

ВПЛИВ ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ НА ПІГМЕНТСИНТЕЗУЮЧУ ЗДАТНІСТЬ БАКТЕРІЙ РОДІВ *PSEUDOMONAS* І *SERRATIA*

О.Ф. Рильський

Запорізький національний університет

Изучено действие ионов тяжелых металлов на пигментсинтезирующие бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia*. Установлено, что под действием ионов тяжелых металлов наблюдается потеря пигментсинтезирующей способности бактерий при росте на твердой питательной среде. После пересева этих бактерий на среду без тяжелых металлов синтез пигментов снова восстанавливается. При дальнейшем пересеве бактериальных культур на мясо-пептонный агар с металлом наблюдается повторная потеря пигмента, но при несколько большей концентрации этого металла. Потеря пигментсинтезирующей способности бактериями под влиянием ионов тяжелых металлов может быть использована для оценки степени загрязнения ими окружающей среды.

Бактерии, пигментсинтезирующая способность, ионы тяжелых металлов

ВСТУП

У зв'язку з загостренням екологічної ситуації вивчення взаємодії іонів важких металів (ВМ) з клітинами мікроорганізмів становить значний інтерес.

Останнім часом виконано багато робіт з акумуляції та адсорбції іонів важких металів (ВМ) клітинами грибів, бактерій, рослин тощо [2–5]. 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 [1, 6, 12].

Відомо, що пігменти бактерій відносяться до вторинних метаболітів 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 геміціюціанін, йодинін, феназин-1-карбоксилова кислота, хлорорафін, оксихлорорафін, аеругінозин А, аеругінозин В тощо [8, 10, 11]. Окремі представники роду *Pseudomonas* утворюють флюоресцуючі пігменти –

піовердини, а також каротиноїдні пігменти, меланіни та флюоресцуючі пігменти флавоноїдної групи.

Широко відомі яскраво-червоні бактерії *Serratia marcescens* завдячують своєму забарвленню продигіозину. Саме яскравість кольору, його насиченість, стійкість синтезу пігменту визначили об'єкти нашого дослідження – *Serratia marcescens* та деякі види бактерій роду *Pseudomonas*.

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 [3, 4]. Метою наших досліджень було вивчення впливу концентраційних рядів іонів деяких важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій родів *Pseudomonas* і *Serratia*.

УМОВИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Тест-об'єктами були пігментні бактерії *Ps. fluorescens var pseudoiodinum*, а також *Serratia marcescens*, люб'язно представлені 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, Cd у концентраціях 5–150 мг/дм³.

Тверде поживне середовище – м'ясо-пептонний агар (МПА) готували на воді без ВМ (контроль) та з певним вмістом іонів ВМ. Концентрація іонів Cr⁶⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺, у середовищі складала 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 150 мг/дм³, Cd²⁺ – від 5 до 70 мг/дм³. Застиглий у чашках Петрі МПА засівали суцільним газоном колекційними пігментутворюючими 18-годинними культурами, інкубували протягом 24 годин у термостаті при температурі 28–31°C 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 наступну схему пересівів (рис. 1):

пігментна	культура	культура
культура	без пігменту	з пігментом



Рисунок 1 – Схема пересівів бактеріальної культури

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Досліди з клітинами *Ps. fluorescens var pseudo-iodinum*, *Serratia marcescens*, результати яких наведено в табл. 1–2, продемонстрували зниження інтенсивності забарвлення культури з ростом концентрації всіх використаних іонів ВМ у твердому живильному середовищі. Втрата пігментації та утворення безбарвних колоній спостерігається при концентраціях, що на 10–20 % нижчі тих концентрацій, які 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 по відношенню до пігментосинтезуючої здатності проявляв шестивалентний хром (30–40 мг/дм³), а найнижчий (100–150 мг/дм³) – двовалентний свинець.

Таблиця 1 – Вплив іонів ВМ на ріст і пігментоутворення *Pseudomonas fluorescens var. pseudo-iodinum*

Концент- рація металів, мг/дм ³	Cd ²⁺		Cu ²⁺		Cr ⁶⁺		Ni ²⁺		Pb ²⁺	
	ріст*	піг- мен**	ріст	піг- мент	ріст	піг- мент	ріст	піг- мент	ріст	піг- мент
20	++++	+++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	++++	++++
30	+++	++	+++	+	++	+	++++	+++	+++	+++
50	++	-	+	+	+	-	+++	+	+++	++
70	-	-	+	-	+	-	+	-	++	++
100	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+
150	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+

Примітка: *Ріст: ++++ – суцільний; +++ – добрий; ++ – помірний; + – слабкий; – – відсутній; **Пігмент: ++++ – інтенсивне; +++ – добре; ++ – помірне; + – слабке; – – відсутнє

Становить інтерес питання про можливість відновлення здатності до синтезу пігментів у бактерій, взятих із знебарвлених колоній та пересіяних на МПА без ВМ. Виявилося, що добові культури всіх штамів, що втратили пігмент під впливом іонів ВМ, після посіву на МПА без металу відновлюють здатність до пігментоутворення, при чому, інтенсивність (яскравість) забарвлення стає навіть дещо більшою, ніж у контролі.

Таблиця 2 – Вплив іонів ВМ на ріст і пігментоутворення *Serratia marcescens*

Концент рація металів, мг/дм ³	Cd ²⁺		Cu ²⁺		Cr ⁶⁺		Ni ²⁺		Pb ²⁺	
	ріст*	піг- мент**	ріст	піг- мент	ріст	піг- мент	ріст	піг- мент	ріст	піг- мент
20	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
30	++++	++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	++++	++++
40	+++	+	+++	+++	++	-	+++	+++	+++	++
50	++	-	++	++	-	-	+++	+++	++	+
70	+	-	+	-	-	-	+++	+++	++	+
100	-	-	-	-	-	-	+++	++	++	+
150	-	-	-	-	-	-	+	-	++	+

Примітка: умовні позначення такі ж, як і у табл. 1.

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 складає 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 шикимова кислота, то можна припустити, що блокування їх утворення ВМ відбувається 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 хоризнової кислоти не впливає на синтез піоціаніну [7, 9]. З цього можна зробити висновок, що механізми блокування синтезу пігментів у всіх *Pseudomonas* аналогічні, бо всі ці пігменти відносяться до феназинового ряду.

Серед прокаріот дуже мало організмів-біоіндикаторів забруднення оточуючого середовища. Найбільш відомий мікроорганізм-біоіндикатор *E. coli* сигналізує лише про забруднення середовища органічними речовинами. Втрата пігментсинтезуючої здатності бактеріями родів *Pseudomonas* і *Serratia* під впливом іонів ВМ може бути використана для оцінки ступеня забруднення ними оточуючого середовища.

У перспективі планується продовження досліджень впливу важких металів і діапазоні концентрацій на пігментсинтезуючу здатність бактерій інших родів.

ВИСНОВКИ

1. Під дією іонів ВМ спостерігається втрата пігментсинтезуючої здатності бактерій при рості на твердому повноцінному поживному середовищі (МПА).
2. Втрата пігменту тест-культурами відбувається при меншій концентрації іонів ВМ, ніж повне припинення росту культури бактерій.
3. Після культивування бактерій на середовищі з іонами ВМ спостерігається відновлення пігментоутворюючої здатності при наступному пересіві культури на тверде середовище без металу.
4. При подальшому пересіві бактеріальних культур на МПА з металом (після відновлення пігментоутворюючої здатності) спостерігається повторна втрата пігменту, але при дещо більших концентраціях цього металу.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Лебедева Т.С., Сытник К.М. Пигменты растительного мира. – К.: Наукова думка. – 1986. – 96 с.
2. Никовская Г.Н., Ульберг З.Р., Стрижак Н.П. Коллоидно-химические закономерности взаимодействия урана (VI) с клетками металло-

- резистентной культуры бактерий *Bacillus cereus* ВКМ 4368 // Коллоидный журнал. – 2002. – Т. 64, № 2. – С. 194–200.
3. Пасичная Е.А. Токсичность меди для гидрофитов: аккумуляция, влияние на фотосинтез, дыхание, пигментную систему // Гидробиол. журнал. – 2001. – Т. 37, № 3. – С. 93–107.
 4. Пасічна О.О. Порівняльна характеристика дії важких металів на вищі водяні та нитчасті водорості // Наук. зап. Тернопільського педуніверситету ім. В. Гнатюка. Сер. Біологія. Спец. випуск: гідроекологія. – 2001. – № 3 (14). – С. 222–224.
 5. Подгорский В.С., Касаткина Т.П., Лозовая О.Г. Дрожжи – биосорбенты тяжелых металлов // Микробиол. журнал. – 2004. – Т. 66, № 1. – С. 91–103.
 6. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. – М.: Наука. – 1986. – 199 с.
 7. Феофилова Е.П. Пигменты микроорганизмов. – М.: Наука. – 1974. – 242 с.
 8. Calhoun D., Carson M., Yensen R. The branch point for pyocyanin synthesis mutants in *Pseudomonas aeruginosa* // J. Bacteriol. – 1974. – Vol. 117, N. 1. – P. 312–314.
 9. 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. – Vol. 40 (159). – P. 45–51.
 10. Hassen A., Saidi N., Cherif M. Effect of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis* // Bioresource Technology. – 1998. – Vol. 65, N. 1–2. – P. 73–82.
 11. Holstein U., Krisov G., Mock D. Biosynthesis of phenarines. 1. The role of phenarine – 1,6 – dicarbonic acid // Tetrahedron Lett. – 1976. – Vol. 37. – P. 3268–3270.
 12. Holstein U., McLames D. Biosynthesis of phenarines // C. Org. Chem. – 1973. – Vol. 38, N. 6. – P. 3415–3417.

**INFLUENCE OF IONS OF HEAVY METALS
ON THE PIGMENT-SYNTHESIZING CAPACITY OF BACTERIA OF
GENUSES *PSEUDOMONAS* AND *SERRATIA***

A.F. Rylsky

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.

УДК 579.26+612.015.4

Рильський О.Ф. Вплив іонів важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій родів *Pseudomonas* і *Serratia* // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя: ЗНУ, 2009. – Вип. 14, № 1. – С. 115–121.

Вивчено дію іонів важких металів на пігментсинтезуючі бактерії родів *Pseudomonas* і *Serratia*. Встановлено, що під дією іонів важких металів спостерігається втрата пігментсинтезуючої здатності бактерій при рості на твердому живильному середовищі. Після пересіву цих бактерій на середовище без важких металів синтез пігментів знову відновлюється. При подальшому пересіві бактеріальних культур на м'ясо-пептонний агар з металом спостерігається повторна втрата пігменту, але при декілька більшій концентрації цього металу. Втрата пігментсинтезуючої здатності бактеріями під впливом іонів важких металів може бути використана для оцінки ступеня забруднення ними оточуючого середовища.

Бібл. 12. Табл. 2. Рис. 1.