^{2+} (NiCl_2) від 20 до 200 мг/л за катіоном із кроком 20; Cr(VI) (K_2CrO_4) від 20 до 100 мг/л за Cr(VI) з кроком 20. Ріст мікроорганізмів у присутності металів характеризували за максимально допустимою концентрацією (МДК) металів, тривалістю лаг-фази та кількістю колонієутворювальних одиниць (КУО) азотфіксувальних мікроорганізмів за збільшення концентрації токсичних металів. **Результати.** Виділено домінантні азотфіксувальні мікроорганізми, які є стійкими до токсичних металів (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr(VI)) у високих концентраціях. Встановлені МДК для мікробних угруповань азотфіксаторів: 40 мг/л Cr(VI) , 300 мг/л Cu^{2+} та 100 мг/л Ni^{2+} . **Висновки.** Виділені домінантні азотфіксувальні мікроорганізми виявилися стійкими до токсичних металів (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr(VI)) у концентраціях, які перевищують у 4–30 разів ушкоджуючі або бактерицидні концентрації для більшості відомих хемоорганотрофних мікроорганізмів природних екосистем.

Ключові слова: металрезистентність, азотфіксувальні мікроорганізми, Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr(VI) .

Забруднення токсичними металами виступає в ролі екоотоксикологічного чинника, який визначає напрямок і характер функціонування ґрунтових ценозів [1–3]. Токсичні метали забруднюють навколишнє середовище, а також пригнічують ріст і життєдіяльність фізіологічних груп мікроорганізмів ґрунту, серед яких найбільш вразливими є азотфіксувальні мікроор-

ганізми [4–5]. Пригнічення росту азотфіксаторів за дії токсичних металів призводить до порушення циклу азоту і процесу мінералізації органічної речовини ґрунту. Тому виникає необхідність визначення впливу токсичних металів на азотфіксувальні мікроорганізми для визначення стійкості до них мікробних угруповань ґрунту. Раніше нами було показано [7], що хемоорганотрофні мікроорганізми ґрунту Еквадору є стійкими до токсичних металів у високих концентраціях, тому було припущено, що азотфіксувальні мікроорганізми, ізольовані з ґрунту цього регіону, також можуть мати високу стійкість до токсичних металів.

Метою роботи було визначення стійкості азотфіксувальних мікроорганізмів ґрунту Еквадору до дії токсичних металів – Cu^{2+} , Cr(VI) і Ni^{2+} .

Матеріали і методи

Зразок ґрунту ризосфери бромелії для виділення азотфіксаторів відбирали у гірських джунглях Еквадору на території бази «Ла Фаворита» (1600 м) Північного технічного університету Еквадору. Зразки зберігалися за $t = 4\text{--}5^\circ\text{C}$.

Для виділення азотфіксувальних мікроорганізмів використовували поживне середовище Ешбі [6]. Для отримання накопичувальної культури у флакони вносили 0,5 г зразка ґрунту і 25 мл поживного середовища Ешбі та культивували протягом 7 діб за 28°C . Дослід проводили у трьох повторюваностях. Оскільки в досліджуваному ґрунті є сполуки азоту в слідових концентраціях, які можуть використовувати олігонітрофіли для своєї життєдіяльності, було зроблено 4 пасажі в рідкому середовищі Ешбі для отримання накопичувальної культури азотфіксаторів.

© БЕЛІКОВА О.Ю., МАТВЄЄВА Н.А., ЯСТРЕМСЬКА Л.С., ТАШИРЕВ О.Б.

Кількість колонієутворювальних одиниць (КУО) мікроорганізмів в 1 г зразка визначали методом десятикратних розведень ґрунту та подальшим висівом на безазотне агаризоване поживне середовище Ешбі [8]. Окремі колонії відсівали в пробірки з рідким поживним середовищем Ешбі для виявлення справжніх азотфіксаторів. Так проводили 3 послідовних пасажі в рідкому середовищі, після чого культури розсівали методом штриха на агаризованому середовищі.

Як модельні метали використовували метал-окислювач – Cr(VI) у формі CrO_4^{2-} , метал-замісник – Ni^{2+} та метал комбінованої дії – Cu^{2+} (одночасно окислювач та замісник).

Для визначення максимально допустимої концентрації (МДК) токсичних металів до середовища Ешбі додавали Cu(II) цитрат, NiCl_2 , K_2CrO_4 у такому концентраційному діапазоні: Cu^{2+} 50-500 мг/л за катіоном із кроком 50; Ni^{2+} 20–200 мг/л за катіоном із кроком 20; Cr (VI) 20-100 мг/л із кроком 20.

Результати та обговорення

Визначення максимально допустимих концентрацій токсичних металів для накопичувальної культури азотфіксувальних мікроорганізмів. Із ґрунту Еквадору були виділені накопичувальні культури металрезистентних азотфіксувальних мікроорганізмів. Для визначення кількісних показників стійкості мікробних угруповань до репрезентативних металів, тобто металів, що поєднують усі механізми ушкоджувальної дії на мікроорганізми, визначали МДК трьох металів – Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr(VI).

Було визначено, що МДК Cr(VI) для мікробних угруповань азотфіксаторів ґрунту Еквадору становила 40 мг/л. Водночас азотфіксатори проявили більшу стійкість до міді та нікелю, оскільки МДК за додавання сполук цих металів до середовища становили 300 мг/л Cu^{2+} та 100 мг/л Ni^{2+} (рис. 1). Відомо, що для більшості ґрунтових та водних мікроорганізмів стійкість до токсичних металів не перевищує 1–10 мг/л [1, 3, 7]. Поряд із тим, виділені азотфіксувальні мікроорганізми були здатні рости за концентрації токсичних металів, що перевищує МДК у 4–30 разів для більшості відомих азотфіксувальних мікроорганізмів.

Отже, ряд стійкості виділених азотфіксувальних мікроорганізмів до токсичних репрезентативних металів можна представити у вигляді:

Метали: $\text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cr(VI)}$
МДК (мг/л): $300 > 100 > 40$

Вивчення залежності кількісних показників гомеостазу азотфіксувальних мікроорганізмів від концентрації токсичних металів. Здатність мікробних угруповань зберігати стабільність функціонування за дії екстремальних факторів є гомеостазом. У цьому дослідженні ми визначали такі кількісні показники гомеостазу, як тривалість лаг-фази та КУО азотфіксувальних мікроорганізмів за дії такого екстремального фактора, як токсичні метали. Було виявлено загальну закономірність, яка виражалася у пригніченні росту мікроорганізмів за підвищення вмісту металів у середовищі. Зокрема, збільшувалася тривалість лаг-фази (рис. 2, 3). Наприклад, за наявності Cr(VI) у концентрації 40 мг/л тривалість лаг-фази збільшувалась у 10 разів; за вмісту Ni^{2+} у концентрації 100 мг/л – у 5 разів у порівнянні з контролем.

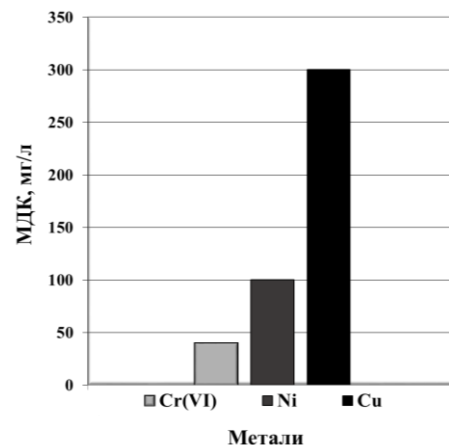


Рис. 1. Максимально допустимі концентрації токсичних металів для мікробних угруповань азотфіксаторів ґрунту Еквадору.

Збільшення концентрації міді в діапазоні від 50 до 250 мг/л призводило до збільшення тривалості лаг-фази у два рази у порівнянні з контролем (рис. 3). За концентрації Cu^{2+} 300 мг/л тривалість лаг-фази збільшилась у 5 разів порівняно з контролем.

Відомо, що підвищення концентрації токсичного металу в середовищі призводить до пропорційного пригнічення росту мікробних угруповань. Раніше нами під час дослідження мікробних угруповань антарктичних ґрунтів острова Peterman та мису Rasmussen [1] було встановлено два типи «відповіді» мікроорганізмів на підвищення концентрації металів. Відповідь першого типу – це катастрофічне пригні-

чення росту мікроорганізмів за підвищення концентрації металів. Відповідь першого типу є загальновідомою [1]. За відповіді другого типу пригнічення росту мікроорганізмів у певному концентраційному діапазоні за достатньо високих концентрацій металів не спостерігається.

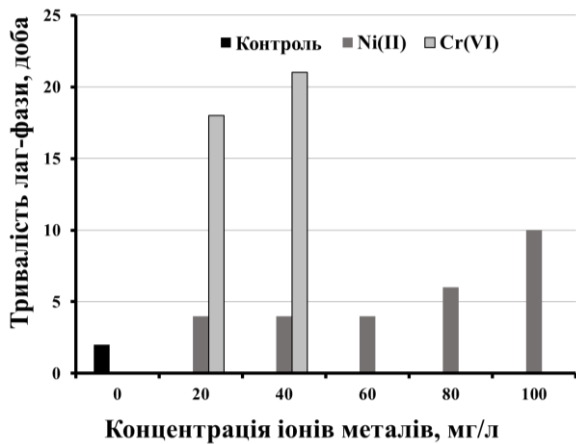


Рис. 2. Збільшення тривалості лаг-фази за культивування азотфіксувальних мікроорганізмів, ізолюваних із ґрунту Еквадору, в присутності токсичних металів – Ni^{2+} та Cr(VI) .

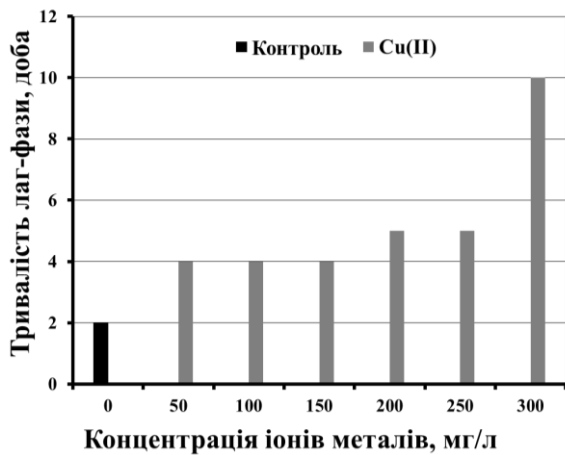


Рис. 3. Збільшення тривалості лаг-фази за культивування азотфіксувальних мікроорганізмів, ізолюваних із ґрунту Еквадору, в присутності Cu^{2+} .

Азотфіксувальним мікроорганізмам, ізолюваним із ґрунту Еквадору, був притаманний перший тип відповіді. Відповіді другого типу, а саме відсутності пригнічення росту мікроорганізмів у досліджуваному концентраційному діапазоні металів, не спостерігалось для цієї групи мікроорганізмів циклу азоту.

Так, за підвищення концентрації Cr(VI) з 20 до 40 мг/л та Ni^{2+} з 20 до 100 мг/л кількість

КУО знижувалася на порядок (рис. 4), тоді як підвищення вмісту Cu^{2+} в діапазоні від 50 до 300 мг/л – на два порядки (рис. 5). Крім того, за підвищення концентрації Cr(VI) зменшувалася не лише кількість мікроорганізмів, а й кількість морфотипів колоній мікроорганізмів та їх морфологічні ознаки (менший розмір колоній, менш яскраве забарвлення). Це свідчить про збіднення біологічного різноманіття угруповання за підвищення концентрації Cr(VI) .

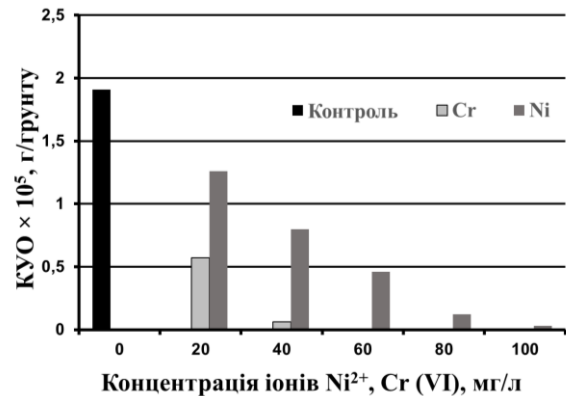


Рис. 4. Залежність кількості КУО від концентрації Cr(VI) та Ni^{2+} .

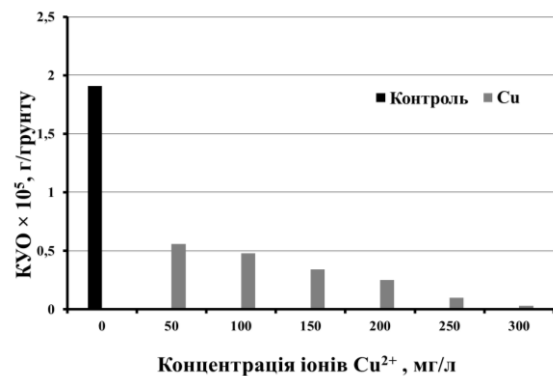


Рис. 5. Залежність кількості КУО від підвищення концентрації Cu^{2+} .

Виділення домінуючих штамів азотфіксувальних мікроорганізмів. Виявлено, що кількість КУО азотфіксувальних мікроорганізмів в 1 г ґрунту становить $5,4 \cdot 10^5$ клітин. Було виділено десять чистих культур за посіву з десятикратних розведень і дві – з накопичувальної культури, які за морфологічними ознаками виявилися дуже різноманітними (табл. 1). Ці мікроорганізми представлені грам-позитивними (9 штамів) та грам-негативними (3 штами) культурами.

Дослідження максимально допустимих концентрацій токсичних металів для доміную-

чих мікроорганізмів. Для всіх ізольованих штамів було встановлено МДК токсичних металів (табл. 2). Показано, що з 12 штамів мікроорганізмів резистентними до Cr (VI) виявилися 7 штамів (МДК 10–50 мг/л), до Cu²⁺ – 8 штамів (МДК

20–80 мг/л), до Ni²⁺ – 5 штамів (МДК 10–50 мг/л). Інші культури не проявляли стійкості до названих металів у високих концентраціях, МДК для них становили менше 10 мг/л.

Таблиця 1. Морфологічна характеристика азотфіксувальних культур, ізольованих із ґрунту Екватору

№	Культура	Морфологія колоній	Морфологія клітин, мкм
1	N1	Помаранчеві, напівпрозорі, 5 – 9 мм, край нерівний, опуклі, в'язкі, блискучі, форма неправильна	Гр ⁺ , палички, поодинокі, 2,18-2,29Ч0,44-0,69
2	N3	Молочні, блискучі, опуклі, 7 – 12 мм, край нерівний, форма неправильна	Гр ⁻ , палички, товсті, 1,54-1,67Ч0,37-0,53
3	N3.1	Білі з інтенсивно забарвленим центром, напівпрозорі, в'язкі, блискучі, опуклі, 5 – 7мм, край нерівний, форма неправильна	Гр ⁺ , короткі палички з великою слизовою оболонкою
4	N3.2	Білі, 1 – 2 мм, край рівний, плоскі, сухі, неблискучі, форма правильна	Гр ⁺ , довгі палички, поодинокі або в скупченнях, 1Ч2,5-5
5	N3.3	Помаранчеві, 2 – 3 мм, край нерівний, трохи опуклі, блискучі, форма неправильна	Гр ⁺ , коки, 2,03-2,48Ч0,87-1,05
6	N 6	Блідно-білі, в'язкі, блискучі, опуклі, 2 – 4 мм, край рівний, форма правильна	Гр ⁺ , палички, 0,89-1,02Ч0,39-0,44
7	N 7	Блідно-білі, нев'язкі, неблискучі, опуклі, 2-4 мм, край рівний, форма правильна	Гр ⁻ , палички, 0,89-1,03Ч0,25-0,3
8	N 8	Блідо-жовті, нев'язкі, неблискучі, трохи опуклі, 2 – 4 мм, край рівний, форма правильна	Гр ⁺ , палички, 1,32-2,83Ч0,37-0,41
9	N 9	Блідо-жовті, нев'язкі, блискучі, опуклі, 2 – 4 мм, край рівний, форма правильна	Гр ⁻ , палички, 1,75-1,83Ч0,35-0,52
10	N 10	Білі, нев'язкі, не блискучі, трохи опуклі, 2-4 мм, край рівний, форма правильна	Гр ⁺ , коки, 1,14Ч0,78
11	НК 1.1.	Білі, нев'язкі, блискучі, опуклі, 1 – 2 мм, край рівний, форма неправильна	Гр ⁺ , палички, поодинокі, 0,92-1,03Ч0,21-0,44
12	НК 2.1.	Білі, нев'язкі, блискучі, опуклі, 1 – 2 мм, край рівний, форма правильна	Гр ⁺ , палички, поодинокі, 1,92-2,14Ч0,4-0,5

Таблиця 2. Стійкість азотфіксаторів до токсичних металів

Культура	МДК, мг/л		
	Cu ²⁺	Ni ²⁺	Cr (VI)
N1	–*	–	10
N3	70	50	–
N 3.1.	–	–	10
N3.2.	50	30	–
N 3.3.	40	–	50
N6	40	10	20
N 7	30	–	10
N 8	30	10	–
N9	20	–	10
N 10	–	–	–
НК1.1.	40	50	20
НК 2.1	–	–	–

Примітка. * «–» Ріст не спостерігався.

Отже, домінуючі штами азотфіксувальних мікроорганізмів, ізольовані з ризосфери рослин, проявляли стійкість до токсичних металів (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr(VI)), що перевищують бактерицидну концентрацію.

Висновки

1. Мікробні угруповання азотфіксувальних мікроорганізмів, виділені з ризосфери бромелії (Еквадор), здатні рости за концентрації токсичних металів, що перевищують пошкоджувальну або бактерицидну концентрацію цих металів у 4–30 разів у порівнянні з більшістю відомих хемоорганотрофних мікроорганізмів природних екосистем.

2. Підвищення концентрації металів Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr(VI) призводить до катастрофічного пригнічення росту цих мікроорганізмів, що проявляється в збільшенні тривалості лаг-фази та зменшенні КУО.

3. 12 штамів азотфіксувальних мікроорганізмів проявили резистентність до Cr(VI) у концентраціях 10–50 мг/л (7 штамів), до 20–80 мг/л Cu^{2+} (8 штамів), до 10–50 мг/л Ni^{2+} (5 штамів).

4. Виділені металрезистентні штами азотфіксувальних бактерій можуть бути використані у біотехнологіях біоремедіації ґрунтів, забруднених металами.

Література

1. Таширев А.Б., Романовская В.А., Сиома И.А. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} . *Доповіди НАН України*. 2008. № 1. С. 169–176.
2. Brhynhildsen L., Lundgren Bo V., Allard B., Rosswall Th. Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury, and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1988. Vol. 54, № 7. P. 1689–1693.
3. Huang Z. Cu^{2+} biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from soil Chinese. *Journal of Appl. and Environ. Biology*. 2012. Vol. 18. P. 964–970.
4. Lorenz S.E., Mcgrath S.P., Giller K.E. Assessment of free-living nitrogen fixation activity as a biological indicator of heavy metal toxicity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 1992. Vol. 24, No. 6. P. 601–606.
5. Letunova S.V., Umarov M.M., Niyazova G.A., Melekhin Y.I. Nitrogen fixation activity as a possible criterion for determining permissible concentrations of heavy metals in soil. *Soviet Soil Science*. 1985. Vol. 17. P. 88–92.
6. Селивановская С.Ю., Латыпова В.З. Микроорганизмы в круговороте биогенных элементов. Часть 1. Азот. Казань: Казан. ун-т, 2014. 38 с.
7. Tashyrev O.B., Prekrasna Ie.P., Tashyрева G.O., Bielikova O.Iu. Resistance of microbial communities from Ecuador ecosystems to representative toxic metals – CrO_4^{2-} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} . *Мікробіол. Журн.* 2015. Т. 77, № 4. С. 44–61.
8. Герхардт Ф. Методы общей бактериологии. М: Мир, 1984. 263 с.

References

1. Tashyrev A.B., Romanovskaïa V.A., Syoma Y.B., Usenko V.P., Tashyрева A.A., Matveeva N.A., Rokytko P.V., Kopytov Ū.P., Seredynyn E.S., Myzyn D.A., Podhorskyi V.S. Antarctic microorganisms are resistant to high concentrations of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} and CrO_4^{2-} . *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. 2008. № 1. С. 169–176.
2. Brhynhildsen L., Lundgren Bo V., Allard B., Rosswall Th. Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury, and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp. *Appl. and Environ. Microbiol.* 1988. Vol. 54, № 7. P. 1689–1693.
3. Huang Z. Cu^{2+} biosorption by a highly copper resistant bacterium isolated from soil Chinese. *Journal of Appl. and Environ. Biology*. 2012. Vol. 18. P. 964–970.
4. Lorenz S.E., Mcgrath S.P., Giller K.E. Assessment of free-living nitrogen fixation activity as a biological indicator of heavy metal toxicity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 1992. Vol. 24, No. 6. P. 601–606.
5. Letunova S.V., Umarov M.M., Niyazova G.A., Melekhin Y.I. Nitrogen fixation activity as a possible criterion for determining permissible concentrations of heavy metals in soil. *Soviet Soil Science*. 1985. Vol. 17. P. 88–92.
6. Selyvanovskaïa S.Ū., Latypova V.Z. Microorganisms in the cycle of biogenic elements. Part 1. Nitrogen. Kazan: Kazan. university, 2014. P. 38.
7. Tashyrev O.B., Prekrasna Ie.P., Tashyрева G.O., Bielikova O.Iu. Resistance of microbial communities from Ecuador ecosystems to representative toxic metals – CrO_4^{2-} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} . *Microbiological Journal*. 2015. Vol. 77, № 4. P. 44–61.
8. Herkhardt F. Methods of general bacteriology. M: Mir, 1984. P. 263.

BIELIKOVA O.Iu.¹, MATVIEIEVA N.A.², YASTREMSKAYA L.S.³, TASHYREV O.B.¹

¹ Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Ukraine, 03680, Kyiv, Academic Zabolotny str., 154, e-mail: tach2007@ukr.net

² Institute of Cell Biology and Genetic Engineering NAS of Ukraine, Ukraine, 03143, Kyiv, Academic Zabolotny str., 148, e-mail: joyna56@gmail.com

³ National Aviation University, Ukraine, 03680, Kyiv, cosmonaut Komarov ave., 1, e-mail: lsyastremskaya@gmail.com

THE DETERMINATION OF THE STABILITY OF NITROGEN-FIXING MICROORGANISMS OF THE SOIL OF ECUADOR TO TOXIC METALS CrO₄²⁻, Ni²⁺, Cu²⁺

Aim. The aim of the work was to determine the stability of nitrogen-fixing microorganisms isolated from the rhizosphere of bromelia (Ecuador), to the effect of toxic metals. **Methods.** Microorganisms were isolated on the Ashby nutrient medium. The selected strains were cultured on a medium with Cu²⁺ (Cu (II) citrate) from 50 to 500 mg/l by cation in steps of 50; Ni²⁺ (NiCl₂) from 20 to 200 mg/l by cation in steps of 20; Cr (VI) (K₂CrO₄) from 20 to 100 mg/l with Cr (VI) in increments of 20. The growth of microorganisms in the presence of metals was characterized by the maximum permissible concentration (MPC) of metals, duration of lag phase and the number of colony-forming units (CFU) of nitrogen-fixing microorganisms with increasing concentration of toxic metals. **Results.** The selected dominant nitrogen-fixing microorganisms from the soil of Ecuador were resistant to toxic metals (Cu²⁺, Ni²⁺, Cr (VI)) in high concentrations. It was found that MPC for microbial communities of nitrogen-fixing microorganisms were: 40 mg/l Cr (VI), 300 mg/l Cu²⁺ and 100 mg/l Ni²⁺. **Conclusions.** It was shown that the selected dominant nitrogen-fixing microorganisms from the Ecuadorian soil were resistant to toxic metals (Cu²⁺, Ni²⁺, Cr (VI)) in high concentrations, which in 4–30 times exceed the damage or bactericidal concentrations for the majority of known organophosphate microorganisms of natural ecosystems.

Keywords: metalresistance, nitrogen-fixing microorganisms, Cu²⁺, Ni²⁺, Cr (VI).