

УДК 579.6:546.3

**И. А. Блайда, Т. В. Васильева, Л. И. Слюсаренко,
Н. Ю. Васильева**

Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина
e-mail: iblayda@ukr.net

УСТОЙЧИВОСТЬ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ АЦИДОФИЛЬНЫХ ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТЕХНОГЕННОГО СЫРЬЯ

Цель. Определение устойчивости к ионам тяжелых металлов ацидофильных хемолитотрофных бактерий, изолированных из отвальных пород топливно-энергетического комплекса Украины. **Методы.** Бактерии культивировали на агаризованной среде Сильвермана-Лундгрема 9К в присутствии ионов меди, цинка, никеля, кобальта и кадмия в диапазоне концентраций 0,5–12,0 г/дм³ с интервалом 0,5 г/дм³, в присутствии ионов свинца в диапазоне 0,25–1,50 г/дм³ с интервалом 0,05 г/дм³. Мезофильные бактерии культивировали при 35,0±0,2 °С, умеренно термофильные – при 50,0±0,2 °С в течение семи суток. Учет результатов осуществляли визуально. **Результаты.** Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне резистентности изолированных штаммов бактерий родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus* к различным ионам тяжелых металлов. Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) металлов для изученных штаммов в несколько раз превышали их содержание в отвальных породах топливно-энергетического комплекса. Установлен ряд токсичности ионов металлов по отношению к выделенным бактериям: наиболее токсичным оказался Pb^{2+} (МИК для всех штаммов находилась в диапазоне 0,35–0,70 г/дм³), наименее токсичным – Cu^{2+} (МИК достигала 11,5 г/дм³). Определен ряд устойчивости изолированных штаммов ацидофильных хемолитотрофных бактерий родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus* по отношению к ионам токсичных металлов. Максимальной устойчивостью обладали штаммы, изолированные из отходов обогащения углей, минимальной – штаммы, изолированные из отходов сжигания углей. **Выводы.** Выделенные из техногенного сырья ацидофильные хемолитотрофные бактерии относятся к полирезистентным, так как они проявили высокий уровень устойчивости к широкому кругу ионов тяжелых металлов в широком диапазоне концентраций. Резистентность штаммов зависит от их индивидуальных особенностей и источников выделения. Выявлены межвидовые и внутривидовые различия штаммов по их резистентности, что может быть связано с различными факторами физиологического и генетического характера.

Ключевые слова: ацидофильные хемолитотрофные бактерии, резистентность, ионы тяжелых металлов.



Тяжелые металлы являются важной составляющей частью породы земной коры, постоянно присутствуют в биосфере, трансформируются, не подвергаются деградации, мигрируют по трофическим цепям и имеют тенденцию к накоплению в живых организмах. Металлы поступают в окружающую среду естественным путем как результат геохимических и природных процессов, так и антропогенным в результате деятельности предприятий добывающей и перерабатывающей промышленности, транспорта и др. [1, 2, 5]. Контроль за содержанием токсичных элементов в окружающей среде регламентируется понятием «предельно-допустимая концентрация» (ПДК), однако повсеместно, особенно в зонах активной промышленной деятельности, их содержание превышает значения ПДК в десятки и сотни раз. В высоких концентрациях металлы вызывают изменения в природных микробиоценозах, приводя к обеднению их состава и возникновению устойчивых форм. Влияние металлов на микроорганизмы зависит от многих факторов – вида микроорганизма, формы нахождения и концентрации металлов, физико-химических факторов окружающей среды [2, 12, 14]. Устойчивость к тяжелым металлам является важным физиологическим свойством, особенно когда речь идет об использовании микроорганизмов для переработки техногенного полиметаллического сырья.

В настоящее время имеется достаточно обширный материал, касающийся устойчивости к металлам различных групп микроорганизмов, в первую очередь *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Alcaligenes eutrophus*, *Rhodotorula glutinis*. Отечественными исследователями обнаружены устойчивые к металлам штаммы гетеротрофных микроорганизмов как в природных, так и в техногенных экологических нишах. В частности, получены результаты по выделению резистентных штаммов и микробных сообществ из стабильных природных экологических ниш – глин карстовых полостей украинского Подолья и Кавказа, а также природных ниш с экстремальными физико-химическими условиями – почв и фитоценозов Антарктики [3, 4].

Данные о резистентности ацидофильных хемолитотрофных бактерий (АХБ) немногочисленны и касаются в основном штаммов, изолированных из природных источников [11, 13, 17]. В то же время АХБ, входящие в состав сформированного микробного ценоза в техногенном сырье с повышенными концентрациями тяжелых металлов, ожидаемо должны быть высокорезистентными. Однако данные об этом в литературе ограничены.

Целью работы было определение устойчивости к ионам тяжелых металлов ацидофильных хемолитотрофных бактерий, изолированных из микробиоценоза отвальных продуктов топливно-энергетического комплекса (ТЭК) Украины.

Материалы и методы исследований

Исследования проводили с ацидофильными хемолитотрофными мезофильными и умеренно термофильными штаммами (табл. 1), выделенными из микробиоценоза отвальных продуктов ТЭК Украины: породных отвалов углеобогащения центральной обогатительной фабрики (ЦОФ) «Червоноградская» Львовско-Волынского угольного бассейна (ЛВУБ) различного срока накопления (24–28 месяцев – черного цвета и хранящиеся более 60 месяцев



– красного), золошлаков и золы уноса после сжигания угля соответственно на Добротворской и Ладыженской теплоэлектростанциях (ТЭС). Свойства штаммов описаны в предыдущей работе [10].

Таблица 1

Штаммы ацидофильных хемолитотрофных бактерий, выделенных из отвальных продуктов ТЭК

Table 1

Strains of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from dumps by fuel-energy complex

| Штамм | Источник выделения |
|---|--------------------------------------|
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv red 9 | Красная порода ЦОФ «Червоноградская» |
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv black 37 | Черная порода ЦОФ «Червоноградская» |
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DTV 1 | Золошлак Добротворской ТЭС |
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 5 | Зола уноса Ладыжинской ТЭС |
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 27 | Зола уноса Ладыжинской ТЭС |
| <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270 | Бурый уголь из шахт США |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv red 11 | Красная порода ЦОФ «Червоноградская» |
| <i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv black 6 | Черная порода ЦОФ «Червоноградская» |
| <i>Sulfobacillus</i> sp. Lad 29 | Зола уноса Ладыжинской ТЭС |

Соответствующие исследования проводились также с коллекционным штаммом *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 из Американской коллекции типовых культур, выделенным из бурого угля шахт США. Все штаммы хранятся в музее кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии Одесского национального университета имени И. И. Мечникова.

Выделенные штаммы можно отнести к экстремофилам, т.к. они получены из техногенных субстратов, микробиоценоз которых формируется в нестабильных физико-химических и климатических условиях, с высокими концентрациями тяжелых металлов (табл. 2).

Таблица 2

Концентрации тяжелых металлов в отвальных продуктах ТЭК

Table 2

Concentrations of heavy metals ions in dumps by fuel-energy complex

| Отвальный продукт | Концентрация металла, г/т | | | | | |
|----------------------------|---------------------------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|
| | Cu | Zn | Pb | Cd | Ni | Co |
| Золошлак Добротворской ТЭС | 102,3±0,1 | 212,9±0,1 | 70,88±0,05 | 8,98±0,05 | 111,4±0,1 | 180,0±0,1 |
| Зола уноса Ладыжинской ТЭС | 68,30±0,05 | 276,7±0,1 | 108,7±0,1 | 7,20±0,05 | 230,8±0,1 | 305,0±0,1 |
| Черная порода ЦОФ | 62,18±0,05 | 112,5±0,1 | 42,20±0,05 | 2,82±0,05 | 134,2±0,1 | 116,1±0,1 |
| Красная порода ЦОФ | 78,90±0,05 | 130,8±0,1 | 57,92±0,05 | 3,63±0,05 | 132,9±0,1 | 188,8±0,1 |



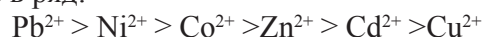
Все выделенные от отходов ТЭК штаммы изучали на устойчивость к ионам меди, цинка, никеля, кобальта и кадмия в диапазоне концентраций 0,5–12,0 г/дм³ с интервалом 0,5 г/дм³; к ионам свинца в диапазоне 0,25–1,50 г/дм³ с интервалом 0,05 г/дм³. Выбор этих металлов обусловлен их высокой токсичностью и сочетанием всех известных механизмов подавления жизнедеятельности микроорганизмов [2, 6].

Резистентность штаммов определяли при их культивировании на стандартной среде Сильвермана-Лундгрема 9К состава, г/дм³: K₂HPO₄ – 0,50; (NH₄)₂SO₄ – 3,00; MgSO₄×7H₂O – 0,50; KCl – 0,10; Ca(NO₃)₂ – 0,01. В качестве источников энергии использовали для *A. ferrooxidans* и *Sulfobacillus sp.* соль FeSO₄×7H₂O в концентрации 44,5 г/дм³; при культивировании *A. thiooxidans* – Na₂S₂O₃ в концентрации 5,0 г/дм³. Соли металлов в форме сульфатов растворяли в дистиллированной воде, стерилизовали на кипящей водяной бане в течение 10 мин и вносили в расплавленную агаризованную среду. Контролем служила среда 9К без металлов. Мезофильные штаммы культивировали при 35,0±0,2 °С, умеренно термофильные – при 50,0±0,2 °С в течение семи суток. Учет результатов осуществляли визуально, сравнивая рост штаммов в опытных и контрольных вариантах. Все опыты проводили в трёх повторностях. Минимально ингибирующей считали концентрацию (МИК, г/дм³), при которой еще сохраняется жизнеспособность исследуемого штамма, но полностью отсутствует его рост. Количественный анализ твердых субстратов осуществляли на атомно-эмиссионном спектрометре ЭМАС-200 ССД (Беларусь). Концентрацию металлов в растворах определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии на приборах ААС-1 (Германия) и С-115ПК Selmi (Украина). Микрофотосъемку проводили с помощью светового микроскопа Primo Star PC (Германия). Достоверность полученных результатов оценивали по критерию Стьюдента с вероятностью P<0,05.

Результаты и их обсуждение

Результаты исследований обобщены в табл. 3 и свидетельствуют о высокой устойчивости выделенных штаммов к широкому спектру ионов тяжелых металлов. Наиболее показательные визуальные проявления резистентности бактерий представлены на рис. 1–4.

Как показали результаты исследований, наиболее токсичным для всех выделенных и изученных штаммов является ион свинца, его МИК составляет 0,35–0,70 г/дм³. На рис. 2 виден слабый рост по штриху выделенных бактерий *A. ferrooxidans* в присутствии 0,70 г/дм³ Pb²⁺ по сравнению с контролем (рис. 1). Минимальной токсичностью обладает ион меди: его МИК находится в диапазоне 2,5–11,5 г/дм³, в зависимости от штамма. В общем виде все исследованные ионы тяжелых металлов в порядке убывания их токсичного воздействия на выделенные бактерии родов *Acidithiobacillus* и *Sulfobacillus* можно расположить в ряд:



Максимальную устойчивость ко всем изученным ионам металлов проявляли *Acidithiobacillus ferrooxidans* Lv red 9 и *Acidithiobacillus ferrooxidans* Lv black 37, изолированные из отвалов обогащения углей. МИК всех метал-



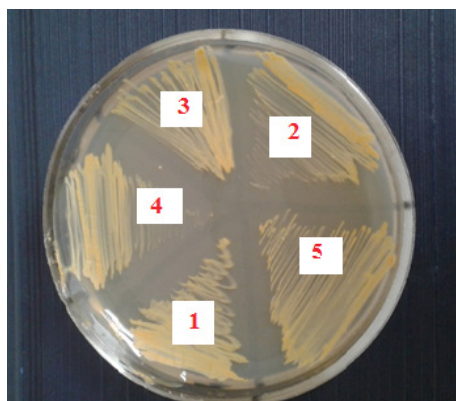


Рис. 1. Ріст *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* Lad 27 (3), *A. ferrooxidans* DTV 1 (4), *A. ferrooxidans* Lad 5 (5) в контрольних дослідах

Fig. 1. Growth of *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* Lad 27 (3), *A. ferrooxidans* DTV 1 (4), *A. ferrooxidans* Lad 5 (5) – control

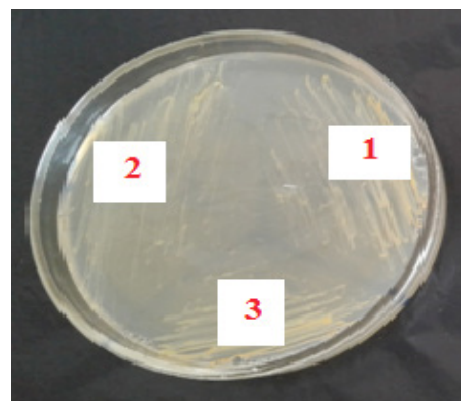


Рис. 2. Ріст *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* DTV 1 (2), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (3) в присутстві 0,70 г/дм³ Pb²⁺

Fig. 2. Growth of *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* DTV 1 (2), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (3) in the presence of 0,70 г/дм³ Pb²⁺

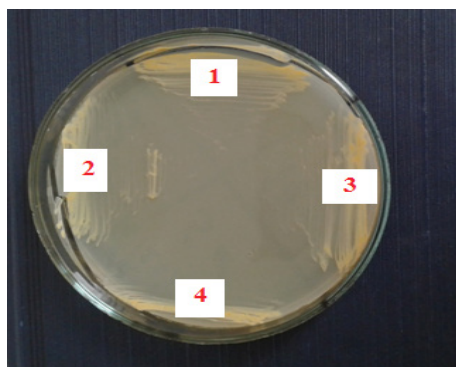


Рис. 3. Ріст *A. ferrooxidans* Lad 27 (1), *A. ferrooxidans* Lad 5 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3), *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (4) в присутстві 4,0 г/дм³ Zn²⁺

Fig.3. Growth of *A. ferrooxidans* Lad 27 (1), *A. ferrooxidans* Lad 5 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3), *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (4) in the presence of 4,0 г/дм³ Zn²⁺

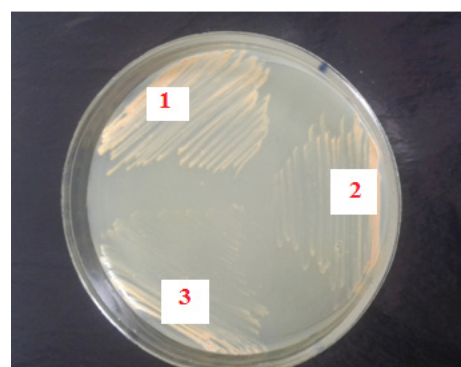


Рис. 4. Ріст *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3) в присутстві 6,8 г/дм³ Co²⁺

Fig.4. Growth of *A. ferrooxidans* Lv red 9 (1), *A. ferrooxidans* Lv black 37 (2), *A. ferrooxidans* DTV 1 (3) in the presence of 6,8 г/дм³ Co²⁺

Таблица 3

Минимальные ингибирующие концентрации (г/дм³) для штаммов,
изолированных из отходов ТЭК

Table 3

Minimum inhibitory concentrations (g/dm³) for strains isolated from dumps
by fuel-energy complex

| Штамм | Ион металла | | | | | |
|------------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Cu ²⁺ | Zn ²⁺ | Pb ²⁺ | Cd ²⁺ | Co ²⁺ | Ni ²⁺ |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9 | 11,5±0,5 | 8,1±0,3 | 0,70±0,05 | 9,9±0,4 | 6,8±0,3 | 5,6±0,3 |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37 | 11,5±0,5 | 6,1±0,3 | 0,70±0,05 | 9,9±0,4 | 6,8±0,3 | 7,5±0,3 |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lad 5 | 5,1±0,3 | 4,0±0,2 | 0,35±0,02 | 7,4±0,3 | 3,4±0,2 | 3,7±0,2 |
| <i>A. ferrooxidans</i> Lad 27 | 11,5±0,5 | 4,0±0,2 | 0,35±0,02 | 9,9±0,5 | 5,1±0,3 | 5,6±0,3 |
| <i>A. ferrooxidans</i> DTV 1 | 11,5±0,5 | 4,0±0,2 | 0,70±0,05 | 2,4±0,2 | 6,8±0,3 | 3,7±0,2 |
| <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 | 2,5±0,2 | 4,0±0,2 | 0,35±0,02 | 2,4±0,2 | 1,7±0,2 | 1,9±0,2 |
| <i>A. thiooxidans</i> Lv black 6 | 5,1±0,3 | 6,1±0,3 | 0,35±0,02 | 4,9±0,3 | 3,4±0,2 | 3,7±0,3 |
| <i>A. thiooxidans</i> Lv red 11 | 6,4±0,3 | 6,1±0,3 | 0,35±0,02 | 4,9±0,3 | 5,1±0,3 | 1,9±0,2 |
| <i>Sulfobacillus</i> sp. Lad 29 | 10,2±0,4 | 8,1±0,4 | 0,70±0,05 | 9,9±0,4 | 6,8±0,3 | 5,6±0,3 |

лов для этих штаммов не отличались (табл. 3). Штаммы *A. ferrooxidans*, изолированные из отходов сжигания углей – золы уноса и золошлака, проявили меньшую устойчивость по отношению к ионам тяжелых металлов. Однако, несмотря на один и тот же источник выделения – зола уноса Ладыжинской ТЭС, МИК ионов металлов для *A. ferrooxidans* Lad 27 и *A. ferrooxidans* Lad 5 были различными. Так, уровень резистентности *A. ferrooxidans* Lad 27 достаточно высок и незначительно отличается от этого показателя для наиболее резистентных *A. ferrooxidans* Lv red 9 и *A. ferrooxidans* Lv black 37. В тоже время МИК ионов металлов для *A. ferrooxidans* Lad 5 была минимальной по сравнению со всеми исследуемыми штаммами. Выявленные внутри видовые различия бактерий могут быть связаны с их индивидуальными особенностями, в частности, локализацией генов устойчивости, влияющих на механизмы формирования резистентности (наличие внеклеточного барьера, активный транспорт ионов металлов и др.) [2, 6, 9].

Устойчивость бактерий штамма *A. ferrooxidans* DTV 1, изолированного из золошлака Добротворской ТЭС, к ионам меди и свинца была сравнима с этим показателем для *A. ferrooxidans* Lv red 9 и *A. ferrooxidans* Lv black 37, но уровень резистентности к другим металлам был в 1,5–4,0 раза меньше (табл. 3). При этом необходимо отметить, что в золе уноса и золошлаке концентрация большинства тяжелых металлов превышала их содержание в отвалах углеобогащения (табл. 2).

Отличия имели место и при сравнении резистентности представителей разных видов рода *Acidithiobacillus*, выделенных из одного и того же субстрата. Так, штаммы рода *Acidithiobacillus thiooxidans* Lv red 11 и *Acidithiobacillus thiooxidans* Lv black 6, изолированные из отвалов углеобогащения, проявляли минимальную устойчивость ко всем ионам металлов, по сравнению со штам-



мами *A. ferrooxidans* Lv red 9 и *A. ferrooxidans* Lv black 37. Эти штаммы обладали одинаковой устойчивостью к цинку и кадмию, но *A. thiooxidans* Lv red 11 оказался более устойчивым к меди и кобальту, а *A. thiooxidans* Lv black 6 – к никелю. Минимальный уровень резистентности штаммов *Acidithiobacillus thiooxidans* к металлам обусловлен использованием тиосульфата в качестве источника энергии. При использовании в качестве энергетического субстрата двухвалентного железа у *Acidithiobacillus ferrooxidans* вероятно происходит инактивация белков внешней мембраны и подавление ионных переносчиков, в результате чего снижается приток ионов металлов в клетку и, как следствие, их токсическое воздействие на клетки бактерий [7].

МИК ионов тяжелых металлов для умеренно термофильного штамма *Sulfobacillus* sp. Lad 29, изолированного из золы уноса Ладыжинской ТЭС, практически не отличались от полученных данных для *A. ferrooxidans*, изолированных из отвалов углеобогащения. В целом все выделенные штаммы были лучше адаптированы к росту в присутствии солей тяжелых металлов по сравнению с типовым *A. ferrooxidans* ATCC 23270. По мере убывания устойчивости всех изученных штаммов к ионам тяжелых металлов их можно расположить в ряд: *A. ferrooxidans* Lv red 9 \geq *A. ferrooxidans* Lv black 37 > *Sulfobacillus* sp. Lad 29 > *A. ferrooxidans* Lad 27 > *A. ferrooxidans* DTV 1 > *A. thiooxidans* Lv red 11 \geq *A. thiooxidans* Lv black 6 \geq *A. ferrooxidans* Lad 5 > *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне резистентности бактерий, изолированных из отвальных продуктов ТЭК, к ионам тяжелых металлов. При этом минимальные концентрации металлов, при которых еще сохраняется жизнеспособность штаммов, в несколько раз превышают их содержание в отходах (табл. 1).

Полученные результаты согласуются с немногочисленными литературными данными, большинство из которых касаются резистентности АХБ, изолированных из природных сульфидных руд. Приводятся различные результаты об устойчивости *Acidithiobacillus ferrooxidans* к ионам тяжелых металлов, что связано с источником выделения и особенностями штаммов. Имеются данные о росте *Thiobacillus ferrooxidans*, выделенного из индийского медного рудника в присутствии 10,0 и 20,0 г/дм³ иона Cu²⁺, однако при этом показано снижение способности окислять железо практически на 80,0–90,0% [15]. В работе [16] указано, что уровни резистентности двух типовых штаммов *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 и *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 к меди отличались и составляли 25,0 и 6,2 г/дм³, соответственно. В работе Boyer A. et al [11] приводятся данные о толерантности бактерий штамма *Thiobacillus ferrooxidans* DSM 583 к 38,4 г/дм³ ионов Cu²⁺, однако уже при 44,8 г/дм³ Cu²⁺ полностью ингибировался рост бактерий указанного штамма. В работе [13] приведены данные по изучению устойчивости бактерий десяти штаммов *Thiobacillus ferrooxidans*, изолированных из урановых шахт и хвостохранилищ никелевых рудников, к меди, никелю, урану и торью. Имеются результаты ряда исследователей по устойчивости бактерий различных штаммов *A. ferrooxidans*, выделенных из природных сред и экспериментальных установок. Выявлена устойчивость *A. ferrooxidans* к 51,2 г/дм³ Cu²⁺,



70,7 г/дм³ Zn²⁺, 56,0 г/дм³ Cd²⁺ [8, 13]. Автори більшості робіт зв'язують різні рівні резистентності штамів з їх природною фізіологічною змінністю, залежною, в частині, від джерел виділення.

Таким чином, отримані результати дозволяють віднести штами АХБ, виділені з техногенного сировини, до полірезистентних, так як вони проявили високий рівень стійкості до широкого кола іонів важких металів в широкому діапазоні концентрацій. Результати досліджень свідчать про міжвидову та внутривидову різницю в резистентності досліджуваних штамів до іонів металів. Це може бути пов'язано з різними факторами фізіологічного та генетичного характеру: зниженням проникності клітинної стінки для іонів важких металів; утворенням великої кількості слизу, адсорбуючого та інактивуючого іони металів; наявністю у бактерій екстрацелюлярних факторів стійкості – плазмідів та транспозонів [2, 6, 9]. Якщо врахувати весь комплекс практично корисних властивостей виділених штамів з точки зору їх резистентності до іонів важких металів, а також встановлених раніше в роботі [10] швидкості росту, активності окислення заліза (II) як джерела енергії, здатності до адаптації та вищелачиваючої активності, найбільший інтерес представляють ізолювані з відходів вуглебагачення мезофільні штами *A. ferrooxidans* Lv black 37 та *A. ferrooxidans* Lv red 9. Ці результати значно розширили можливості застосування біотехнологічних методів переробки як геогенного так і техногенного сировини та лягли в основу розробки ефективного уніфікованого бактеріального препарату, здатного вилучати метали з техногенних субстратів ТЭК України з високими показателями.

**І. А. Блайда, Т. В. Васильєва, Л. І. Слюсаренко,
Н. Ю. Васильєва**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна,
e-mail: iblayda@ukr.net

СТІЙКІСТЬ ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ АЦИДОФІЛЬНИХ ХЕМОЛІТОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ, ЩО ВИДИЛЕНІ З ТЕХНОГЕННОЇ СИРОВИНИ

Реферат

Мета. Визначення стійкості до іонів важких металів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, що ізолювані з відвальних порід паливно-енергетичного комплексу України. **Методи.** Бактерії культивували на агаризованому середовищі Сильвермана-Лундгрема 9К у присутності іонів міді, цинку, нікелю, кобальту і кадмію в діапазоні концентрацій 0,5–12,0 г/дм³ з інтервалом 0,5 г/дм³, іонів свинцю – в діапазоні 0,25–1,50 г/дм³ з інтервалом 0,05 г/дм³, мезофільні бактерії культивували при 35,0 ± 0,2 °С, помірно термофільні – при 50,0 ± 0,2 °С протягом семи діб. Облік результатів здійснювали візуально, порівнюючи дослідні варіанти з контрольними; за контроль слугувало середовище 9К без іонів металів. **Результати.** Отримані результати свідчать про



високий рівень резистентності ізолюваних бактерій родів *Acidithiobacillus* і *Sulfobacillus* до різних іонів важких металів. Мінімальні пригнічувальні концентрації металів для вивчених штамів в кілька разів перевищували їх вміст у відвальних породах паливно-енергетичного комплексу. Встановлено ряд токсичності іонів металів по відношенню до виділених штамів: найбільш токсичним виявився іон Pb^{2+} (МІК для всіх штамів знаходилася в діапазоні 0,35–0,70 г/дм³), найменш токсичним – іон Cu^{2+} (МІК досягала 11,5 г/дм³). Визначено ряд стійкості ізолюваних штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій родів *Acidithiobacillus* і *Sulfobacillus* по відношенню до іонів токсичних металів. Максимальною стійкістю володіли штами, ізолювані з відходів збагачення вугілля, мінімальною – штами, ізолювані з відходів спалювання вугілля, а також колекційний штамі. **Висновки.** Виділені з техногенної сировини штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій відносяться до полірезистентних, так як вони проявили високий рівень стійкості до широкого кола іонів важких металів в широкому діапазоні концентрацій. Резистентність штамів залежить від їх індивідуальних особливостей і джерел виділення. Виявлено міжвидові і внутрішньовидові відмінності штамів за резистентністю, що може бути пов'язано з різними чинниками фізіологічного і генетичного характеру.

Ключові слова: ацидофільні хемолітотрофні бактерії, відвальні продукти паливно-енергетичного комплексу, резистентність, іони важких металів.

I. Blayda, T. Vasylieva, L. Sliusarenko, N. Vasylieva

Odesa National Mechnykov University,
2, Dvoryanska str., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: iblayda@ukr.net

RESISTANCE OF ACIDOPHILIC CHEMOLYTOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM TECHNOGENIC RAW MATERIALS TO HEAVY METALS

Summary

Aim. Determination of resistance to heavy metal ions of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from dump products of fuel-energy complex of Ukraine. **Methods.** Traditional microbiological: cultivation of strains were carried out with using of Silverman-Lundgren 9K medium in the presence of copper, zinc, nickel, cobalt and cadmium ions in the concentration range 0.5–12.0 g/dm³ at intervals 0,5 g/dm³, in the presence of lead in the concentration range 0.25–1.50 g/dm³ at intervals 0,05 g/dm³; crops carried out with a stroke; cultivation of mesophilic strains was carried out at the temperature of 35.0±0.2 °C, moderately thermophilic – at 50.0±0.2 °C within seven days; the results were recorded visually by comparing the experimental options with the control ones; the control was 9K medium without metal ions. **Results.** The results indicate a high level of resistance of isolated strains of the genera *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* to various heavy metal ions. The metals minimum inhibitory concentrations (MIC) for the studied strains were several times higher than their content in dump products



of fuel-energy complex. A series of metal ions toxicity in relation to the isolated strains has been established: Pb^{2+} ion was the most toxic (MIC for all the strains it was in the range of 0.35–0.70 g/dm³), the least toxic was Cu^{2+} ion (MIC reached 11.5 g/dm³). A number of resistances of isolated acidophilic chemolithotrophic bacteria of the genera *Acidithiobacillus* and *Sulfobacillus* with respect to toxic metal ions has been determined. The strains isolated from coal waste dumps possessed the maximum resistance, the minimal strains were those isolated from coal burning wastes, as well as the typical ones. **Conclusion.** The strains of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from technogenic raw materials belong to multiresistant ones, since they showed a high level of resistance to a wide range of heavy metal ions in a wide range of concentrations. The resistance of strains depends on their individual characteristics and sources of isolation. Identified interspecific and intraspecific differences of the strains by their resistance, is associated with various physiological and genetic factors.

Key words: acidophilic chemolithotrophic bacteria, dumps of fuel-energy complex, resistance, heavy metal ions.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Карпинець Л., Лобачевська О., Баранов В., Дяків С., Гнатуш С. Вміст загального нітрогену і важких металів у гаметофіті мохів та поверхневому шарі техногенного субстрату шахтних відвалів // Біологічні Студії. – 2017. – Т. 11, № 1. – 101-108. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1101.521>
2. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісник Львів. ун-ту. Серія біологічна. – 2007. – Т. 45. – С. 3–28.
3. Таширеву А. Б., Рокитко П. В., Левшико А. С., Романовская В. А., Таширева. А. А. Устойчивость к токсичным металлам хемоорганотрофных бактерий, изолированных из антарктических клифов // Микробиол. журн. – 2012. – Т. 74, № 2. – С. 3–7.
4. Таширеву А. Б., Рокитко П. В., Сулова О. С. Устойчивость микроорганизмов карстовых полостей мушкарова яма и куйбышевская к соединениям токсичной меди (II) // Вода: Химия и экология. – 2015. – № 1. – С. 64–72.
5. Теплая Г. А. Тяжелые металлы как фактор загрязнения окружающей среды. Обзор // Астраханский вестник экологического образования. – 2013. – Т. 1, № 23. – С. 182–192.
6. Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Микробиол. журн. – 2009. – Т. 71, № 6. – С. 54–65.
7. Almarcegui R. J., Navarro C. A., Paradela A., Albar J.P., et al. Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur // Research in Microbiology. – 2014. – Vol. 165. – P. 761–772. doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.005.
8. Baillet F., Magnin J. P., Cheruy J. P., Ozil P. Cadmium Tolerance and Uptake by a *Thiobacillus ferrooxidans* Biomass // Environmental Technology. – 1997. – Vol. 18, № 6. – P. 631–637. doi: 10.1080/09593331808616581.
9. Banerjee C. Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments // Indian Journal of Experimental Biology. – 2004. – Vol. 42. – P. 9–25. doi 10.1099/mic.0.037143-0



10. I. Blayda, T. Vasylieva, L. Sliusarenko, N. Vasylieva, V. Baranov, S. Shuliakova. Isolation and Study of the Main Properties of Acidophilic Chemolithotrophic Bacteria Isolated from the Waste Dumps of Fuel-energy Complex of Ukraine // *Studia Biologica*. – 2018. – V. 12, № 3–4. – С. 3–16. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1203.570>
11. Boyer A., Magnin J.-P., Ozil P. Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass // *Biotechnology Letters*. – 1998. – Vol. 20, № 2. – P. 187–190.
12. Gadd G. M. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation // *Microbiology*. – 2010. – Vol. 156. – P. 609–643. doi 10.1099/mic.0.037143-0.
13. Kondratyeva F. Tamara, Muntyan N. Lyudmila, Karavaiko I. Grygory. Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes // *Microbiology*. – 1995. – Vol. 141. – P. 1157–1162. doi: 10.1099/13500872-141-5-1157
14. Kuzmishyna S, Hnatush S, Moroz O, Karpinets L, Baranov V. Microbiota of Chervonograd Mining Region. *Visnyk of the Lviv University. Series Biology*. – 2014. – T. 67. – С. 234–242.
15. Natarajan K. A., Sudeesha K., Ramananda G. Rao. Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans* // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1994. – Vol. 66. – P. 303–306. doi:10.1007/BF00882764
16. Orellana L. H., Jerez C. A. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2011. – 92, № 4. – P. 761–767. doi: 10.1007/s00253-011-3494-x
17. Tuovinen O. H., Niemelä S. I., Gyllenberg H. G. Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1971. – Vol. 37, № 1. – P. 489–496. doi: 10.1007/BF02218519

References

1. Karpinets L, Lobachevska O, Baranov V, Diakiv S, Hnatush S. Total Content of Nitrogen and Heavy Metals in the Mosses Gametophyte and in Upper Layer of Technogenic Substrates of the Mine Dumps. *Studia Biologica*. 2017;11(1):101-8. (In Ukrainian). DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1101.521>
2. Kushkevych I, Gnatush S, Gudz S. Vplyv vazhkyx metaliv na klityny mikroorganizmiv. *Visnyk Lviv. un-tu. Seriya biologichna*. 2007; 45: 3–28. (In Ukrainian).
3. Tashyrev AB, Rokitko PV, Levishko AS, Romanovskaya VA, Tashyreva AA. Ustoychivost k toksichnyim metallam hemoorganotrofnih bakteriy, izolirovannyih iz antarkticheskikh klifov. *Mikrobiol. Zhurn.* 2012; 74(2): 3–7 (in Russian)
4. Tashyrev AB, Rokitko PV, Suslova OS. Ustoychivost mikroorganizmov karstovyyih polostey mushkarova yama i kuybyishevskaya k soedineniyam toksichnoy medi (II). *Voda: Himiya i ekologiya*. 2015; 1: 64–72. (in Russian)
5. Teplaya GA. Tyazhelye metallyi kak faktor zagryazneniya okruzhayushey sredy. *Obzor. Astrahanskiy vestnik ekologicheskogo obrazovaniya*. 2013; 1(23): 182–192. (in Russian)
6. Ianieva OD. Mehanizmyi ustoychivosti bakteriy k ionam tyazhelyih



metallov. Mikrobiol. Zhurn. 2009; 71(6): 54–65. (in Russian)

7. *Almarcegui RJ, Navarro CA, Paradela A, Albar JP et al.* Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur. Research in Microbiology. 2014; 165: 761–772. doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.005.

8. *Baillet F, Magnin JP, Cheruy JP, Ozil P.* Cadmium Tolerance and Uptake by a *Thiobacillus Ferrooxidans* Biomass, Environmental Technology. 1997; 18(6): 631–637. doi: 10.1080/09593331808616581.

9. *Banerjee C.* Genetics of metal resistance in acidophilic prokaryotes of acidic mine environments. Indian Journal of Experimental Biology. 2004; (42): 9–25. doi 10.1099/mic.0.037143-0

10. *Blayda I, Vasylieva T, Sliusarenko L, Vasylieva N, Baranov V, Shuliakova S.* Isolation and Study of the Main Properties of Acidophilic Chemolithotrophic Bacteria Isolated from the Waste Dumps of Fuel-energy Complex of Ukraine. Studia Biologica. 2018; 12(3-4): 3-16. DOI: <https://doi.org/10.30970/sbi.1203.570>.

11. *Boyer A, Magnin JP, Ozil P.* Copper ion removal by *Thiobacillus ferrooxidans* biomass. Biotechnology Letters. 1998; 20(2): 87–190.

12. *Gadd GM.* Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. 2010; 156: 609–643. DOI 10.1099/mic.0.037143-0

13. *Kondratyeva TF, Muntyan LN, Karavaiko GI.* Zinc- and arsenic-resistant strains of *Thiobacillus ferrooxidans* have increased copy numbers of chromosomal resistance genes. Microbiology. 1995; 141: 1157-1162. doi: 10.1099/13500872-141-5-1157

14. *Kuzmishyna S, Hnatysh S, Moroz O, Karpinets L, Baranov V.* Microbiota Of Chervonograd Mining Region. Visnyk of the Lviv University. Series Biology. 2014;67:234-42.

15. *Natarajan KA, Sudeesha K, Ramananda GR.* Stability of copper tolerance in *Thiobacillus ferrooxidans*. Antonie van Leeuwenhoek. 1994; 66: 303–306. doi:10.1007/BF00882764

16. *Orellana LH, Jerez CA.* A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. Appl Microbiol Biotechnol. 2011;92(4): 761-767. doi: 10.1007/s00253-011-3494-x

17. *Tuovinen OH, Niemelä SI, Gyllenberg HG.* Tolerance of *Thiobacillus ferrooxidans* to some metals. Antonie van Leeuwenhoek. 1971; 37(1): 489-496.

Стаття надійшла до редакції 14.03.2019 р.

