

УДК 579.695

Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Т. В. ВасильєваОдеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua**АКУМУЛЯЦІЯ Cu(II) МОРСЬКИМИ
НЕЙТРОФІЛЬНИМИ ТІОНОВИМИ БАКТЕРІЯМИ**

Мета: визначити здатність нейтрофільних тіонових бактерій вилучати йони Cu(II) з водних розчинів. **Методи.** Об'єктом дослідження була здатність морських тіонових бактерій, ізольованих з води Чорного моря в районі Одеської затоки до вилучення міді з водного розчину. Для дослідження метал-аккумуляційної активності тіонових бактерій, відбирали штами, які були резистентними до міді на рівні 0,01–0,02 М. Початкова концентрація Cu(II) у водному розчині становила 1 мМ. Термін культивування мікроорганізмів у водному розчині, що містить мідь становив 10 діб. Залишковий вміст Cu(II) у водному розчині визначали атомно-абсорбційним методом на приладах ААС-1 (Німеччина) і С-115ПК Selmi (Україна) при довжині хвилі 324,7 нм для Cu . Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Ст'юдента з вірогідністю $p < 0,05$. **Результати.** Встановлено, що тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря, здатні до акумуляції міді з водних розчинів. Cu -аккумуляційна активність залежить від тривалості взаємодії між мікроорганізмами і розчином. Максимальний рівень вилучення Cu(II) – 89,24% з водного розчину реєстрували на 10 добу культивування при використанні штаму *Thiobacillus* sp. DKZ_4. На сьому добу культивування вилучення Cu(II) з водного розчину при використанні штаму *Thiobacillus* sp. DKZ_2 досягало 85,25%. Показано, що рівень резистентності до міді, який був визначений раніше, не корелює зі здатністю бактерій акумулювати мідь. **Висновки.** Нейтрофільні тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря, здатні до акумуляції Cu(II) з водного розчину в межах від 22,83% до 89,24% і тому вони можуть бути перспективними для розробки біосорбційної технології. Здатність до Cu -аккумуляційної активності залежить від штаму та не залежить від МІК.

Ключові слова: нейтрофільні тіонові бактерії, очищення води, Cu(II) .

Сучасні біосорбційні технології спрямовані на очищення навколишнього середовища від йонів важких металів і здебільшого базуються на здатності мікроорганізмів зв'язувати, видаляти і накопичувати метали. Причому кожне перетворення включає в себе, безліч різних процесів (сорбції, десорбції, комплексоутворення, реакції окиснення-відновлення і біоаккумуляції). В подібних технологіях застосовується біомаса, що містить мертві або живі, активно метаболізувальні мікроорганізми та широкий діапазон тимчасових змінних навколишнього середовища і біологічних факторів (рН, Eh, розчи-



нений O_2 , органічні та неорганічні ліганди, катіони інших металів і мікробна активність та тощо). При використанні живих мікроорганізмів може здійснюватися активна і пасивна сорбція, тобто акумуляція і біосорбція. Акумуляція має складніший механізм, бо в цьому випадку задіяні метаболічні процеси, які підтримують життєзабезпечення мікроорганізму і часто безпосередньо пов'язані зі специфічними механізмами резистентності. До таких специфічних механізмів відносять внутрішньоклітинне і позаклітинне секвестрування, властиве багатьом мікроорганізмам і найбільш докладно вивчене на прикладі бактерій родів *Pseudomonas*, *Rhizobium* та *Escherichia*, *Bacillus* [6, 14, 9].

Проведене дослідження безпосередньо стосується проблеми, яка пов'язана з розробкою нових біотехнологічних підходів відносно завдання очищення стічних вод від важких металів. Мотивацією для відбору саме міді і нейтрофільних тіонових бактерій слугувало декілька причин. По-перше, серед безлічі важких металів, що знаходяться в навколишньому середовищі мідь є одним з найбільш цікавих металів бо мідь відноситься до речовин з високим ступенем токсичності, відповідно до шкали Ейхгорна, яка відображає взаємодії металів з азотистими гетероциклічними основами ДНК ($Cu^{2+} > Cd^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$), тобто є гостро токсичною для більшості прісноводних і морських мікроорганізмів, безхребетних, а також для водних рослин [5, 8].

По-друге, у сучасній біотехнології найчастіше використовуються ацидофільні тіонові бактерії, які беруть участь у біовилуговуванні металів з відвалів різного походження. Практичне використання нейтрофільних тіонових бактерій практично не зустрічається. Однак, на нашу думку є можливість використовувати саме нейтрофільні форми тіонових бактерій у біотехнології особливо в галузі очистки вод від важких металів.

По-третє, бактерії, які виділені з морського середовища, пристосовані до несприятливих умов, і, як наслідок, мають комплекс специфічних адаптацій, в тому числі, і резистентність до дії важких металів [7].

Крім того, питання розробки нових технологій і створення нових мікробних біопрепаратів для вирішення проблем забруднення навколишнього середовища, є особливо важливим у зв'язку з посиленням законів з охорони навколишнього середовища. Вимоги, що пред'являються до якості води, спонукають до вдосконалення, а також розробки нових, більш ефективних методів очищення стічних вод від металів. Біологічні методи у порівнянні з існуючими хімічними і фізичними методами очищення знаходять все більше застосування для вилучення металів з промислових, а також побутових стічних вод бо характеризуються достатньою простотою і ефективністю [7].

Тому метою дослідження було визначити здатність нейтрофільних тіонових бактерій вилучати йони Cu(II) з водних розчинів.

Матеріали та методи

Об'єктом дослідження були морські тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря в районі Одеської затоки. Проби морської води відбирали з двох територіальних зон: Біологічна станція ОНУ імені І. І. Мечникова та району Дачі Ковалевського. На кожній локації окремо були відібрані дві точки: мор-



ська вода (глибина забору проби 10–15 см від поверхні), та вода з зони заплеску – супралітораль (1,5 м від кінця морської хвилі та на глибині 60–70 см.).

Попереднє виділення та культивування ізолюваних штамів тіонових бактерій здійснювали на агаризованому середовищі Бейеринка (г/л), яке вважається універсальним для виділення нейтрофільних тіонових бактерій [3]: $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – 5,0 г; NaHCO_3 – 1,0; Na_2HPO_4 – 0,2; MgCl_2 – 0,1; NH_4Cl_2 – 0,1; вода дистильована – 1,0 л; рН 7,0.

Середовище готували на морській воді. Наявність росту спостерігали протягом 7–14 діб.

Визначення приналежності ізолюваних мікроорганізмів до тіонових бактерій здійснювали, орієнтуючись на морфологічні, культуральні та біохімічні ознаки, наведені у визначнику Бергі. Морфологію клітин вивчали за допомогою світлового мікроскопу у різний термін культивування (1, 3, 7 та 10 діб); визначали форму клітин, рухливість, відношення клітин бактерій до забарвлення по Граму.

Для дослідження метал-акумуляовальної активності тіонових бактерій відбирали штами, які були резистентними до міді на рівні 0,01–0,02 М (табл. 1).

Таблиця 1

Райони виділення штамів тіонових бактерій та показники мінімальних інгібувальних концентрацій для них (МІК)

Table 1

The isolation place and index of minimum inhibitory concentration (MIC) of sulfur-oxidizing bacteria

Місце виділення	Назва штаму	МІК (мінімальна інгібувальна концентрація) міді
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М



Початковим розчином для дослідів слугувало рідке середовище Бейєринка з додаванням 0,02% дріжджового екстракту (створення міксотрофних умов) і 1 мМ $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Для кожного окремого штаму використовували флакон об'ємом 250 мл, в який додавали 100 мл початкового розчину і один мл бактеріальної суспензії (концентрація клітин становила 1×10^8 КУО/мл).

За контроль слугувало рідке середовище Бейєринка з додаванням 0,02% дріжджового екстракту, 1,0 мМ $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ без додавання мікроорганізмів. Дослідні та контрольні варіанти витримували в термостаті при температурі $30 \pm 0,5^\circ\text{C}$ протягом десяти діб. Дослід проводили в трьох повторях.

Оцінку метал-акумулювальної активності тіонових бактерій здійснювали за ступенем очищення розчину води від йонів міді:

$$\alpha = [(C_0 - C)/C_0] \times 100\%,$$

де C_0 і C – концентрації політанта до та після обробки [1, 2].

Аналіз розчинів на залишковий вміст міді здійснювали із застосуванням атомно-абсорбційної спектроскопії на приладах ААС-1 (Німеччина) і С-115ПК Selmi (Україна) при довжині хвилі 324,7 нм для Cu [1].

Для того, щоб визначити залишковий вміст міді у розчині, бактеріальні клітини відділяли осаджуванням шляхом центрифугування при 10 000 об/хв протягом 5 хв.

Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стюдента з вірогідністю $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення

При дослідженні резистентності тіонових бактерій до міді помітили, що деякі штами при високих концентраціях формують колонії насиченого синього кольору (рис. 1), що може бути показником здатності до акумуляції йонів міді клітинами бактерій.

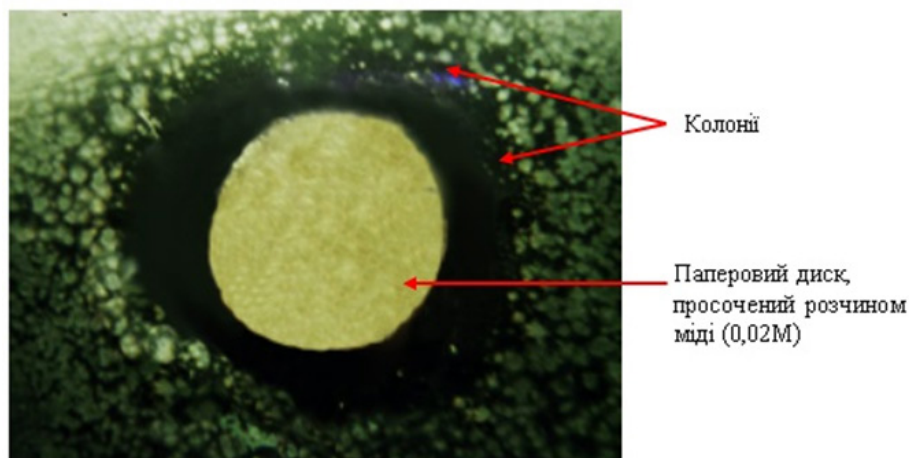


Рис. 1. Морфологічні особливості колоній тіонових бактерій за присутності йонів міді ($\times 4$)

Fig. 1. Morphological features of some colonies of sulfur-oxidizing bacteria in presence of copper ions ($\times 4$)

Слід відмітити, що мідь відноситься до металів так названої "комбінованої дії". Йон міді (II) є високопотенційним металом-окиснювачем, який також здатний до заміщення металів в активних центрах ензимів [4], що служать ко-фактором для багатьох ензимів, включаючи термінальні оксидази, монооксигенази, діоксигенази і супероксиддисмутази. Однак, надмірна концентрація йонів міді спричиняє токсичний вплив на живі організми [1, 6, 4, 14, 16].

При проведенні дослідження було показано, що на першу добу метал-акумулювальну активність штамів тіонових бактерій, ізольованих з морської води і зони заплеску майже не спостерігали (табл. 2). Штами *Thiobacillus sp.* BSZ_1, *Thiobacillus sp.* BSZ_3, *Thiobacillus sp.* BSZ_5 акумулювали з розчину від 10,56 до 17,95% йонів міді (табл. 2). Для штамів, ізольованих з зони заплеску біля Дачі Ковалевського (*Thiobacillus sp.* DKZ_2, *Thiobacillus sp.* DKZ_3), показник акумуляції міді не відрізнявся. Метал-акумулювальна активність штаму *Thiobacillus sp.* DKZ_4 на першу добу була практично нульовою (табл. 2).

Найбільша здатність вилучати мідь (33,97 і 44,71%) показана для штамів *Thiobacillus sp.* BSS_4 і *Thiobacillus sp.* BSS_5, які були ізольовані з морської води в районі Біологічної станції ОНУ (табл. 2).

Таблиця 2

Ступінь вилучення $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ при початковій концентрації 1,0 мМ на першу добу дослідження

Table 2

Degree of biological purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ with initial concentration of 1.0 mM for the first day of the study

Місце виділення	Назва штаму	МІК міді	Акумуляція міді	
			Абсолютне значення (мг/дм ³)	% вилучення
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М	51,75±1,20	17,95
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М	54,26±1,25	13,97
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М	56,41±3,51	10,56
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М	56,52±1,31	10,39
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М	53,70±1,24	14,87
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М	62,97±1,46	0,16
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М	41,65±0,96	33,97
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М	34,87±0,81	44,71
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М	56,92±1,32	9,75
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М	54,01±1,25	14,36
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М	58,34±1,35	7,50
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М	57,89±1,34	8,22
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М	51,75±1,33	8,69



На сьому добу спостереження було відмічено суттєве зменшення кількості міді у розчині. Найбільша метал-акумулювальна активність відзначена для штамів з зони заплеску в районі Дачі Ковалевського і морської води біля Біологічної станції ОНУ. Ступінь вилучення міді з розчину досягала 75,19–85,25% для штамів *Thiobacillus sp.* DKZ_2, *Thiobacillus sp.* DKZ_3, *Thiobacillus sp.* DKZ_4 і 63,48–77,89% для штамів *Thiobacillus sp.* BSS_5, *Thiobacillus sp.* BSS_6, *Thiobacillus sp.* BSS_8 (табл. 3).

Таблиця 3

Ступінь біологічного очищення водного розчину від $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ при початковій концентрації 1,0 мМ на сьому добу дослідження

Table 3

Degree of biological purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ with initial concentration of 1.0 mM on the seventh day of the study

Місце виділення	Назва штаму	МІК міді	Акумуляція міді	
			Абсолютне значення (мг/дм ³)	% вилучення
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М	46,63±1,08	26,56
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М	41,6±0,96	34,49
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М	38,14±0,88	39,94
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М	9,37±0,22	85,25
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М	14,01±0,32	77,93
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М	15,75±0,36	75,19
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М	32,66±0,75	48,57
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М	23,22±0,54	63,43
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М	23,06±0,53	63,68
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М	14,03±0,32	77,89
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М	41,42±0,96	34,77
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М	49,01±1,13	22,83
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М	39,96±0,92	37,07

На десяту добу спостереження майже в усіх дослідах спостерігали значне зниження залишкового вмісту йонів міді у розчині. Максимальний рівень вилучення міді досягав 89,24% (штам *Thiobacillus sp.* DKZ_4). Штами *Thiobacillus sp.* BSS_4, *Thiobacillus sp.* BSS_5 і *Thiobacillus sp.* BSS_6 також демонстрували рівень очищення розчину від йонів міді на рівні 85,6–88,42% (табл. 4). Саме ці штами, ізолювані з морської води в районі Біологічної станції ОНУ, демонстрували максимальну активність з самого початку експерименту (табл. 2).

Високий ступінь вилучення міді з розчину реєстрували для штамів *Thiobacillus sp.* DKS_2 і *Thiobacillus sp.* DKS_3, ізолюваних з морської води біля Дачі Ковалевського (87,27–88,97%) (табл. 4).



Таблиця 4

Ступінь вилучення $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ при початковій концентрації
1,0 мМ на десяту добу дослідження

Table 4

Degree of biological purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ with initial
concentration of 1.0 mM on the tenth day of the study

Місце виділення	Назва штаму	МІК міді	Акумуляція міді	
			Абсолютне значення (мг/дм ³)	% вилучення
Зона заплеску в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_1	0,01 М	22,29±0,53	6,17
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_3	0,02 М	24,01±0,57	61,41
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSZ_5	0,02 М	9,61±0,21	84,55
Зона заплеску в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_2	0,02 М	11,35±0,26	82,00
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_3	0,02 М	11,59±0,27	81,62
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKZ_4	0,02 М	6,78±0,16	89,24
Морська вода в районі Біологічної станції ОНУ	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_4	0,01 М	8,95±0,21	85,60
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_5	0,02 М	8,02±0,19	87,12
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_6	0,02 М	7,17±0,17	88,42
	<i>Thiobacillus sp.</i> BSS_8	0,01 М	6,89±0,16	89,07
Морська вода в районі Дачі Ковалевського	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_2	0,01 М	46,43±1,07	26,37
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_3	0,02 М	6,95±0,16	88,97
	<i>Thiobacillus sp.</i> DKS_4	0,01 М	8,03±0,19	87,27

Узагальнені результати дослідження наведено на рисунку 2, з якого наочно видно, що найбільш перспективним штамом є *Thiobacillus sp.* DKZ_4, який демонстрував максимальний рівень вилучення міді – 89,24% (табл. 4).

Також, досить цікавим для розробки нової біосорбційної біотехнології є штам *Thiobacillus sp.* DKZ_2, для якого зареєстрували 85,25% вилучення йонів міді на сьому добу (табл. 3, рис. 2).

Отримані під час проведення дослідження мікроскопічні препарати (рис. 3), наочно демонструють, що форма клітин під дією міді змінюється. Якщо спочатку мікроорганізми виглядали як звичайні грам-негативні палички, то наприкінці досліду вони збільшуються, набувають округлої форми і більшість з них стають забарвленими в синій, блакитний або зеленої колір (рис. 3).

Як відомо, системами гомеостазу транспорту металів у бактеріальній клітині є ефлюкс-системи. Резистентність до міді також залежить від подібної системи транспорту, яка регулюється вмістом йонів міді, її позаклітинної біодоступності і внутрішньоклітинної потреби в металі. Найбільш дослідженими шляхами у бактерій, що відповідають за стійкість до Cu^{2+} , є активний відтік йонів цього металу з цитоплазми в периплазму, що регулюється АТФазами, системою відтоку Cus і шаперонами міді [10, 11, 12, 15, 17].



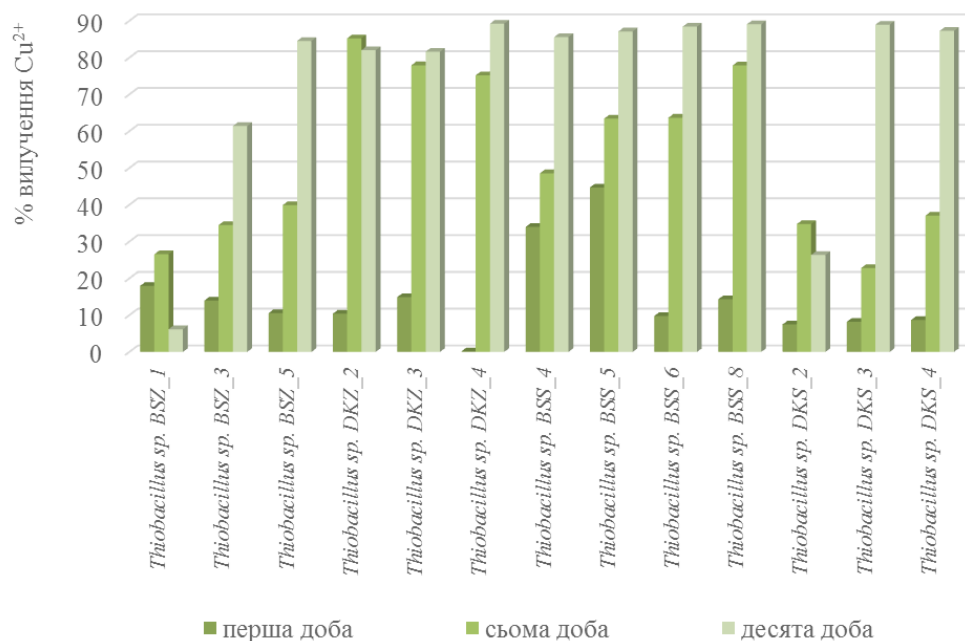


Рис. 2. Метал-акумулювальна активність тіонових бактерій Чорного моря за ступенем очищення водного розчину від $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ під час проведення дослідження [$t_{st(1\text{доба}-7\text{доба})} = 5,49$, при $p = 2,911\text{e-}05$; $t_{st(1\text{доба}-10\text{доба})} = 7,12$, при $p = 1,72\text{e-}06$; $t_{st(7\text{доба}-10\text{доба})} = 2,165$, при $p = 0,04085$ у порівнянні з $t_{tab} = 2,17$ при $p = 0,05$]

Fig. 2. Metal-accumulating activity of sulfur-oxidizing bacteria of the Black Sea according to the degree of purification of aqueous solution from $\text{CuSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ during the study [$t_{st(1\text{day}-7\text{day})} = 5.49$, at $p = 2.911\text{e-}05$; $t_{st(1\text{day}-10\text{day})} = 7.12$ at $p = 1.72\text{e-}06$; $t_{st(7\text{day}-10\text{day})} = 2.165$, at $p = 0.04085$ in comparison with $t_{tab} = 2.17$ at $p = 0.05$]

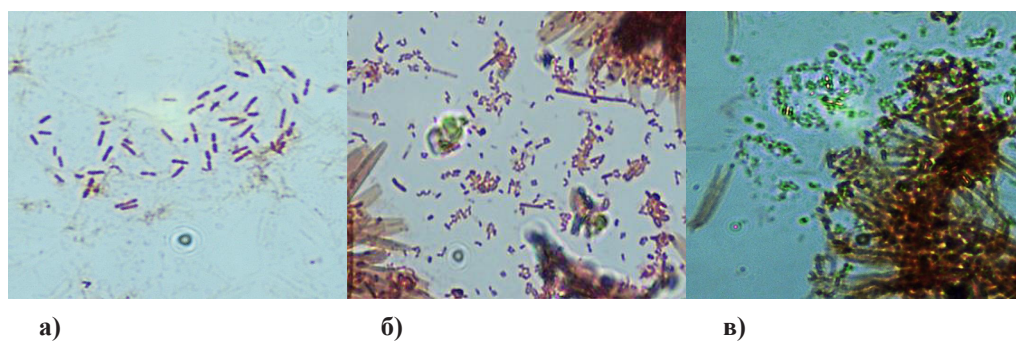


Рис. 3. Мікроскопічні препарати досліджених штамів (на прикладі штаму *Thiobacillus* sp. DKZ_4) протягом першої доби культивування (а), п'ятої доби (б) і десятої доби (в) ($\times 1500$)

Fig. 3. Microscopic preparations of the studied strains (using the example of a strain of *Thiobacillus* sp. DKZ_4) during the first day of cultivation (a), the fifth day (б) and the tenth day (в) ($\times 1500$)

Також відомо, що мікроорганізми здатні утримувати йони міді у периплазмі при активації систем гомеостазу, подібних до системи CopABCD. Взагалі подібна система резистентності та транспорту міді забезпечується чотирма структурними білками, а саме білком внутрішньої мембрани CopD, білком зовнішньої мембрани CopB і двома переплазматичними білками CopA і CopC. Білки CopB, CopA, CopC зв'язують йони Cu^{2+} на зовнішній мембрані або в периплазматичному просторі, надаючи тим самим колоніям блакитного забарвлення. Таким чином, така система резистентності створює в периплазматичному просторі сховище знешкодженої міді [4, 6, 8, 13, 14, 16, 18].

Орієнтуючись на дані літератури можна припустити, що резистентні до міді тіонові бактерії, ізольовані з поверхневих вод Чорного моря, мають саме систему гомеостазу CopABCD і, відповідно здатні до акумуляції міді у периплазматичному просторі, що і пояснює забарвлення клітин на мікроскопічних препаратах.

Таким чином, після проведення експерименту тривалістю в 10 діб можна констатувати, що тіонові бактерії, ізольовані з води Чорного моря, здатні до акумуляції йонів металів з водних розчинів, а Cu -акумулювальна активність залежить від тривалості взаємодії між мікроорганізмами і розчином. Якщо на першу добу акумуляція майже не спостерігається, то на десяту добу вилучення міді з розчину досягало майже дев'яноста відсотків.

Показано, що рівень резистентності до йонів міді, який був визначений раніше, не корелює зі здатністю бактерій акумулювати мідь.

Штам *Thiobacillus sp.* DKZ_4 та штам *Thiobacillus sp.* DKZ_2 демонстрували максимальну здатність (89,24% 85,25%, відповідно) до вилучення йонів міді з водного розчину.

Отримані результати можуть бути використані для розробки нової біосорбційної біотехнології спрямованої на вилучення металів з водних розчинів.

Н. Ю. Васильєва, Л. І. Слюсаренко, Т. В. Васильєва

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

АККУМУЛЯЦИЯ Cu(II) МОРСКИМИ НЕЙТРОФИЛЬНЫМИ ТИОНОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Реферат

Цель: определить способность нейтрофильных тионовых бактерий извлекать ионы Cu(II) из водных растворов. **Методы.** Объектом исследования была способность морских тионовых бактерий, изолированных из воды Черного моря в районе Одесской бухты к извлечению меди из водного раствора. Для исследования металл-аккумулирующей активности тионовых бактерий, отбирали штаммы, которые были резистентными к меди на уровне 0,01–0,02 моль/л. Начальная концентрация Cu(II) в водном растворе составляла 1 мМ. Срок культивирования микроорганизмов в водном растворе, содержащем медь составлял 10 суток. Остаточное содержание Cu(II) в водном растворе определяли атомно-абсорбционным методом на приборах



AAS-1 (Германия) и C-115ПК Selmi (Украина) при длине волны 324,7 нм для Cu. Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента с вероятностью $p < 0,05$. **Результаты.** Установлено, что тионовые бактерии, изолированные из воды Черного моря, способные к аккумуляции тяжелых металлов из водных растворов, а Cu-аккумулирующая активность зависит от продолжительности взаимодействия между микроорганизмами и раствором. Максимальный уровень изъятия Cu(II) – 89,24% из водного раствора регистрировали на 10 сутки культивирования при использовании штамма *Thiobacillus* sp. DKZ_4. На седьмые сутки культивирования извлечение Cu (II) из водного раствора при использовании штамма *Thiobacillus* sp. DKZ_2 достигало 85,25%. Было показано, что уровень резистентности к меди, который был определен ранее, не влиял на способность бактерий аккумулировать медь. **Выводы.** Нейтрофильные тионовые бактерии, изолированные из воды Черного моря способны к извлечению из водного раствора от 22,83% до 89,24% Cu(II) и поэтому их можно использовать для разработки биосорбционной биотехнологии особенно в области очистки вод от тяжелых металлов. Способность к аккумуляции Cu зависит от штамма, но не зависит от МПК.

Ключевые слова: нейтрофильные тионовые бактерии, очистка воды, Cu(II).

N. Yu. Vasylieva, L. I. Sliusarenko, T. V. Vasylieva

Odesa National I. I. Mechnykov University,
2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine,
tel : +38 (0482) 63 51 63, e-mail:tatkamic@onu.edu.ua

CU (II) ACCUMULATION BY MARINE NEUTROPHIL SULFUR-OXIDIZING BACTERIA

Summary

Aim: to determine the ability of neutrophilic sulfur-oxidizing bacteria to extract Cu (II) ions from aqueous solutions. **Methods.** The object of the study was the ability of marine sulfur-oxidizing bacteria isolated from the water of the Black Sea near the Odessa Bay to extract copper from aqueous solution. To study the metal-accumulating activity of sulfur-oxidizing bacteria, we have selected strains that were resistant to copper at the level of 0.01–0.02 mol/l. The initial concentration of Cu (II) in aqueous solution was 1 mM. The period of cultivation of microorganisms in aqueous solution containing copper was 10 days. The residual content of Cu (II) in aqueous solution was determined by the atomic absorption method on AAS-1 devices (Germany) and C-115PC Selmi (Ukraine) at the wavelength of 324.7 nm for Cu. The reliability of the results obtained was assessed on the Student's criterion with probability of $p < 0.05$. **Results.** It was established that sulfur-oxidizing bacteria isolated from the water of the Black Sea capable of accumulating heavy metals from aqueous solutions, and Cu-accumulating activity depends on the duration of the interaction between microorganisms and solution. The maximum level of extraction of Cu (II) from aqueous solution was equal 89.24% was recorded on the 10th day of cultivation using a strain of *Thiobacillus* sp. DKZ 4. On the seventh day of cultivation, the extraction of Cu (II) from aqueous solution with using a strain of *Thiobacillus* sp. DKZ_2 reached 85.25%.



*It was shown that the level of resistance to copper, which had been previously defined, did not affect the ability of bacteria to accumulate copper. **Conclusions.** Neutral sulfur-oxidizing bacteria isolated from the water of the Black Sea are capable of extracting from aqueous solution from 22.83% to 89.24% of Cu (II) and therefore they can be used to develop biosorption biotechnology especially in the field of water purification from heavy metals. The ability to accumulate Cu depends on the strain, but does not depend on MIC.*

Key words: neutrophilic sulfur-oxidizing bacteria, water purification, Cu (II).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Горшкова О. Г., Гудзенко Т. В., Волювач О. В., Беляева Т. О., Конуп І. П. Вилучення Cu(II) з водних розчинів іммобілізованими клітинами бактерій роду *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2017. – № 3. – С. 66–74.
2. Іваниця В. А., Бухтияров А. Е., Лисютин Г. В., Захарія А. Н., Гудзенко Т. В. Аккумуляция тяжелых металлов бактериями рода *Pseudomonas* // Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4. – С. 76–83.
3. Каравайко Г. И., Дубинина Г. А., Кондратьева Т. Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. – 2006. – Т. 75, № 5. – С. 593–629
4. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісн. Львів. ун-ту. ім. І. Франка. Сер. біол. – 2007. – Вип. 45. – С. 3–28
5. Помогайло А. Д. Макромолекулярные металлохелаты / А. Д. Помогайло, И. Е. Уфлянд. – М.: Химия, 1991. – 304 с.
6. Таширеву А. Б. Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами // Мікробіологічний журнал. – 1994. – № 6. – С. 89–97.
7. Таширеву А. Б., Романовская В. А., Сиома И. А. и др. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} // Доповіді Національної Академії наук України. – 2008. – № 1. – С. 169–176.
8. Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Мікробіологічний журнал. – 2009. – Т. 71, № 5. – С. 54–65.
9. González A. G., Shirokova L. S., Pokrovsky O. S et al. Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: protective role of surface exopolysaccharides. // J Colloid Interf Sci. – 2010. – Vol. 350. – P. 305–314.
10. González-Guerrero M., Raimunda D., Cheng X., Argüello J. M. Distinct functional roles of homologous Cu^+ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. // Mol Microbiol. – 2010. – Vol. 78. – P. 1246–1258.
11. Bondarczuk K., Piotrowska-Seget Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria // Cell Biol Toxicol. – 2013. – Vol. 2. – P. 397–405
12. Martínez-Bussenius C., Navarro C. A., Orellana L., Paradela A., Jerez C. A. Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to



high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach // Journal of Proteomics. – 2016. – Vol. 145. – P. 37–45.

13. Nies D. H. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli* // Journal of Bacteriology. – 1995. – Vol. 177. – P. 2707–2712.

14. Nies H. D. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. 27, No 2–3. – P. 313–339.

15. Outten F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O'Halloran T. V. The independent Cue and Cus system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. // J. Biol. Chem. – 2001. – Vol. – 276. – P. 30670–30677.

16. Puig S., Rees E. M., Thiele D. J. The ABCDs of periplasmic copper trafficking // Structure. – 2002. – Vol. 10. – P. 1292–1295.

17. Rensing C., Grass G. *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. – 27. – P. 197–213

18. Rensing C., Fan B., Sharma R., Mitra B., Rosen B. P. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – Vol. 97. – P. 652–656

References

1. Gorshkova OG, Gudzenko TV, Voliuvach OV, Beliaeva TO, Konup IP. Isolation of Cu(II) from aqueous solutions by immobilized bacterial cells of the genus *Pseudomonas*. Microbiology and Biotechnology. 2017.3: 66–74. (in Ukrainian)

2. Ivanytsia VO, Bukhtiyarov AE, Lisyutin GV, Zacharya OM, Gudzenko TV. Accumulation of heavy metals by bacteria of genus *Pseudomonas*. Microbiology and Biotechnology. 2012.3: 76–83. (in Russian)

3. Karavaiko HY, Dubynyna HA, Kondrateva TF. Lithotrophic microorganisms of oxidative cycles of sulfur and iron. Microbiology. 2006. 75(5):593–629. (in Russian)

4. Kushkevych IV, Hnatysh SO, Gudz SP Influence of heavy metals on microbial cells. Visnyk of L'viv University. Biological Series. 2007.45:3–28 (in Ukrainian)

5. Pomogailo AD, Ufliand IE. Macromolecular metal chelates. M.: Chemistry, 1991. 304 p. (in Russian)

6. Tashyrev AB. Theoretical aspects of microbial interactions with metals. Reduction transformation of metals. Mikrobiol. zhurn. 1994.56(6):76–88. (in Russian)

7. Tashyrev AB, Romanovskaia VA, Sioma IB, Usenko VP. Antarctic microorganisms resistant to high concentrations of Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} . Doklady Natsionalnoi Akademii nauk Ukrainy. 2008.1:169–176. (in Russian)

8. Ianieva OD. Mechanisms of bacteria resistance to heavy metals. Mikrobiol. zhurn. 2009.71(6):54–65. (in Russian)

9. González AG., Shirokova LS., Pokrovsky OS et al. Adsorption of copper on *Pseudomonas aureofaciens*: protective role of surface exopolysaccharides. J Colloid Interf Sci. 2010. 350:305–314.

10. González-Guerrero M, Raimunda D, Cheng X, Argüello JM. Distinct



functional roles of homologous Cu⁺ efflux ATPases in *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol. 2010. 78:1246–1258.

11. Bondarczuk K, Piotrowska-Seget Z. Molecular basis of active copper resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. Cell Biol Toxicol. 2013.2:397–405

12. Martínez-Bussenius C., Navarro C. A., Orellana L., Paradela A., Jerez C. A. Global response of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 to high concentrations of copper: A quantitative proteomics approach. Journal of Proteomics. 2016.145: 37-45.

13. Nies DH. The cobalt, zinc, and cadmium efflux system CzcABC from *Alcaligenes eutrophus* functions as a cation-proton antiporter in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1995.177: 2707–2712.

14. Nies HD. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiol. Rev. 2003.27(2–3):313–339.

15. Outten FW, Huffman DL, Hale JA, Ohalloran TV. The independent Cue and Cus system confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 2001.276:30670–30677.

16. Puig S, Rees EM, Thiele DJ. The ABCDs of periplasmic copper trafficking. Structure. 2002.10:1292–1295.

17. Rensing C, Grass G. *Escherichia coli* mechanism of copper homeostasis in a changing environment. FEMS Microbiol. Rev. 2003. 27: 197–213

18. Rensing C, Fan B, Sharma., Mitra B, Rosen BP. CopA: an *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. 97: 652–656.

Стаття надійшла до редакції 08.04.2019 р.

