

УДК 579.695

**В.А. Иваница, А.Е. Бухтияров, Г.В. Лисютин, А.Н. Захария,
Т.В. Гудзенко**

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38(0482) 68 79 64,
e-mail: science@onu.edu.ua

АККУМУЛЯЦИЯ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА PSEUDOMONAS

*Изучена способность четырех штаммов бактерий рода *Pseudomonas* аккумулировать из раствора медь, кадмий, цинк и свинец. Показано, что бактерии исследуемых штаммов псевдомонад извлекают из раствора от 7,4 до 64,5% меди, от 8,0 до 25,0% кадмия, от 23,6 до 45,5% цинка, от 51,1 до 83,8% свинца. Наибольшей способностью аккумулировать тяжелые металлы характеризуются бактерии штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329, которые больше других исследованных штаммов извлекают из раствора меди (64,5%), кадмия (25,0%), цинка (45,5%), свинца (83,8%). Из исследованных металлов бактериальные клетки лучше накапливают свинец (от 140,0 до 182,4 мг/г сухого веса биомассы), хуже – цинк (от 17,5 до 33,3 мг/г сухого веса биомассы).*

Ключевые слова: гетеротрофные бактерии, Cu, Cd, Zn, Pb, аккумуляция.

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является серьезной экологической проблемой. Поступление тяжелых металлов происходит как в результате геохимических процессов, так и антропогенного влияния, включающего добычу и переработку металлов, сельское хозяйство, производство электроэнергии, сброс сточных вод. Тяжелые металлы аккумулируются бактериями и другими организмами, переносятся по пищевой цепи и представляют опасность для здоровья человека [9].

Широко используемые на практике физические и химические методы для удаления ионов тяжелых металлов из промышленных сточных вод, основанные на осаждении, окислении, восстановлении, испарении, обратном осмосе и др., являются дорогими и не совсем эффективными. В качестве перспективной альтернативы физическим и химическим методам предлагаются биологические методы [6]. Детоксикация и трансформация соединений тяжелых металлов в природной среде зависит, в первую очередь, от жизнедеятельности микроорганизмов. К механизмам, способствующим извлечению металлов из растворов, следует отнести, в первую очередь, адсорбцию катионов металлов на поверхности клеток,

© В.А. Иваница, А.Е. Бухтияров, Г.В. Лисютин, А.Н. Захария, Т.В. Гудзенко, 2012



которая связана с наличием на ней отрицательно заряженных анионов (PO_4^{3-} , COO^- , SH^- , OH^-) [8].

Бактерии, выделенные из морской среды, характеризующейся постоянным изменением условий существования (температура, pH, соленость, содержание токсичных веществ и т.д.), приспособлены к неблагоприятным условиям, и, как следствие, обладают комплексом специфических адаптаций, в том числе, и к действию тяжелых металлов [6].

Для извлечения металлов из растворов используют представителей различных таксономических групп, в том числе, бактерий рода *Pseudomonas*, которые могут быть эффективными при аккумуляции меди, свинца, кадмия и других металлов из загрязненных сточных вод [9].

В последнее время отдается предпочтение комплексным бактериальным препаратам, включающим несколько видов аборигенных представителей, для проведения очистки загрязненных участков почв или сточных вод [1].

Целью данной работы было изучение способности бактерий рода *Pseudomonas* извлекать из раствора медь, кадмий, цинк и свинец.

Материалы и методы

Объектами исследования были резистентные к высоким концентрациям Cu (0,25–1 ммоль/л), Cd (0,25–0,5 ммоль/л), Pb (0,3–0,5 ммоль/л) штаммы морских гетеротрофных бактерий, изолированные из акватории прибрежных вод острова Змеиный (*Pseudomonas stutzeri* ОНУ 330), а также штаммы *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 327, *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 328, *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 из коллекции микроорганизмов Одесского национального университета.

Способность бактерий аккумулировать Cu, Cd, Zn и Pb определяли согласно методике, предложенной Sharron McEldowney [7]. Бактерии выращивали при 25 °С до ранней экспоненциальной фазы роста в течение суток на МПА. Микроорганизмы с питательной среды смывали и суспендировали в 0,2 ммоль малеатном буфере с pH 6,8 [5], доводя их до концентрации $(1,5 \pm 0,2) \times 10^9$ КОЕ/мл.

К бактериальной суспензии объемом 9,9 мл добавляли 100 мкл раствора меди в концентрации 3,1 мг/мл, кадмия — 4,0 мг/мл, цинка — 1,1 мг/мл, свинца — 3,7 мг/мл. Таким образом, в 10 мл испытуемых образцов содержалось 310 мкг меди, 400 мкг кадмия, 110 мкг цинка, 370 мкг свинца.

Контрольные образцы состояли из 9,9 мл малеатного буферного раствора и 100 мкл соответствующего металла. Фоновое содержание металлов определяли в бактериальной суспензии и в малеатном буферном растворе. Бактериальную суспензию инкубировали на качалке с вращением 150 об/мин в течение 2 часов при температуре 25 °С.

Клетки осаждали центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин при температуре +4 °С. После отбора надосадочной жидкости клетки микроорганизмов дважды промывали малеатным буферным раствором центрифугированием при 8000 g в течение 10 мин при температуре +4 °С. В предварительно высушенные при 110 °С в течение 30 мин и взвешенные пенициллиновые флаконы переносили ресуспендированный бидистиллированной водой клеточный осадок из центрифужных пробирок. Затем флаконы повторно высушивали при 110 °С в течение 30 мин и взвешивали для определения веса биомассы бактерий. Для разрушения бактериальных клеток добавляли 2,5 мл 70% HNO₃ и выдерживали 30 мин при 180 °С. После остывания до комнатной температуры во флаконы добавляли по 4 мл бидистиллированной воды и закрывали пластиковыми крышками. Во все пенициллиновые флаконы и емкости с надосадочной жидкостью и промывными водами вносили 70% HNO₃ для получения конечной концентрации 20%. Содержание исследованных металлов как в опытных (клетках, надосадочной жидкости и промывных водах), так и в контрольных образцах определяли с помощью атомно-абсорбционного спектрофотометра «Сатурн-2» при длине волны 324,7 нм для Cu, 228,8 нм для Cd, 213,9 нм для Zn и 283,3 нм для Pb [4].

Результаты исследований обрабатывали статистически с использованием программы «SPSS 19 для Windows» и «Microsoft Office Excel 2003».

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали (таблиц 1–4) способность бактерий рода *Pseudomonas* извлекать из раствора Cu, Cd, Zn и Pb, которые находились в концентрациях, на три порядка превышающих их содержание в морской воде и соответствующих уровням загрязнения сточных вод [3].

Бактерии исследуемых штаммов аккумулировали из раствора от 7,4 до 64,5% меди. При этом в надосадочной жидкости оставалось от 31,3 до 88,1% металла. Наибольшая способность извлекать медь показана для штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 (табл. 1).

Хуже других металлов исследуемые штаммы аккумулируют кадмий (от 8,0 до 25,0%). Штаммы *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 и *Pseudomonas fluorescens* ОНУ 328 способны извлекать лишь до 25% растворенного кадмия (табл. 2).

Как видно из таблицы 3, исследованные штаммы псевдомонад извлекают от 23,6 до 45,5% цинка. Наибольшей способностью аккумулировать цинк характеризуется штамм *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329.

Наиболее активно исследуемые штаммы псевдомонад извлекают из раствора свинец — от 51,1 до 83,8%. Установлено (табл. 4), что бактерии штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329 эффективно аккумулируют не только медь, кадмий и цинк, но и 83,8% свинца.



Таблица 1

Извлечение Си из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 1

Cu accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Си, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	58 ± 3,0	18,7	232,5 ± 16,0	75,0	7,5 ± 0,4	2,4	298,0	96,1
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	171 ± 9,0	55,2	128,7 ± 6,0	41,5	9,3 ± 0,5	3,0	309,0	99,7
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	200 ± 9,3	64,5	97,0 ± 5,1	31,3	10,0 ± 0,5	3,2	307,0	99,0
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	23 ± 1,0	7,4	273,0 ± 14,2	88,1	3,4 ± 0,1	1,1	299,4	96,6

В каждую пробу внесено 310 мкг Си.

Таблица 2

Извлечение Cd из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 2

Cd accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Cd, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%	М ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	32 ± 1,1	8,0	346 ± 18,3	86,5	8,5 ± 0,5	2,1	386,5	96,6
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	100 ± 5,2	25,0	261 ± 13,1	65,3	23,0 ± 1,2	5,8	384,0	96,1
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	100 ± 5,1	25,0	265 ± 14,4	66,3	27,0 ± 1,3	6,8	392,0	98,1
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	60 ± 3,3	15,0	331 ± 16,2	82,8	7,1 ± 0,3	1,8	398,1	99,6

В каждую пробу внесено 400 мкг Cd.



Таблица 3

Извлечение Zn из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 3

Zn accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Zn, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	28 ± 1,2	25,5	73 ± 2,0	66,4	5,6 ± 0,2	5,1	106,6	97,0
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	39 ± 2,1	35,5	56 ± 3,1	50,9	9,7 ± 0,5	8,8	104,7	95,2
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	50 ± 2,3	45,5	48 ± 2,7	43,6	12,0 ± 0,6	10,9	110,0	100,0
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	26 ± 1,2	23,6	78 ± 3,0	70,9	4,6 ± 0,2	4,2	108,6	98,7

В каждую пробу внесено 110 мкг Zn.

Таблица 4

Извлечение Pb из раствора исследованными бактериями (n=3)

Table 4

Pb accumulation by studied bacteria (n=3)

Штамм	Обнаружено Pb, мкг							
	Клетки		Надосадочная жидкость		Промывные воды		Всего выявлено	
	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%	M ± m	%
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	190 ± 10,1	51,4	149 ± 7,4	40,3	30,0 ± 1,4	8,1	369	99,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	196 ± 9,3	53,0	136 ± 6,8	36,8	40,0 ± 2,0	10,8	370	100,0
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	310 ± 15,2	83,8	27 ± 1,2	7,3	32,0 ± 1,6	8,6	369	99,7
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	200 ± 9,2	54,1	144 ± 7,1	38,9	25,0 ± 1,2	6,8	369	99,7

В каждую пробу внесено 370 мкг Pb.



Результаты накопления тяжелых металлов бактериями в пересчете на грамм сухого веса бактериальной биомассы представлены в таблице 5.

Таблица 5

Накопление Cu, Cd, Zn и Pb клетками бактерий (n=3)

Table 5

Accumulation of Cu, Cd, Zn and Pb by bacterial cells (n = 3)

Штамм	мг металла на г сухого веса биомассы бактерий			
	Cu	Cd	Zn	Pb
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 327	44,6 ± 2,3	22,9 ± 1,8	17,5 ± 1,6	158,3 ± 6,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ОНУ 328	90,0 ± 3,2	90,9 ± 4,4	22,9 ± 1,8	140,0 ± 5,6
<i>Pseudomonas maltophilia</i> ОНУ 329	111,0 ± 4,4	83,3 ± 4,2	33,3 ± 2,2	182,4 ± 7,2
<i>Pseudomonas stutzeri</i> ОНУ 330	17,7 ± 1,7	46,2 ± 2,5	20,0 ± 1,7	142,9 ± 5,5

Как следует из данных, представленных в таблице 5, наибольшей аккумулирующей емкостью по отношению к металлам обладают бактерии штамма *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329. Они накапливают больше других исследованных штаммов меди, цинка и свинца на грамм сухой биомассы.

Лучше других металлов бактериальные клетки аккумулируют свинец (от 140,0 до 182,4 мг на грамм сухого веса биомассы), хуже — цинк (от 17,5 до 33,3 мг на грамм сухого веса биомассы).

Известно, что Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} накапливаются внутри клетки, хотя незначительное количество металлов связывается с их поверхностью. Благодаря системам транспорта магния, марганца и кальция часть кадмия поступает внутрь клетки, в то время, как большая его часть накапливается на поверхности [10, 11].

Из данных литературы известно, что накопление тяжелых металлов различными микроорганизмами может колебаться от нескольких десятков до сотен мг/г сухой биомассы. Максимальное накопление Cu, Cd, Zn и Pb составляло для *Pseudomonas stutzeri* 96,9 мг Cu, 278 мг Cd, 17,7 мг Zn и 270,4 мг Pb на г сухого веса бактериальной биомассы [11].

Исследования, проведенные нами в 2002 г., показали, что резистентные к тяжелым металлам бактерии рода *Pseudomonas*, изолированные из прибрежной части Одесского залива, аккумулировали кадмий до 7,5 мг/г сухой биомассы [2].

Таким образом, штамм *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329, эффективно извлекающий из раствора кадмий, цинк, медь и свинец, представляет интерес для дальнейших биотехнологических исследований.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заєць І.Є., Вознюк Т.М., Ковальчук М.В., Крамаров С.М., Козировська Н.О. Активність консорціуму бактерій в агроценозах сої на забруднених важкими металами чорноземних територіях Придніпров'я // Наука та інновації. — 2007. — Т. 3. — № 6. — С. 26–37.
2. Іваниця В.А., Бухтияров А.Е., Захарія А.Н. Аккумуляція кадмія морськими бактеріями // Вісник Одеського національного університету. — 2002. — Т. 7. — № 1. — С. 200–204.
3. Іваниця В.О., Васильєва Н.Ю., Лісютин Г.В., Бухтияров А.Є., Гудзенко Т.В. Токсична і мутагена активність забруднення акваторії острова Зміїний // Мікробіологія і біотехнологія. — 2009. — № 2. — С. 36–42.
4. Сафронова Н.С., Венецианов Е.В., Ершова Е.Ю. Комплекс аналитических методов для определения содержания и форм существования тяжелых металлов в природных водных объектах // Водные ресурсы. — 1997. — Т. 24. — № 4. — С. 477–485.
5. Справочник биохимика: Пер. с англ. / Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К. — М.: Мир, 1991. — 358 с.
6. Dash H.R., Mangwani N., Chakraborty J., Kumari S., Das S. Marine bacteria: potential candidates for enhanced bioremediation // Appl. Microbiol. and Biotechnol. — 2013. — V. 97. — № 2. — P. 561–571.
7. Kapoor A., Viraraghavan T. Fungal biosorption an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review // Bioresource Technology. — 1995. — V. 53. — № 3. — P. 195–206.
8. McEldowney S. Effect of cadmium and zinc on attachment and detachment interactions of *Pseudomonas fluorescens* H2 with glass // Appl. and Environ. Microbiol. — 1994. — V. 60. — № 8. — P. 2759–2765.
9. Tchounwou P.B., Yedjou C.G., Patlolla A.K., Sutton D.J. Heavy metal toxicity and the environment // EXS. — 2012. — V. 101. — P. 133–164.
10. Wang J., Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future // Biotechnology Advances. — 2009. — V. 27. — № 2. — P. 195–226.
11. Vijayaraghavan K., Yeoung-Sang Y. Bacterial biosorbents and biosorption // Biotechnology Advances. — 2008. — V. 26. — № 3. — P. 266–291.

Стаття надійшла до редакції 25.11.2012 р.



В.О. Іваниця, А.Є. Бухтіяров, Г.В. Лісютін, О.М. Захарія, Т.В. Гудзенко

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, вул. Дворянская, 2, Одеса, 65082,
Україна, тел.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: science@onu.edu.ua

АКУМУЛЯЦІЯ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ БАКТЕРІЯМИ РОДУ PSEUDOMONAS

Реферат

Вивчена здатність чотирьох штамів бактерій роду *Pseudomonas* нагромаджувати з розчину мідь, кадмій, цинк і свинець. Показано, що бактерії досліджуваних штамів псевдомонад вилучають з розчину від 7,4 до 64,5% міді, від 8,0 до 25,0% кадмію, від 23,6 до 45,5% цинку, від 51,1 до 83,8% свинцю. Найбільшою здатністю до акумуляції важких металів характеризувалися бактерії штаму *Pseudomonas maltophilia* ОНУ 329, які вилучають з розчину 64,5% міді, 25,0% кадмію, 45,5% цинку, 83,8% свинцю. Вони накопичують мідь, цинк і свинець більше інших досліджених штамів на грам сухої біомаси. Із досліджених металів бактеріальні клітини краще акумулюють свинець (від 140,0 до 182,4 мг/г сухої ваги біомаси), гірше — цинк (від 17,5 до 33,3 мг/г сухої ваги біомаси).

Ключові слова: гетеротрофні бактерії, Cu, Cd, Zn, Pb, акумуляція.

**V.O. Ivanytsia, A.E. Bukhtiyarov, G.V. Lisyutin, O.M. Zacharya,
T.V. Gudzenko**

Odesa National Mechnykov University, 2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
tel.: +38 (0482) 68 79 64, e-mail: science@onu.edu.ua

ACCUMULATION OF HEAVY METALS BY BACTERIA OF GENUS PSEUDOMONAS

Summary

The ability of four strains of bacteria of the genus *Pseudomonas* to accumulate copper, cadmium, zinc and lead from solution was investigated. It is shown that bacteria of the studied *Pseudomonas* strains remove from 7.4 to 64.5% of copper, 8.0 to 25.0% of cadmium, from 23.6 to 45.5% of zinc, from 51.1 to 83.8% of lead from the solution. The greatest ability to accumulate heavy metals is marked for bacteria of the strain *Pseudomonas maltophilia* ONU 329, which retrieve 64.5% of copper, 25.0% of cadmium, 45.5% of zinc, 83.8% of lead from the solution. They accumulate more copper, zinc and lead per gram of dry biomass than other strains. Bacterial cells accumulate lead better (from 140.0 to 182.4 mg/g of dry weight of biomass), and zinc worse (from 17.5 to 33.3 mg/g of dry weight biomass) than other metals.

Key words: heterotrophic bacteria, Cu, Cd, Zn, Pb, accumulation.

