

---

# ECOLOGICAL PROBLEMS OF BIOINDICATION

---

---



A. F. Rylskiy

Dr. Sci. (Biol.), Professor

UDK 504.054:544.584

---

Zaporizhzhya National University,  
Zaporizhzhya, Ukraine,  
e-mail: Rylsky@mail.ru

---

## BIOINDICATION OF ENVIRONMENTAL POLLUTION BY HEAVY METALS WITH USE THE PIGMENT-SYNTHESIZING BACTERIA

**Abstract.** The results of researches on influence of heavy metals on pigment-synthesizing bacteria of genera *Serratia* and *Pseudomonas* are presented in the paper. Influence p-elements investigated, using water model solutions which contained ions of heavy metals:  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Sn^{2+}$  i  $Te^{2+}$  in concentration of 20-1000 mg/dm<sup>3</sup>. Experiments made with strains of *P. aeruginosa* MR-2, *P. fluorescens* MR-12, *P. fluorescens* var. *pseudo-iodinum* MR-11, *S. marcescens* MR-141. All metals block the synthesis of pigments of bacteria on concentration levels below, than to the complete inhibition vital functions of cage. Thus, between the level of blocking of synthesis of pigment and death of cage it is observed a concentration interval is certain.

In researches of influence of d-elements ions with unfilled d-orbitals on the synthesis of pigment in *P. of fluorescens* var. *pseudo-iodinum* it was set that is most quickly lost pigment-synthesizing ability under the action of  $Cr^{6+}$ . At research of influence of d-metals with the filled d-orbitals of next to last power level on pigment-synthesizing ability of bacteria was established, that two metals Hg and Ag have most inhibition operate on the synthesis of pigments.

The radio-active metals of U (II) and Th (IV) block the synthesis of pigment of prodigiosin on different concentration levels. The synthesis of prodigiosin was blocked uranium for the concentrations of 300–350 mg/dm<sup>3</sup>, and thorium appeared far a less toxic element and produced on pigment-synthesizing ability the bacteria of inhibition operate only after 850 mg/dm<sup>3</sup>.

It was set researches, that the concentration level of blocking of synthesis of pigments depends on a concentration the ion of metal and nature the anion of salt of this metal and is from 12,5 % to 40 % depending on culture of bacteria.

At 72-hour cultivation of *S. marcescens* on nutrient medium with  $ZnCl_2$  full blocking of pigment synthesis was observed at concentration of 300 mg/dm<sup>3</sup>, and growth of culture stopped at concentration of 350–400 mg/dm<sup>3</sup>. In the presence of  $ZnSO_4$  and  $Zn(NO_3)_2$  salts in a nutrient medium the inhibition of pigment-synthesizing ability of bacterial culture occurs at concentration of 400 and 250 mg/dm<sup>3</sup> respectively. Therefore, the difference between the smallest oppressing concentration of 250 mg/dm<sup>3</sup> (zinc nitrate) and the greatest 400 mg/dm<sup>3</sup> (zinc sulfate) was 37,5 %.

At *S. marcescens* cultivation with copper salts –  $CuSO_4 \cdot 6H_2O$ ,  $Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$ ,  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  – it became clear that the least toxic salt is  $CuCl_2$  as in the presence of this salt full blocking of synthesis prodigiosin was observed at concentration of 130 mg/dm<sup>3</sup>. In the presence of  $CuSO_4$  and  $Cu(NO_3)_2$  salts the synthesis inhibition prodigiosin was observed at concentration of 100 mg/dm<sup>3</sup>. The difference between least and most toxic salts made 30 %.

---

© A. F. Rylskiy, 2013

Having analysed probable factors which most influence toxicity of these or those metals, and considering reaction of organisms of different evolutionary levels (including pigment-synthesizing bacteria) on metals, we came to a conclusion that for creation of synthetic number of the toxicity close to objective display of their toxic nature, it is necessary to consider such factors: nuclear radiuses of metals, solubility of salts of metals, chelateforming ability, force of binding of metals with proteins of cages, toxicity fishing in relation to pigment-synthesizing ability of bacteria threw, toxicity of metals according to literary data.

Counting correlation coefficient between a constructed synthetic number of toxicity of metals and a number of blocking of pigment-synthesizing ability of bacteria, we receive  $r = 0,56$ , that confirms high degree of similarity of these numbers, and it, in turn, specifies that a constructed synthetic number of toxicity can be carried to the factors which are objectively displaying degree of toxicity of metals.

The results of experimental researches, works got at implementation, enabled scientifically to ground the mechanisms of blocking of synthesis of pigments of bacteria at influence of heavy metals and experimentally to lead to possibility of the use of pigment-synthesizing bacteria as bioindicators of contamination of natural environment by heavy metals. It was set our researches, that by the effective bioindicators of contamination of environment metals among bacteria is *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Alcaligenes paradoxus*.

**Key words:** heavy metals, pigment-synthesizing ability, bioindication.

УДК 504.054:544.584

**А. Ф. Рыльский** д-р биол. наук, проф.  
Запорожский национальный университет,  
г. Запорожье, Украина,  
e-mail: Rylsky@mail.ru

### **БИОИНДИКАЦИЯ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПИГМЕНТСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

В работе представлены результаты исследования влияния тяжелых металлов на пигментсинтезирующие бактерии родов *Pseudomonas* и *Serratia*. Все металлы блокируют синтез пигментов бактерий на меньших концентрационных уровнях, чем полное ингибирование жизнедеятельности клеток. Таким образом, между уровнем блокирования синтеза пигментов и гибелью клеток существует определенный концентрационный интервал.

В исследованиях влияния ионов d-элементов с незаполненными d-орбиталями на синтез пигментов у *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* было установлено, что наиболее быстро теряется пигментсинтезирующая способность под влиянием  $\text{Cr}^{6+}$ . Исследование влияния d-металлов с заполненными d-орбиталями предпоследнего энергетического уровня на пигментсинтезирующую способность бактерий показало, что два металла (Hg и Ag) имеют наибольший ингибирующий эффект на синтез пигментов. Радиоактивные металлы U (II) и Th (IV) блокируют синтез пигмента продигозина в различных концентрациях. Синтез продигозина блокируется ураном в концентрации 300–350 мг/дм<sup>3</sup>, а торий оказался гораздо менее токсичным элементом и оказывал на пигментсинтезирующую способность бактерий ингибирующее действие только при 850 мг/дм<sup>3</sup>.

Нашими исследованиями установлено, что эффективными биоиндикаторами загрязнения окружающей среды металлами среди бактерий являются *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Alcaligenes paradoxus*.

**Ключевые слова:** тяжелые металлы, пигментсинтезирующая способность, биоиндикация.

УДК 504.054:544.584

**О. Ф. Рильський** д-р біол. наук, проф.  
Запорізький національний університет,  
м. Запоріжжя, Україна,  
e-mail: Rylsky@mail.ru

### **БІОІНДИКАЦІЯ ЗАБРУДНЕННЯ ДОВКІЛЛЯ ВАЖКИМИ МЕТАЛАМИ З ВИКОРИСТАННЯМ ПІГМЕНТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ БАКТЕРІЙ**

У роботі представлено результати досліджень впливу важких металів на пігментосинтезувальні бактерії родів *Serratia* та *Pseudomonas*. Всі метали блокують синтез

пігментів бактерій на концентраційних рівнях нижчих, ніж повне інгібування життєдіяльності клітини. Таким чином, між рівнем блокування синтезу пігменту і загибеллю клітини спостерігається певний концентраційний інтервал.

У дослідженнях впливу іонів d-елементів з незаповненими d-орбіталями на синтез пігменту у *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* було встановлено, що найбільш швидко втрачається пігментосинтезувальна здатність під дією  $\text{Cr}^{6+}$ . При дослідженні впливу d-металів з заповненими d-орбіталями передостаннього енергетичного рівня на пігментосинтезувальну здатність бактерій з'ясувалося, що два метали Hg і Ag мають найбільшу інгібувальну дію на синтез пігментів. Радіоактивні метали U (II) і Th (IV) блокують синтез пігменту продигіозину на різних концентраційних рівнях. Синтез продигіозину блокується ураном за концентрації 300–350 мг/дм<sup>3</sup>, а торій виявився набагато менш токсичним елементом і справляв на пігментосинтезувальну здатність бактерій інгібувальну дію лише за 850 мг/дм<sup>3</sup>.

Нашими дослідженнями встановлено, що ефективними біоіндикаторами забруднення довкілля металами серед бактерій є *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Alcaligenes paradoxus*.

**Ключові слова:** важкі метали, пігментосинтезувальна здатність, біоіндикація.

## ВСТУП

Екологічний моніторинг як система спостережень, оцінки й прогнозу антропогенних змін у біологічних системах не може бути оптимізованим без дефініції чітко визначеного ряду індикаторних організмів у групі редуцентів, які є кінцевою і водночас початковою ланкою для продуцентів і консументів. Тільки встановлення такого ряду індикаторних організмів, їх глибоке вивчення у всіх трьох названих складниках «живої речовини» біосфери може дати системну відповідь на запитання про ступінь впливу того або іншого антропогенного фактора на живу природу. На сьогодні область редуцентів є найменш вивченою й представленою в системі організмів-індикаторів. Реального ряду індикаторів-редуцентів, зокрема серед прокариот, не існує тому, що нині він фактично починається й закінчується представником ентеробактерій – *E. coli*, як найбільш вивченого організму-сигналізатора забруднення довкілля (Горова, 2007; Мелехова, 2008).

Це викликає необхідність пошуку такої групи організмів, які могли б дати швидко й наочну інформацію про стан досліджуваного середовища. Такою групою організмів-індикаторів серед редуцентів-прокариот можуть бути пігментосинтезувальні бактерії. Саме яскравість, насиченість кольору синтезованого пігменту є визначальними у виборі цієї групи для індикації забруднення довкілля.

Візуальне спостереження за зміною яскравості пігменту під впливом різних концентрацій іонів важких металів має помітну перевагу перед моніторингом стану природного середовища за допомогою фізико-хімічних методів, зважаючи на велику вартість реагентів та обладнання, які при цьому використовуються. Втрата пігменту у бактерій може служити не тільки добре спостережуваною зміною ознаки, але й показником значних змін на рівні біосинтезу компонентів клітин, тобто може бути об'єктивним індикатором стану забруднення як води, так і ґрунту, і тому дослідження блокування синтезу пігментів бактерій іонами важких металів є актуальним.

Метою роботи було дослідження впливу іонів важких металів на пігментосинтезувальну здатність мікроорганізмів та експериментальне доведення можливості використання пігментосинтезувальних бактерій як біоіндикаторів забруднення природного середовища.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Метали, вплив яких вивчався на пігментосинтезувальну здатність бактерій, мають різну електронну структуру. З урахуванням цього ці метали згруповано таким чином:

- p-елементи – Al, Sn, Pb, Te;
- d-елементи з незаповненими d-орбіталями – V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Mo;

- d-елементи з заповненими d-орбіталами – Cu, Ag, Zn, Cd, Hg;
- радіоактивні f-елементи (актиноїди) – Th і U (Глінка, 1978; Пузаков, 1995).

Вплив р-елементів досліджували, використовуючи водні модельні розчини, що містили іони важких металів:  $Pb^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $Sn^{2+}$  і  $Te^{2+}$  у концентраціях 20–1000 мг/дм<sup>3</sup>. Досліди проводили зі штамми *P. aeruginosa* MP-2, *P. fluorescens* MP-12, *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* MP-11, *S. marcescens* MP-141.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

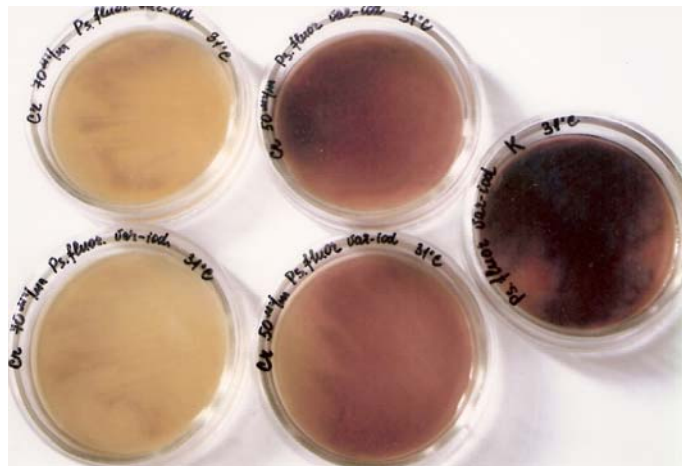
Як показали дослідження, всі метали блокують синтез пігментів бактерій на концентраційних рівнях нижчих, ніж повне інгібування життєдіяльності клітини. Таким чином, між рівнем блокування синтезу пігменту і загибеллю клітини спостерігається певний концентраційний інтервал (табл. 1).

Таблиця 1

Концентрації іонів важких металів (мг/л), що пригнічують пігментоутворення та ріст бактерій родів *Pseudomonas* і *Serratia*

Культура мікро-організмів	$Sn^{2+}$		$Ag^{1+}$		$Zn^{2+}$		$Pb^{2+}$	
	Відсутність							
	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст	Пігм.	Ріст
<i>P. aeruginosa</i>	80±8,2	120±10,1	7±0,5	10±1,5	380±31,0	480±25,1	950±98,0	1000±95,5
<i>S. marcescens</i>	70±6,6	100±9,8	7±0,3	10±0,8	400±40,2	500±38,3	950±55,5	980±62,1
<i>P. fluorescens var pseudo-iodinum</i>	80±5,2	120±9,8	7±0,9	10±1,5	350±27,6	500±35,6	930±72,2	980±93,4

У дослідженнях впливу іонів d-елементів з незаповненими d-орбіталами на синтез пігменту у *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* було встановлено, що найбільш швидко втрачається пігментосинтезувальна здатність під дією  $Cr^{6+}$  (рисунок). При дослідженні впливу d-металів з заповненими d-орбіталами передостаннього енергетичного рівня на пігментосинтезувальну здатність бактерій з'ясувалося, що два метали Hg і Ag мають найбільшу інгібувальну дію на синтез пігментів як продигіозинового, так і феназинового ряду.



Втрата пігментосинтезувальної здатності бактерій *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* з ростом концентрації Cr (VI)

Встановлено, що радіоактивні метали U (II) і Th (IV) блокують синтез пігменту продигіозину на різних концентраційних рівнях. Синтез продигіозину блокується ураном за концентрації 300–350 мг/дм<sup>3</sup>, а торій виявився набагато менш токсичним елементом і справляв на пігментосинтезувальну здатність бактерій інгібувальну дію лише за 850 мг/дм<sup>3</sup>.

При проведенні дослідів у лабораторних умовах з різними солями одного й того ж металу виникає питання про вплив на пігментосинтезувальну здатність бактерій не тільки безпосередньо катіона металу, але й аніонної частини солі.

При 72-годинному культивуванні *S. marcescens* на середовищі з ZnCl<sub>2</sub> повне блокування синтезу пігменту спостерігалось за концентрації 300 мг/дм<sup>3</sup>, а ріст культури припинявся за концентрації 350–400 мг/дм<sup>3</sup>.

У присутності солей ZnSO<sub>4</sub> і Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> в поживному середовищі інгібування пігментосинтезувальної здатності бактеріальної культури відбувається за концентрації 400 і 250 мг/дм<sup>3</sup> відповідно. Отже, різниця між найменшою пригнічувальною концентрацією 250 мг/дм<sup>3</sup> (нітрат цинку) та найбільшою 400 мг/дм<sup>3</sup> (сульфат цинку) була 37,5 %.

При культивуванні *S. marcescens* з солями Купруму – CuSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O, Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O, CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O – з'ясувалось, що найменш токсичною сіллю є CuCl<sub>2</sub>, бо у присутності цієї солі повне блокування синтезу продигіозину спостерігалось за концентрації 130 мг/дм<sup>3</sup>, а в присутності солей CuSO<sub>4</sub> та Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> інгібування синтезу продигіозину спостерігалось за концентрації 100 мг/дм<sup>3</sup>. Різниця між найменш і найбільш токсичними солями складала 30 % (Рильський, 2007, 2010).

Дослідженнями встановлено, що концентраційний рівень блокування синтезу пігментів під дією аніонів піоцианину у *P. fluorescens var. pseudo-iodinum* та продигіозину у *S. marcescens* залежить від концентрації іону металу та природи аніону солі цього металу і становить від 12,5 % до 40 % залежно від природи солі металу і культури бактерій.

Проаналізувавши вірогідні чинники, що найбільш впливають на токсичність тих чи інших металів, та враховуючи реакцію організмів різних еволюційних рівнів (у тому числі і пігментосинтезувальних бактерій) на метали, ми прийшли до висновку, що для побудови синтетичних рядів токсичності, близьких до об'єктивного відображення їхньої токсичної природи, необхідно враховувати наступні фактори (табл. 2).

Таблиця 2

Узагальнена таблиця рядів токсичності металів

max	<b>Ряд токсичності по відношенню до пігментосинтезувальної здатності бактерій</b> Hg, Ag, Cd, Cr, V, Cu, Co, Sn, Ni, Al, Zn, Fe, Pb, Mn, Mo	min
	<b>Ряд розчинності солей металів, найбільш поширених забруднень довкілля</b> Sn, Cu, Co, Zn, Ag, Cd, Pb, Ni, Al, Mn, Mo, Hg, V	
	<b>Ряд атомних радіусів металів</b> Ni, Co, Fe, Cr, Cu, Mn, V, Mo, Zn, Ag, Cd, Sn, Mg, Hg, Pb	
	<b>Ряд металів за хелатоутворювальною здатністю</b> Hg, Pb, Zn, Cd, Fe <sup>3+</sup> , Cu, Ni, Co, Fe <sup>2+</sup> , Mn, Mg (Чистяков, 2007)	
	<b>Ряд металів за силою зв'язування з білками клітини</b> Mg, Zn, Fe <sup>3+</sup> , Co, Cr, Mo, Fe <sup>2+</sup> , Cu (Румянцев, 2007)	
	<b>Ряд загальної токсичності металів відносно організмів, побудований за даними літератури</b> Hg, Ag, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co (Квасников, 1990) Ag, Cu, Ni, Ba, Cr, Hg, Pb, Cd (Кушкевич, 2007)	

Розрахунок порядку елементів у синтетичному ряді проводили, використовуючи лінійне рівняння типу:

$$Z^i = a_1^i x_1^i + a_2^i x_2^i + a_3^i x_3^i + a_4^i x_4^i + a_5^i x_5^i + a_6^i x_6^i + \dots + a_n^i x_n^i$$

Отриманий після розрахунків синтетичний ряд токсичності металів має вигляд:

**Ag, Hg, Cu, Cd, Zn, Co, Ni, Pb**

Блок порівняння рядів наведено у табл. 3.

Таблиця 3

Порівняльна таблиця рядів токсичності та синтетичного ряду металів
<b>Ряд блокування синтезу пігментів</b> Hg, Ag, Cd, Cu, Co, Ni, Zn, Pb
<b>Синтетичний ряд токсичності металів відносно клітин бактерій</b> Ag, Hg, Cu, Cd, Zn, Co, Ni, Pb
<b>Ряд загальної токсичності металів відносно організмів, побудований за даними літератури</b> Hg, Ag, Cu, Cd, Zn, Pb, Ni, Co (Квасников, 1990)

Розраховуючи коефіцієнт кореляції (Лакін, 1990) між побудованим синтетичним рядом токсичності металів і рядом блокування пігментосинтезувальної здатності бактерій, отримуємо  $r = 0,56$  (при  $S_r = 0,05$ ).

Коефіцієнт кореляції між рядом загальної токсичності металів відносно організмів, побудованим за даними літератури та синтетичним рядом токсичності складає  $r = 0,48$  (при  $S_r = 0,1$ ).

Таким чином, коефіцієнт кореляції  $r = 0,56$  підтверджує високий ступінь подібності рядів, що порівнювалися, а це, у свою чергу, вказує на те, що побудований синтетичний ряд токсичності може бути віднесений до чинників, які об'єктивно відображають ступінь токсичності металів.

## ВИСНОВКИ

Результати експериментальних досліджень, одержані при виконанні роботи, дали змогу науково обґрунтувати механізми блокування синтезу пігментів бактерій за впливу важких металів та експериментально довести можливість використання пігментосинтезувальних бактерій як біоіндикаторів забруднення природного середовища важкими металами. Нашими дослідженнями встановлено, що ефективними біоіндикаторами забруднення довкілля металами серед бактерій є *Serratia marcescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Alcaligenes paradoxus*.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ / REFERENCES

**Методичні** рекомендації «Обстеження та районування території за ступенем впливу антропогенних чинників на стан об'єктів довкілля з використанням цитогенетичних методів» для студентів напряму підготовки 6.040106 Екологія і охорона навколишнього середовища та збалансоване природоохористування / Упоряд. А. І. Горова, С. А. Рижинко, Т. В. Скворцова, І. І. Клімкіна, А. В. Павличенко, І. Г. Миронова. – Д. : Національний гірничий університет, 2007. – 25 с.

*Methodical recommendations «Inspection and districtings of territory after the degree of influence of anthropogenic factors on the state of object environment with the use of cytogenetic methods», 2007, A. I. Gorova, S. A. Rizhinko, T. V. Skvorcova, I. I. Klimkina, A. V. Pavlichenko, I. G. Mironova, Dnipropetrovsk, National mountain university, 25 p.*

**Биологический** контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование / О. П. Мелехова, Е. И. Сарапульцева, Т. И. Евсеева и др.; под ред. О. П. Мелеховой и

Е. И. Сарапульцевой. – М. : Издательский центр «Академия», 2008. – 288 с.

*“Biological control of environment: bioindication and biotesting”*, 2008, O. P. Melekhova, E. I. Sarapultseva, T. I. Yevseyeva, etc.; under the editorship of O. P. Melekhova and E. I. Sarapultseva, Moscow, Publishing center “Akademiya”, 288 p.

**Глинка Н. Л.** Общая химия / Н. Л. Глинка. – Л. : Химия, 1978. – 720 с.

*Glinka, N. L., 1978, “General chemistry”, Leningrad, Chemistry, 720 p.*

**Пузаков С. А.** Химия / С. А. Пузаков. – М. : Медицина, 1995. – 624 с.

*Puzakov, S. A., 1995, “Chemistry”, Moscow, Medicine, 624 p.*

**Рильський О. Ф.** Вплив іонів важких металів на пігментсинтезуючу здатність бактерій / О. Ф. Рильський, П. І. Гвоздяк // Доповіді НАН України. – 2007. – № 1. – С. 161-164.

*Rylsky, A. F., Gvozdyak, P. I., 2007, “Influence of ions of heavy metals on pigmentsynthesizing ability of bacteria”, Lecture of NAN of Ukraine, no. 1, pp. 161–164.*

**Рильський О. Ф.** Вірогідні механізми блокування синтезу пігментів бактерій при дії тривалого стресу / О. Ф. Рильський // Вісник Харківського національного університету. Серія біологічні науки. – 2010. – Вип. 11, № 905. – С. 149-155.

*Rylsky, A. F., 2010, “Reliable mechanisms of blocking of bacteria pigments synthesis at the action of the protracted stress”, Announcer of the Kharkiv national university. Series are biological sciences, 11, no. 905, pp. 149–155.*

**Лакін Г. Ф.** Биометрия / Г. Ф. Лакін. – М. : Высшая школа, 1990. – 352 с.

*Lakin, G. F., 1990, “Biometrics”, Moscow, The higher school, 352 p.*

*Стаття надійшла в редакцію: 21.02.2013*

*Рекомендує до друку: д-р. біол. наук, проф. І. А. Мальцева*