

УДК 579.68:674.018.674

Іваниця В. О., д-р біол. наук, проф., зав. кафедрою,  
Бухтіяров А. Є., асистент

Одеський національний університет, каф. мікробіології та вірусології,  
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

## СТІЙКІСТЬ МОРСЬКИХ ГЕТЕРОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ ДО ІОНІВ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ ЗА УМОВ ЇХ ЗБЕРЕЖЕННЯ<sup>1</sup>

З'ясовано, що рівень стійкості до  $\text{Hg}^{2+}$  і  $\text{Cd}^{2+}$  гетеротрофних морських бактерій, ізольованих із вод Одеського прибережжя, суттєво (на 50-92%) зменшується за умов збереження протягом 12 місяців. Рівень стійкості до  $\text{Pb}^{2+}$  впродовж усього терміну дослідження змінився незначно.

**Ключові слова:** морські бактерії, збереження, резистентність, іони  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ .

Однією з важливих задач у вивченні адаптивних властивостей мікроорганізмів до антропогенних забруднень, і в першу чергу до токсичних металів, є з'ясування механізмів і ймовірних напрямків формування резистентності на різних рівнях організації — популяційному, клітинному, молекулярно-генетичному — як у природних умовах, так і за збереження культур у колекції [1].

В попередніх дослідженнях нами були визначені мінімальні концентрації іонів  $\text{Hg}^{2+}$  ( $0,05 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ),  $\text{Pb}^{2+}$  ( $1,0 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ),  $\text{Cd}^{2+}$  ( $0,5 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ), що інгібують ріст гетеротрофних морських бактерій Одеського прибережжя. З'ясовано, що кількість домінуючих бактерій, резистентних до досліджуваних металів, на порядок вища в районах з високим рівнем техногенного навантаження (нафтогавань Одеського порту) [5].

Ряд авторів [6, 7, 8], висловлює думку, що за умов збереження культур у колекції відбувається зміна рівнів стійкості бактерій до важких металів, що ускладнює подальше вивчення їх адаптивних здатностей.

Метою даної роботи було вивчення мінливості за показниками стійкості до  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  культур домінуючих гетеротрофних бактерій, ізольованих із вод Одеського прибережжя, за умов їх збереження.

### Матеріали і методи дослідження

Досліджувані культури гетеротрофних бактерій вилучали із проб води, які відбирали в прибережних районах Одеських пляжів “Дельфін” і “Дача Ковалевського” та Центральної нафтогавані Одеського порту з глибини 0,5 м на відстані 50 м від берега у червні 1998 р. Проби води висівали на щільне середовище, яке містило 5,0 г/л пептону, 13,5 г/л агару (рН 7,4) з домішками солей ртуті —  $\text{HgCl}_2$ , свинцю —  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ , кадмію —  $\text{CdCl}_2$  і без них.

Дванадцять досліджуваних культур бактерій були ізольовані із живильного

<sup>1</sup> Дослідження проведено за проектом INTAS-Ukraine 95-0116.

середовища, не утримуючого важких металів. Решту досліджуваних культур вилучили із живильного середовища, що містило найвищі концентрації солей важких металів, в присутності яких спостерігався ріст бактерій. Із них сім культур бактерій вирости на середовищі, яке містило  $0,1 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ , дев'ять культур — на середовищі з  $0,5$  або  $1,0 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$  і дев'ять культур — на середовищі з  $1,0$  або  $1,5 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ . Досліджувані культури зберігали в пробірках під гумовими корками на щільному середовищі того ж складу в колекції за температури  $+5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Визначення значень мінімальних інгібуючих концентрацій (МІК)  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  і  $\text{Pb}^{2+}$  для культур, що зберігалися, провадили за допомогою реплікатора [3] через 6, 9 і 12 місяців з моменту вилучення бактерій із природних умов.

Живильні середовища містили важкі метали у спектрах концентрацій: для  $\text{Hg}^{2+}$  — від  $0,005$  до  $0,5 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$  (з кроком  $0,005 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ), для  $\text{Pb}^{2+}$  — від  $0,1$  до  $2,5 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$  (з кроком  $0,1 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) і для  $\text{Cd}^{2+}$  — від  $0,01$  до  $2,0 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$  (з кроком  $0,01 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ).

Статистичну обробку отриманих даних провадили, використовуючи статистичні пакети програм STATGRAPHICS 4.0 і SPSS 9.0 [4]. Вибір тактики статистичного опрацювання і підготовку вибірки для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах обробки даних [2]. При проведенні регресійного аналізу значення незалежної перемінної  $X$  (чинник — час збереження) і залежної перемінної  $Y$  (відгук — зміни значень МІК) розраховували у відносних величинах з метою забезпечення однорідності вихідної інформації. Значення відгука  $Y$  (%) отримані згідно з формулою:

$$Y_r = \frac{Y_o - Y_i}{Y_o} 100,$$

де  $Y_o$  — значення МІК ( $\text{ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) важкого металу в момент вилучення культур із природного джерела;  $Y_i$  — значення МІК ( $\text{ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) важкого металу, виявлене в процесі зберігання культури.

### Результати дослідження

В таблиці 1 наведені значення МІК іонів важких металів для групи культур морських бактерій, що були ізольовані із морської води і вироцувались на середовищі, яке не містило важких металів. Ці бактерії є представниками домінуючих форм морського бактеріопланктону в досліджуваних районах. Тому визначені вихідні значення МІК ртуті, свинцю і кадмію характеризують природний фоновий рівень резистентності домінуючих форм гетеротрофних морських бактерій до цих металів у досліджуваних районах.

Для ртуті значення МІК були однаковими для всіх досліджуваних бактерій і становили  $0,05 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Значення МІК свинцю і кадмію коливались відповідно в діапазоні  $1,0$ - $2,0 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$  і  $0,05$ - $0,50 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . При цьому для переважної більшості культур бактерій значення МІК кадмію було однаковим —  $0,5 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Як видно із табл. 1, через 6 місяців збереження культур на щільному середовищі їх рівень резистентності до ртуті значно впав. Впродовж 9 місяців збереження рівень резистентності у більшості культур бактерій (58,3%) продовжував зменшуватись. Значення МІК коливались у діапазоні  $0,001$ - $0,010 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ , при цьому для переважної більшості штамів (66,6%) воно складало  $0,005 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . У частини куль-

Таблиця 1

МПК (ммоль·мл<sup>-1</sup>) іонів важких металів для морських бактерій, ізольованих із живильного середовища без домішок важких металів, за умов збереження

№ штаму	Вихідні значення			Через 6 місяців			Через 9 місяців			Через 12 місяців		
	Hg <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Hg <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>
96	0,05	1,0	0,50	0,010	0,9	0,30	0,005	0,5	0,08	0,005	0,30	0,08
97	0,05	1,0	0,50	0,005	1,0	0,20	0,005	1,0	0,08	0,005	1,00	0,08
100	0,05	1,5	0,50	0,020	1,5	0,20	0,001	1,5	0,08	0,001	1,50	0,08
102	0,05	1,5	0,50	0,015	1,5	0,45	0,005	1,5	0,35	0,001	1,50	0,30
169	0,05	1,0	0,08	0,010	0,3	0,08	0,005	0,1	0,08	0,005	0,05	0,08
171	0,05	1,0	0,50	0,020	1,0	0,15	0,005	1,0	0,08	0,001	1,00	0,08
175	0,05	1,5	0,50	0,010	1,5	0,09	0,010	1,5	0,08	0,010	1,50	0,08
4	0,05	1,5	0,50	0,020	1,5	0,30	0,005	1,5	0,20	0,001	1,50	0,10
3	0,05	2,0	0,50	0,015	1,7	0,50	0,010	1,6	0,50	0,005	1,50	0,50
6	0,05	1,5	0,50	0,005	1,5	0,45	0,005	1,5	0,40	0,005	1,50	0,35
16	0,05	1,0	0,09	0,010	1,0	0,09	0,010	1,0	0,08	0,010	1,00	0,08
17	0,05	1,0	0,10	0,005	1,0	0,10	0,005	1,0	0,10	0,005	1,00	0,10

тур (33,3%) резистентність ще більше зменшувалась після 12 місяців збереження бактерій. Хоча діапазон коливань значень МІК залишився без змін, проте зросла частка культур, для яких значення МІК ртуті було мінімальним —  $0,001 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Цікаво відмітити, що у двох культур після 6 місяців зберігання значення МІК зменшилось з  $0,05$  до  $0,01 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ , а в подальшому залишалось без змін до кінця терміну дослідження.

Таким чином, впродовж 12 місяців збереження культур рівень їх резистентності до ртуті в тій чи іншій мірі знижувався, при цьому у ряді випадків значення МІК зменшувались на порядок і більше.

На відміну від ртуті вихідний або фоновий рівень резистентності морських бактерій до кадмію у досліджуваних культур був неоднаковий. Хоча МІК кадмію для різних культур варіювала в діапазоні  $0,08-0,50 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ , для переважної більшості випадків вона складала  $0,50 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Через 6 місяців збереження у переважної більшості культур (66,6%) рівень резистентності до кадмію значно падав. При цьому значення МІК зменшувалось з  $0,50 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$  до  $0,09-0,45 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ , хоча діапазон коливання МІК залишався без змін. Впродовж наступних трьох місяців у більшості культур бактерій (66,6%) значення МІК продовжували зменшуватись і для 50% культур складала  $0,08 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Впродовж наступних трьох місяців значення МІК кадмію незначно зменшувалось лише для 25% культур, в той час як у решти культур резистентність до цього металу не змінювалась. Слід зазначити, що у трьох досліджуваних культур стійкість до кадмію на протязі 12 місяців зберігання бактерій залишалась на рівні вихідних значень. Для інших трьох культур значення МІК кадмію зменшилися незначно. Для 50% культур значення МІК кадмію за 12 місяців зберігання впали до мінімального рівня —  $0,08 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ .

Отже, для культур гетеротрофних морських бактерій за умов збереження їх на щільному середовищі протягом року спостерігалось зменшення резистентності як до ртуті, так і до кадмію.

Вихідні значення МІК свинцю для досліджуваних культур морських бактерій коливались в діапазоні  $1,0-2,0 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Аналіз даних, наведених в табл. 1, свідчить, що за збереження культур протягом 12 місяців лише для трьох культур (25%) стійкість до  $\text{Pb}^{2+}$  поступово зменшувалась. Суттєвим (більш ніж на порядок) це зменшення було лише для однієї культури. Для більшості досліджуваних культур значення МІК свинцю протягом 12 місяців зберігання культур в колекції залишались незмінними.

У подальшому досліджували культури морських бактерій, виділені із морської води шляхом висіву на середовищах, що містили високі концентрації солей важких металів. З'ясувалося, що максимальна концентрація ртуті, за якої спостерігається ріст морських бактерій на щільному середовищі, складає  $0,1 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Культури, що виростили при такій концентрації ртуті, були ізольовані і закладені на збереження на щільне середовище.

Як видно із табл. 2, у переважної більшості культур через 6 місяців збереження значення МІК ртуті зменшилися до  $0,10-0,05 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Через 9 місяців рівень значень МІК ртуті впав для чотирьох штамів, а через 12 місяців — для двох штамів. У одній культурі не було встановлено змін стійкості за умов збереження протягом усього терміну дослідження. МІК ртуті в кінці терміну дослідження у решти культур зменшилися і коливались в діапазоні  $0,01-0,03 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ .

Таблиця 2

МІК (ммоль·мл<sup>-1</sup>) Hg<sup>2+</sup> для морських бактерій, ізолюваних з живильного середовища з Hg<sup>2+</sup>, за умов збереження

№ штаму	Вихідні значення	Через 6 місяців	Через 9 місяців	Через 12 місяців
126	0,10	0,05	0,050	0,025
195	0,10	0,05	0,020	0,020
200	0,10	0,10	0,100	0,100
58	0,10	0,05	0,030	0,030
59	0,10	0,01	0,010	0,010
23	0,10	0,05	0,025	0,020
26	0,10	0,05	0,020	0,020

Таким чином, найбільш резистентні до ртуті культури за умов збереження протягом 12 місяців, як і культури з фоновим рівнем резистентності, продемонстрували значне зменшення стійкості до іонів цього металу. Значення МІК ртуті, що збереглися на кінець досліду (0,01-0,10 ммоль·мл<sup>-1</sup>), були значно вищі, ніж ті, що виявляли бактерії групи з фоновим рівнем резистентності (0,001-0,005 ммоль·мл<sup>-1</sup>).

Дані, наведені у табл. 3, свідчать про те, що після висіву із морської води на живильні середовища з кадмієм бактерії здатні були рости при максимальній концентрації кадмію 1,0 ммоль в мл. Отже, МІК кадмію для цих культур, які можна розглядати як високо резистентні, значно вища, ніж для культур з фоновим значенням МІК 0,5 ммоль·мл<sup>-1</sup>. Як видно із табл. 3, за умов збереження протягом 12 місяців високо резистентні до кадмію бактерії також частково втрачають свою резистентність. Через 6 місяців збереження для семи культур із дев'яти досліджених значення МІК зменшились до 0,5 ммоль·мл<sup>-1</sup>. Через 9 місяців у семи культур, а через 12 місяців у трьох культур рівень резистентності продовжував знижуватись. Для більшості культур із групи резистентних бактерій значення МІК через 12 місяців збереження залишались набагато вищими, ніж для культур групи бактерій з фоновим рівнем стійкості.

Таблиця 3

МІК (ммоль·мл<sup>-1</sup>) Cd<sup>2+</sup> для морських бактерій, ізолюваних з живильного середовища з Cd<sup>2+</sup>, за умов збереження

№ штаму	Вихідні значення	Через 6 місяців	Через 9 місяців	Через 12 місяців
130	1,0	0,5	0,30	0,30
138	1,0	0,5	0,25	0,07
140	1,0	0,5	0,20	0,10
239	1,0	0,5	0,15	0,15
240	1,0	0,5	0,30	0,30
69	1,0	0,5	0,50	0,50
71	1,0	0,5	0,50	0,50
31	1,0	1,0	0,50	0,25
33	1,0	1,0	0,45	0,45

Цікаво відмітити, що максимальний рівень значень МІК свинцю ( $1,0-1,5 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ) для культур бактерій, ізольованих із живильного середовища, з високим вмістом цього металу (табл. 4), практично не відрізняється від значень МІК для культур з фоновим рівнем резистентності. Більше того, серед значень МІК свинцю для культур групи з фоновим рівнем стійкості виявлені значення, що перевищують МІК для культур групи резистентних бактерій ( $2,0 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ ).

Таблиця 4

МІК ( $\text{ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ )  $\text{Pb}^{2+}$  для морських бактерій, ізольованих з живильного середовища з  $\text{Pb}^{2+}$ , за умов збереження

№ штаму	Вихідні значення	Через 6 місяців	Через 9 місяців	Через 12 місяців
150	1,0	1,0	1,0	1,0
169	1,0	1,0	1,0	0,9
219	1,0	1,0	0,9	0,9
220	1,5	1,5	1,5	1,5
85	1,5	1,5	1,5	1,4
87	1,5	1,5	1,5	1,5
34	1,5	1,5	1,1	1,0
36	1,5	1,5	1,4	1,4
40	1,5	1,5	1,5	1,4

За умов збереження протягом 12 місяців культур бактерій, ізольованих із середовища з свинцем, рівень резистентності зменшився незначно, в той час як через 6 місяців він взагалі залишався незмінним. В кінці терміну дослідження значення МІК майже не відрізнялись від вихідних значень і коливались в діапазоні  $0,9-1,5 \text{ ммоль} \cdot \text{мл}^{-1}$ . Для визначення залежності значень МІК як показника стійкості від терміну збереження культур бактерій, ми скористалися методом лінійного регресійного аналізу. Результати цього аналізу у графічному зображенні наведені на рисунку 1.

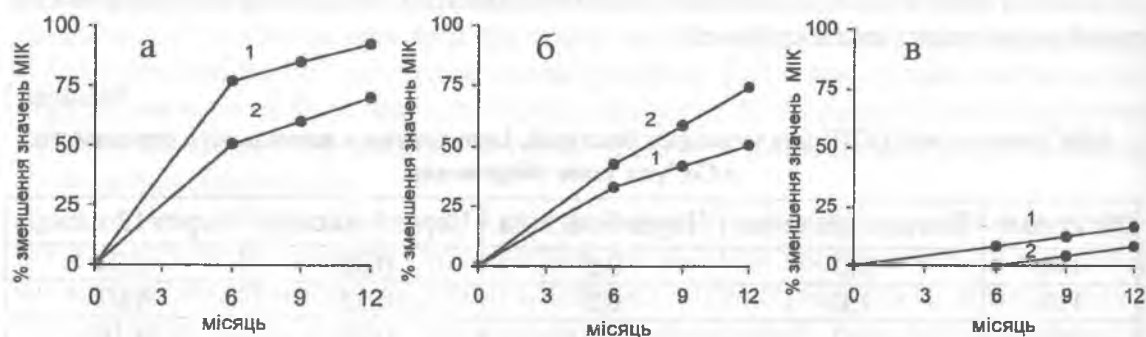


Рис 1. Динаміка зменшення (%) значень МІК  $\text{Hg}^{2+}$  (а),  $\text{Cd}^{2+}$  (б),  $\text{Pb}^{2+}$  (в) для морських бактерій за умов збереження: 1 — культури бактерій з фоновим рівнем стійкості, 2 — культури бактерій з високим рівнем стійкості.

Як видно, досліджувані культури бактерій з фоновим та високим рівнями стійкості за 12 місяців збереження значно втрачали резистентність до  $\text{Hg}^{2+}$  (відповідно на 70% та 92%) та до  $\text{Cd}^{2+}$  (на 50% та 74%). В протилежність цьому, стійкість до  $\text{Pb}^{2+}$  у бактерій протягом строку збереження зменшувалася максимум на 16%.

Таким чином, ізольовані із морської води гетеротрофні бактерії за умов довгострокового збереження їх на середовищах без домішок токсичних металів в значній мірі втрачають резистентність до  $Hg^{2+}$  і  $Cd^{2+}$ , в той час як стійкість до  $Pb^{2+}$  зменшується незначно.

## Література

1. Іваниця В. О. Стан та мінливість мікробних ценозів морських екосистем: Автореф. дис... д-ра біол. наук. — Одеса, 1995. — 48 с.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М.: Высш. Шк., 1990. — 352 с.
3. Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. — Москва: Мир, 1983. — Т. 3. — С. 56.
4. Тюрин Ю. Н., Макаров А. А. Анализ данных на компьютере. — М.: ИНФРА-М, Финансы и статистика, 1995. — 384 с.
5. Ivanitsa V. A., Buchtiyarov A. Ye. Resistance level to heavy metals of microbial coenoses of the Black Sea shoreface // Вісник Одеського державного університету. — 1999. — Т.5, вип. 1. — С. 204—208.
6. Gadd, G. M., Griffiths A. J. Microorganisms and heavy metal toxicity // Microbiol. Ecol. — 1978. — V. 4. — P. 303—317.
7. Osborn A. M., Bruce K. D., Strike P., Ritchie D. A. Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (*mer*) operon // FEMS Microbiology Reviews. — 1997. — V. 19. — P. 239—262.
8. Silver S., Phung L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises // Annu. Rev. Microbiol. — 1996. — V. 50. — P. 753-789.

**Іваниця В. А., Бухтияров А. Е.**

Одесский национальный университет, каф. микробиологии и вирусологии,  
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

### РЕЗИСТЕНТНОСТЬ МОРСКИХ ГЕТЕРОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ К ИОНАМ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В УСЛОВИЯХ ИХ ХРАНЕНИЯ

#### Резюме

Установлено, что уровень резистентности к  $Hg^{2+}$  и  $Cd^{2+}$  гетеротрофных морских бактерий, изолированных из прибрежных вод Одесского побережья, значительно (на 50-92%) уменьшается в условиях хранения в течение 12 месяцев. Уровень резистентности к  $Pb^{2+}$  в течение всего периода исследований изменился незначительно.

**Ключевые слова:** морские бактерии, хранение, резистентность,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$

**Ivanitsa V. A., Buchtiyarov A. Ye.**

Odessa National University, Department of Microbiology and Virology,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

### RESISTANCE OF MARINE HETEROTROPHIC BACTERIA TO HEAVY METALS IN CONDITIONS OF THEIR STORAGE

#### Summary

It is ascertained that the resistance level to  $Hg^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  of heterotrophic marine bacteria isolated from Odessa shoreface significantly (by 50-92%) decreases in conditions of storage during 12 months. Resistance level to  $Pb^{2+}$  has changed insignificantly during the entire period of investigation.

**Key words:** marine bacteria, storage, resistance,  $Hg^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ .