

УДК 579.87

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ АКТИНОБАКТЕРИЙ К СОЛЯМ ВАНАДИЯ

Л. В. Костина^а, М. С. Куюкина^б, И. Б. Ившина^{а,б}

^а Пермский государственный университет, 614990, Пермь, ул. Букирева, 15

^б Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, 614081, Пермь, ул. Голева, 13

Изучена устойчивость 64 чистых культур актинобактерий, хранящихся в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов Института экологии и генетики микроорганизмов (ИЭГМ), к солям ванадия в зависимости от pH среды культивирования бактериальных клеток. Определены минимальные ингибирующие концентрации для данных штаммов актинобактерий. Выявлено отсутствие корреляции между видовой принадлежностью исследуемых штаммов актинобактерий и их устойчивостью к солям ванадия. Установлено, что устойчивость актинобактерий к воздействию исследуемых солей ванадия увеличивается в 2-4 раза в условиях нейтральной реакции среды по сравнению с таковой при кислой и щелочной среде. Отобранные коллекционные штаммы актинобактерий, устойчивые к высоким концентрациям солей ванадия.

Среди химических веществ, загрязняющих окружающую среду, особое место занимают тяжелые металлы. Это обусловлено тем, что металлы, в отличие от органических загрязнителей, не подвергаются процессам разложения и способны лишь к перераспределению между отдельными компонентами среды. К тяжелым металлам относят группу химических элементов, имеющих плотность более 5 г/см³ и относительную атомную массу более 40 а.е.м. (Фрумин, 2002). Ванадий – тяжелый металл, входящий в побочную подгруппу пятой группы периодической системы. Он образует преимущественно пятивалентные соединения, но характеризуется переменной валентностью от (II) до (V). В природе ванадий находится преимущественно в рассеянном состоянии и обнаруживается в железных рудах, нефти, асфальтах, битумах, горючих сланцах. Одним из главных источников загрязнения окружающей среды ванадием является нефть и продукты ее переработки (Barceloux, 1999). Данный металл активно аккумулируется клетками микроорганизмов, органами и тканями человека, теплокровных животных и гидробионтов. Ванадий содержится в альтернативных нитрогеназах некоторых почвенных бактерий, однако не является необходимым элементом для развития большинства прокариотных организмов (Ван Ни и др., 1990). Как микроэлемент ванадий участвует в регуляции углеводного обмена и сердечно-сосудистой деятельности высших позвоночных животных (Barceloux, 1999). Избыточное накопление ванадия оказывает токсическое воздействие на живые организмы. Токсический эффект ванадия обусловлен, главным образом, стимуляцией образования свободнорадикальных состояний ки-

слорода и изменением pH среды (Барский и др., 1999). Ванадий является ингибитором клеточных ферментов, в частности Na⁺/K⁺-АТФ-азы (Willsky et al., 1985). Катионы ванадия легко образуют комплексы с гидроксильными, карбоксильными, фосфатными группами и ковалентные связи с сульфгидрильными группами. Они способны соединяться с белками, нуклеотидами, коферментами, фосфолипидами, практически со всеми типами веществ, участвующими в метаболизме клеток (Сенцова, 1985). Некоторые сахара и аминокислоты, водород, лактат, глицерол и диоксид углерода являются донорами электронов для пятивалентного ванадия (Lovley, 1993). Следует отметить, что токсический эффект тяжелых металлов в отношении микроорганизмов во многом зависит от pH среды. Так, токсичность ионов Cd²⁺ в бактериальных клетках увеличивается при значениях pH, характерных для щелочной среды (Иванов и др., 1997).

В настоящее время одним из перспективных с точки зрения эффективности, безопасности и экономичности методов очистки окружающей среды от загрязнений считается микробиологический. Клетки микроорганизмов способны концентрировать значительные количества металлов из среды независимо от того, имеют ли эти металлы физиологическое значение или их участие в метаболических процессах не установлено (Пименов и др., 1996; Gadd, Rehm, 1988). При эффективных биотехнологических методах очистки экосистем, загрязненных тяжелыми металлами и нефтепродуктами, предполагается использование микроорганизмов с высокой активностью оксигеназ и устойчивые к воздействию токсичных металлов (Christofi, Ivshina, 2002).

Цель настоящей работы – изучение устойчивости коллекционных культур актинобактерий к солям ванадия в зависимости от pH среды культивирования бактериальных клеток.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования служили 64 штамма актинобактерий, хранившихся в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов ИЭГМ (Каталог штаммов..., 1994; www.ecology.psu.ru/iegmcol/) и принадлежащих к 2 видам рода *Gordonia* (*G. rubropertincta*, *G. terrae*), виду *Dietzia maris* и 6 видам рода *Rhodococcus* (*R. erythropolis*, *R. fascians*, *R. "longus"*, *R. opacus*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*) (табл. 1). Данные культуры актинобактерий выделены из различных природных источников резко контрастных эколого-географических регионов, они характеризуются высокой активностью оксигеназного ферментного комплекса и проявляют высокую (от 20 до 85%) эмульгирующую активность (Ившина, 1997).

Таблица 1

Источники выделения коллекционных штаммов актинобактерий

Вид, номер штамма	Источники и география проб
<i>Dietzia maris</i>	
ИЭГМ 45	Пластовая вода, нефтяное месторождение, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 55 ^T	Почва, загрязненная нефтью, Черниговская обл., Украина
ИЭГМ 166	Вода, загрязненная нефтью, Камское водохранилище, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 291	Донные отложения, Тюменская обл., Россия
ИЭГМ 317	Кишечный тракт карпа
<i>Gordonia rubropertincta</i>	
ИЭГМ 95 ^T	Почва
ИЭГМ 96	Почва, пропитанная нефтью, Украина
ИЭГМ 105	Вода, р. Днепр, Днепропетровская обл., Украина
ИЭГМ 106	Воздушное заражение культуральной среды
ИЭГМ 128	Почва, загрязненная нефтью, нефтяное месторождение, Иваново-Франковская обл., Украина
<i>Gordonia terrae</i>	
ИЭГМ 143 ^T	Почва
ИЭГМ 144, ИЭГМ 146	Почва, пропитанная нефтью, Украина
ИЭГМ 147, ИЭГМ 151	Вода, р. Днепр, Днепропетровская обл., Украина
ИЭГМ 157	Вода, р. Днепр, Полтавская обл., Украина
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
ИЭГМ 185, ИЭГМ 186	Вода, Камское водохранилище, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 201	Вода, родник, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 256	Почва, загрязненная нефтью, Украина
ИЭГМ 266, ИЭГМ 267, ИЭГМ 268, ИЭГМ 269, ИЭГМ 270	Почва, загрязненная нефтью, район нефтепромысла, Пермская обл., Россия

Окончание табл. 1

Вид, номер штамма	Источники и география проб
ИЭГМ 708	Шламохранилище, г. Полазна, Пермская обл., Россия
<i>Rhodococcus fascians</i>	
ИЭГМ 34	Кожа карпа, Днепровское водохранилище, Украина
ИЭГМ 38, ИЭГМ 39	Пластовая вода, нефтяное месторождение, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 170	Снег, район нефтепромысла, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 278	Речная вода, Тюменская обл., Россия
<i>Rhodococcus "longus"</i>	
ИЭГМ 27, ИЭГМ 28, ИЭГМ 29	Почва, загрязненная нефтью, Полтавская обл., Украина
ИЭГМ 31	Почва, загрязненная нефтью, Полтавская обл., Украина
ИЭГМ 32	Почва, поле, Полтавская обл., Украина
ИЭГМ 33	Почва, загрязненная нефтью, Иваново-Франковская обл., Украина
ИЭГМ 68, ИЭГМ 69	Почва, район нефтепромысла, Пермская обл., Россия
<i>Rhodococcus opacus</i>	
ИЭГМ 56	Почва, Украина
ИЭГМ 57	Почва, загрязненная нефтью, Украина
ИЭГМ 59	Почва, Украина
ИЭГМ 61	Почва, загрязненная нефтью, Украина
ИЭГМ 246	Почва, полиэфирные волокна лавсана, Беларусь
ИЭГМ 716 ^T	Район утечки газового трубопровода, Великобритания
ИЭГМ 717	Почва, Великобритания
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	
ИЭГМ 62 ^T	Почва
ИЭГМ 63, ИЭГМ 64, ИЭГМ 65	Почва, Украина
ИЭГМ 646	Вода, г. Березники, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 647	Нефтепромысловая вода, Межевское нефтяное месторождение, Пермская обл., Россия
<i>Rhodococcus ruber</i>	
ИЭГМ 73	Грунтовая вода нефтяного месторождения, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 77	Вода, родник, контурная зона нефтяного месторождения, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 84	Песчаная порода, Гомельская обл., Беларусь
ИЭГМ 93	Песчаная порода, Восточная Сибирь, Ичерская площадь, Иркутская обл., Россия
ИЭГМ 172	Пластовая вода, нефтяное месторождение, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 223, ИЭГМ 224, ИЭГМ 225, ИЭГМ 226	Почва, р-н Полазненского нефтепромысла, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 231	Вода, родник, р-н Ольховского нефтепромысла, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 235	Снежный покров, р-н Полазненского нефтепромысла, Пермская обл., Россия
ИЭГМ 327	Дерново-подзолистая почва, нефтегазовое месторождение, Пермская обл., Россия

Примечание. ^T – типовой штамм, *R. "longus"* – невалидный вид.

В экспериментах применяли водные растворы (от 1,6 до 250,0 мМ) солей ванадия VOSO_4 (рН=2,2), NaVO_3 (рН=7,5) и Na_2VO_4 (рН=12,0). В качестве количественной характеристики резистентности исследуемых бактерий к солям ванадия приняли показатель минимальной ингибирующей концентрации (МИК), который определяли с помощью модифицированного нами микролуночного метода с использованием мясопептонного бульона. В качестве контролей применяли бактериальную культуру, выращенную в питательной среде без металла, а также неинкубированную питательную среду. Планшеты инкубировали в течение трех суток при температуре 28°C. Учет результатов проводили с использованием красителя йоднитротетразолия фиолетового. Данный краситель действует в качестве конкурентного кислороду акцептора электронов в электрон-транспортной цепи аэробных микроорганизмов. При внесении красителя в среду происходит его восстановление до нерастворимого в воде формазана. Формазан проявляется через несколько минут в виде красно-фиолетового окрашивания только в присутствии активно респираторных микроорганизмов. Все эксперименты проводились в четырехкратной повторности.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета компьютерной программы Statistica (версия 6.0 для Windows).

Результаты и их обсуждение

В табл. 2 приведены результаты определения МИК солей ванадия в зависимости от рН среды культивирования исследуемых актинобактерий. Необходимо отметить, что 52 из 64 исследованных штаммов сохраняют жизнеспособность при концентрации ванадата натрия (рН=7,5) свыше 250,0 мМ (МИК для этих бактериальных культур находится выше предела растворимости данной соли). Данная величина превышает предельно допустимую концентрацию (ПДК = 150 мг/кг) ванадия в почве в 85 раз. По нашим данным, представителей актинобактерий разных родов по степени устойчивости к солям ванадия можно расположить в ряд: *Gordonia*>*Rhodococcus*>*Dietzia* при рН=2,2; *Dietzia*>*Rhodococcus*>*Gordonia* при рН=7,5 и 12,0 (табл. 2).

В экспериментах по изучению влияния кислотности среды культивирования на устойчивость бактериальных штаммов к ванадию использовали водные растворы солей металла с нейтральным значением рН.

Раствор VOSO_4 (рН=7,7) готовили с использованием буфера, содержащего лимонную кислоту, а раствор Na_2VO_4 (рН=6,8) – с использованием трис(гидроксиметил)аминометан-малеатного буфера. Как видно из табл. 3, при применении забуференных растворов солей ванадия показатели МИК увеличиваются в 2-4 раза по сравнению с таковыми, полученными при использовании растворов данных

солей, имеющих значения рН, свойственные кислым и щелочным средам.

Таблица 2

Резистентность актинобактерий к солям ванадия

Вид (количество штаммов)	МИК, мМ		
	VO^{2+}	VO_3^-	VO_4^{3-}
	рН		
	2,2	7,5	12,0
<i>Dietzia maris</i> (5)	12,5 ± 6,83	> 250,0	90,0 ± 20,0
<i>Gordonia rubropertincta</i> (5)	22,5 ± 5,00	> 250,0	80,0 ± 24,49
<i>G. terrae</i> (6)	18,8 ± 6,25	> 250,0	58,3 ± 31,18
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (10)	11,9 ± 1,88	> 250,0	47,5 ± 7,50
<i>R. fascians</i> (5)	10,0 ± 3,04	> 250,0	40,0 ± 12,25
<i>R. "longus"</i> (8)	20,3 ± 6,05	> 250,0	62,5 ± 21,65
<i>R. opacus</i> (7)	5,8 ± 4,23	> 250,0	33,9 ± 14,51
<i>R. rhodochrous</i> (3)	13,3 ± 5,89	> 250,0	66,7 ± 23,57
<i>R. ruber</i> (12)	16,7 ± 5,89	> 250,0	83,3 ± 23,57

Таблица 3

Резистентность актинобактерий к солям ванадия при нейтральных значениях рН

Вид (количество штаммов)	МИК, мМ	
	VO^{2+}	VO_4^{3-}
	рН	
	7,68	6,78
<i>Dietzia maris</i> (5)	40,0 ± 12,25	> 250,0
<i>Gordonia rubropertincta</i> (5)	90,0 ± 22,36	> 250,0
<i>G. terrae</i> (6)	75,0 ± 27,38	175,0 ± 82,16
<i>Rhodococcus erythropolis</i> (10)	52,5 ± 18,45	160,0 ± 73,48
<i>R. fascians</i> (5)	40,0 ± 13,69	100,0 ± 61,24
<i>R. "longus"</i> (8)	75,0 ± 26,73	137,5 ± 51,75
<i>R. opacus</i> (7)	23,2 ± 18,3	85,71 ± 24,40
<i>R. rhodochrous</i> (3)	66,67 ± 25,82	> 250,0
<i>R. ruber</i> (12)	70,83 ± 25,75	> 250,0

Следует отметить, что строгой корреляции между видовой принадлежностью штаммов актинобактерий и их устойчивостью к исследуемым солям ванадия в зависимости от рН среды нами не выявлено. Оказалось, что коллекционные культуры обладают индивидуальной устойчивостью к металлу, которую можно, по-видимому, объяснить приуроченностью исследуемых культур к различным экологическим нишам (см. табл. 1).

В результате проведенных исследований нами отобраны наиболее устойчивые к солям ванадия штаммы *D. maris* ИЭГМ 45, *G. rubropertincta* ИЭГМ 95, *G. terrae* ИЭГМ 147, *R. ruber* ИЭГМ 93, ИЭГМ 231, для которых характерны следующие значения МИК: VOSO_4 – 25,0; NaVO_3 – более 250,0; Na_2VO_4 – 100,0 мМ.

Выводы

1. Выявлено отсутствие корреляции между видовой принадлежностью исследуемых штаммов актинобактерий и их устойчивостью к солям ванадия.

2. Обнаружено, что значения МИК ванадата натрия в отношении исследуемых коллекционных культур актинобактерий находятся выше предела растворимости данной соли.

3. Установлено, что устойчивость актинобактерий к действию исследуемых солей ванадия увеличивается в 2-4 раза в условиях нейтральной реакции питательной среды по сравнению с таковой при кислых и щелочных средах.

Библиографический список

- Барский Е.Л., Саванина Я.В., Лебедева А.Ф. Изменение окислительно-восстановительного потенциала среды культивирования устойчивой к тяжелым металлам бактерии *Pseudomonas diminuta*: взаимосвязь с выделением из клеток металлотионеинподобных белков // Вестник МГУ. 1999. Сер. Биология. № 2. С. 11-15.
- Ван Ни Ч., Якунин А.Ф., Гоготов И.Н. Влияние молибдена, ванадия и вольфрама на рост и синтез нитрогеназы свободноживущей цианобактерии *Anabaena azollae* // Микробиология. 1990. Т. 59, № 4. С. 583-586.
- Иванов А.Ю., Фомченков В.М., Хасанова Л.А., Гаврюшкин А.В. Токсическое действие гидро-

ксилированных ионов тяжелых металлов на ЦПМ бактериальных клеток // Микробиология. 1997. Т. 66, № 5. С. 588-594.

Ившина И.Б. Бактерии рода *Rhodococcus*: биоразнообразии, детекция, иммунодиагностика: Дис... д-ра биол. наук. Пермь, 1997.

Каталог штаммов Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов / Под ред. И.Б. Ившиной. М.: Наука, 1994.

Пименов Е.В., Дармов И.В., Погорельский И.П., Янов С.Н., Куликов О.А., Калинин В.Б. Выделение и характеристика штаммов бактерий, резистентных к соединениям мышьяка // Микробиология. 1996. Т. 65, № 2. С. 214-218.

Сенцова О.Ю., Максимов В.Н. Действие тяжелых металлов на микроорганизмы // Успехи микробиологии. 1985. Т. 20, № 4. С. 227-252.

Фруммин П.Т. Экологическая химия и экологическая токсикология. СПб., 2002.

Barceloux D.G. Vanadium // J. Toxicol. Clin. Toxicol. 1999. Vol. 37 (2). P. 265-278.

Christofi N., Ivshina I.B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation // J. Appl. Microbiol. 2002. Vol. 93. P. 915-929.

Gadd G.M., Rehm H.J. Accumulation of metals by microorganisms and algae // Biotechnology. 1988. Vol. 60. P. 401-405.

Willsky G.R., Leung J.O., Offermann P.V., Plotnic E.K., Dosch S.F. Isolation and characterization of vanadate-resistant mutants of *Saccharomyces cerevisiae* // J. Bacteriol. 1985. Vol. 164. P. 611-617.

Studying the actinobacteria resistance to vanadium salts

L.V. Kostina, M.S. Kuyukina, I.B. Ivshina

Vanadium salts-resistance of 64 pure actinobacterial cultures from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms IEGM was studied depending on nutrient medium pH. Minimal inhibition concentrations were determined for these strains. No correlation was detected between the species position of the actinobacterial strains studied and their resistance to vanadium salts. 2-4 fold increase in actinobacterial resistance was found in neutral pH medium compared to acidic and alkaline media. Actinobacterial strains resistant to high concentrations of vanadium salts were selected.