

УДК 579.695

Иваница В. А.¹, д-р биол. наук, проф., зав. кафедрой,
Бухтияров А. Е.¹, асс., **Захария А. Н.²**, канд. хим. наук, доц.
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, каф. микробиологии и вирусологии¹, каф. аналитической химии²,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

АККУМУЛЯЦИЯ КАДМИЯ МОРСКИМИ БАКТЕРИЯМИ

Показано, что морские бактерии, изолированные из вод Одесского залива, аккумулируют кадмий в пределах 1,7 - 7,5 мг·г⁻¹ сухой биомассы. При этом не установлено статистически достоверных различий в уровнях аккумуляции между группой высоко- и низкорезистентных к кадмию микроорганизмов.

Ключевые слова: морские бактерии, Cd²⁺, аккумуляция.

Миграция и удаление тяжелых металлов из морских водоемов связаны с биогеохимической деятельностью микроорганизмов [1]. Одним из видов взаимодействия микроорганизмов с тяжелыми металлами является аккумуляция последних клетками. В этом процессе могут участвовать капсулы, структуры клеточной стенки, белки клеточной мембраны. Накопление металлов внутри клетки зависит от интенсивности их трансмембранного транспорта, прочности соединения с белками цитоплазмы и образования нерастворимых продуктов [2]. Однако основным механизмом аккумуляции кадмия бактериями считают его адсорбцию поверхностью клеток [3]. Меньшая часть ионов кадмия транспортируется внутрь клеток. Активный транспорт Cd²⁺, как правило, осуществляется системой транспорта Mg²⁺ и значительно реже — системой транспорта Mn²⁺ и Ca²⁺ за счет стереохимической аналогии.

Целью данной работы было изучение аккумуляции кадмия штаммами морских бактерий с высоким и низким уровнем резистентности к ионам этого металла.

Материалы и методы

Объектами изучения были 7 штаммов доминирующих гетеротрофных морских бактерий, изолированных в июне 1999 г. из прибрежных районов Одесских пляжей “Дельфин”, “Дача Ковалевского” и Центральной нефтегавани Одесского порта с глубины 0,5 м на расстоянии 50 м от берега [4]. В соответствии со значениями минимальных ингибирующих концентраций (МИК) к группе высоко резистентных отнесены штаммы 31 (МИК — 0,25 ммоль·л⁻¹), 240 (МИК — 0,3 ммоль·л⁻¹), а также 69 и 71 (МИК — 0,5 ммоль·л⁻¹). В группу низко резистентных бактерий включены штаммы 169, 175 и 16 со значениями МИК около 0,08 ммоль·л⁻¹ [5].

Изучение аккумулятивной способности микроорганизмов проводили согласно методике, разработанной Sharron McEldowney [6]. Культуры выращивали при 25 °С в течение суток на плотной питательной среде (рН 7,2 -7,4) содержащей (г·л⁻¹): пептон — 5,0; агар-агар — 13,5; морская вода — 1000 мл. Бактерии смывали с плотной среды, суспендировали в 0,2 ммоль малеатном буфере рН 6,8 [7] и доводили до концентрации 1·10⁹ кл·мл⁻¹.

К бактериальной суспензии объемом 10 мл добавляли 30 мкл раствора кадмия стандарта ГСОПМ в концентрации 10 мг·мл⁻¹, приготовленного на 1 н. HNO₃. Экспозицию проводили на качалке с частотой колебаний 150 об·мин⁻¹ в течение 2 часов при температуре 25 °С. Клетки отделяли центрифугированием при 8000 g и температуре +4 °С. После отбора надосадочной жидкости бактериальные клетки дважды промывали малеатным буфером. Затем определяли объем надосадочной жидкости и промывных вод и вносили 70% HNO₃ до получения 20% раствора.

В предварительно взвешенные пенициллиновые флаконы переносили ресуспендированный бидистиллированной водой (БДВ) клеточный осадок. Флаконы высушивали при 110 °С и повторно взвешивали для определения веса биомассы бактерий. Разрушение клеток осуществляли, добавляя 2,5 мл 70% HNO₃ на 30 минут при 180 °С. После остывания во флаконы добавляли по 4 мл БДВ. Содержание Cd²⁺ определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре “Сатурн-2”.

Проведенные ранее исследования показали, что присутствующие в растворах посторонние компоненты (Na⁺, K⁺, Cl⁻) не оказывают статистически значимого влияния на результаты определения кадмия. В контрольных образцах кадмий не выявлялся. В опытных образцах нижняя граница определения кадмия составляла 0,1 мкг·мл⁻¹.

Общее содержание кадмия в объеме рассчитывали, суммируя его содержание в клетках, надосадочной жидкости и промывных водах. Отклонение от общего содержания металла в каждом тесте составляло около 5 % от первоначальной концентрации Cd²⁺, введенного в клеточную суспензию. Статистическую обработку проводили с использованием общепринятых методик [8].

Результаты и обсуждение

В таблице представлены данные об аккумуляции ионов кадмия клетками штаммов морских бактерий с высоким и низким уровнем резистентности к этому металлу. Используемая в исследованиях концентрация кадмия 0,27 ммоль·л⁻¹ соответствует значениям МИК для штаммов с высоким уровнем резистентности и на два порядка превышает содержание кадмия в черноморских водах [9]. Суммарное количество кадмия в каждой опытной пробе составляло 300 мкг.

Как видно из таблицы, клетки штаммов 169, 175 и 16 с низким уровнем устойчивости накапливают от 3,0 до 6,2 мкг кадмия, что составляет 1,0 - 2,1 % от общего количества этого металла, внесенного в среду. Клетки штам-

Аккумуляция Cd^{2+} клетками морских бактерий ($n = 3$)

Штамм	Обнаружено Cd^{2+} , мкг							
	клетки		надосадочная жидкость		промывные воды		всего	
	$X_{cp} \pm s_x$	%	$X_{cp} \pm s_x$	%	$X_{cp} \pm s_x$	%	$X_{cp} \pm s_x$	%
240	$7,4 \pm 0,1$	2,5	$258,8 \pm 1,4$	86,3	$19,3 \pm 1,2$	6,4	286	95,2
69	$9,0 \pm 0,3$	3,0	$270,9 \pm 3,6$	90,3	$4,8 \pm 0,3$	1,6	285	94,9
71	$8,9 \pm 0,2$	3,0	$262,5 \pm 1,5$	87,5	$15,8 \pm 0,1$	5,3	287	95,8
31	$4,8 \pm 0,1$	1,6	$277,4 \pm 0,1$	92,5	$2,4 \pm 0,1$	0,8	285	94,9
31А	$7,4 \pm 0,5$	2,5	$258,7 \pm 1,4$	86,2	$24,2 \pm 1,1$	8,1	290	96,8
169	$3,0 \pm 0,2$	1,0	$251,7 \pm 1,7$	83,9	$41,4 \pm 1,3$	13,8	296	98,7
175	$4,9 \pm 0,1$	1,6	$263,5 \pm 0,2$	87,8	$23,8 \pm 0,2$	7,9	292	97,4
16	$6,2 \pm 0,7$	2,1	$264,4 \pm 5,0$	88,1	$21,8 \pm 1,2$	7,3	292	97,5

Примечание: в каждую пробу внесено 300 мкг Cd^{2+} .

мов 240, 69, 71 и 31 с высоким уровнем резистентности накапливают от 4,8 до 9,0 мкг кадмия, что соответствует 1,6 - 3,0% от общего количества в опыте. В пересчете на 1 г биомассы низко резистентные штаммы аккумулируют кадмий в пределах 1,7 - 3,6 мг·г⁻¹ сухой биомассы, а высоко резистентные — от 3,6 до 7,5 мг·г⁻¹ сухой биомассы.

Проведенная статистическая обработка полученных данных свидетельствует об отсутствии достоверных различий ($t_{ф} < t_{ст}$) в аккумуляции кадмия штаммами с высоким и низким уровнем резистентности к этому металлу.

Интересно отметить, что штамм 31А, который хранился в коллекции на протяжении трех месяцев на среде с кадмием 0,4 ммоль·л⁻¹ аккумулирует его больше, чем штамм 31, который поддерживался до опыта на среде без этого металла. Способность аккумулировать кадмий после хранения штамма 31А на среде с этим металлом возросла с 3,6 до 4,9 мг на один грамм биомассы.

Известно, что бактерии могут аккумулировать кадмий в пределах нескольких десятков мг·г⁻¹ сухой биомассы. Так, например, *Pseudomonas ceracia* накапливает до 77 мг Cd^{2+} на 1 г [2]. Исследования, проведенные нами в 1991-1992 гг., показали, что бактерии рода *Pseudomonas sp.*, выделенные из черноморских вод, в среднем аккумулируют 34 мг·г⁻¹ сухой биомассы [10].

Таким образом, штаммы бактерий, изолированные из морской воды Одесского залива, характеризуются довольно низкой способностью аккумулировать ионы кадмия. Не выявлено статистически достоверной зависимости

между уровнем устойчивости исследованных морских бактерий к кадмию и их способностью аккумулировать ионы этого металла.

Представленная работа выполнена в рамках проекта INTAS-Ukraine 95-0116. Авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам фирмы “Сейболд” за содействие в проведении исследований.

Литература

1. *Илялетдинов А. Н.* Микробиологическое превращение металлов. — Алма-Ата: Наука, 1984. — 268 с.
2. *Ташишев А. Б.* Взаимодействие микроорганизмов с металлами // Микробиол. журн. — 1995. — Т. 57, № 2. — С. 95-104.
3. *Ташишев А. Б.* Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами // Микробиол. журн. — 1994. — Т. 56, № 6. — С. 89-100.
4. *Ivanitsa V. A., Buchtiyarov A. Ye.* Resistance level to heavy metals of microbial coenoses of the Black Sea shoreface // Вісник Одеського державного університету. — 2000. — Т.5, вип. 1. — С. 204-208.
5. *Іваниця В. О., Бухтіяров А. Є.* Стійкість морських гетеротрофних бактерій до важких металів за умов їх збереження // Вісник Одеського державного університету. — 2001. — Т. 6, вип. 1. — С. 139-145.
6. *McEldowney S.* Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with glass // Appl. Environ. Microbiol. — 1994. — V. 60, № 8. — P. 2759-2765.
7. *Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К.* — М.: Мир, 1991. — 358 с.
8. *Лапач С. И., Чубенко А. В., Бабич П. Н.* Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. — Киев: Морион, 2001. — 408 с.
9. *Чугай А. В., Сафронов Т. А.* Характеристика качества воды в приустьевых районах северо-западной части Черного моря // Экологические проблемы Черного моря. — Одесса: ОЦНТЭИ, 1999. — С. 181-186.
10. *Ivanitsa V. A., Vasilyeva T. V., Buchtiyarov A. Ye. et al.* Interactions between marine bacteria and heavy metals // Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century / Amilis R., Ballester A.: In 2 part. — London, 1999. — Part B. Molecular Biology, Biosorption, Bioremediation. — P. 317-326.

Іваниця В. О.¹, Бухтіяров А. Є.¹, Захарія А. Н.²

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, каф. мікробіології і вірусології¹, каф. аналітичної хімії²,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

АКУМУЛЯЦІЯ КАДМІЮ МОРСЬКИМИ БАКТЕРІЯМИ

Резюме

Показано, що морські бактерії, ізольовані із вод Одеської затоки, акумулюють кадмій у межах 1,7 - 7,5 мг·г⁻¹ сухої біомаси. При цьому не встановлено значимих статистичних відмінностей у рівнях акумуляції між групою високо- і низькорезистентних до кадмію мікроорганізмів.

Ключові слова: морські бактерії, Cd²⁺, акумуляція.

Ivanitsa V. A.¹, Buchtiyarov A. E.¹, Zacharia A. N.²

Odessa National University after I. I. Mechnikov, Department of Microbiology and Virology¹, Department of Analytic Chemistry²,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

ACCUMULATION OF CADMIUM BY MARINE BACTERIA

Summary

It is shown that bacteria isolated from the Odessa Gulf accumulate cadmium in diapason of 1,7 - 7,5 mg·g⁻¹ of dry biomass. It was not observed any considerable statistic difference on the level of accumulation between the groups of high and low cadmium resistance of microorganisms.

Key words: marine bacteria, Cd²⁺, accumulation.