

УДК 579.695

БАКТЕРИАЛЬНАЯ АССОЦИАЦИЯ АКТИНОМИЦЕТОВ – АКТИВНЫЙ БИОАККУМУЛЯТОР ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

А.А. Голышева^{1,2}, Л.В. Литвиненко¹, И.Б. Ившина^{1,2}

¹Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук (ПФИЦ УрО РАН), г. Пермь, Россия

²ФГАОУ ВО “Пермский государственный национальный исследовательский университет”, г. Пермь, Россия

В сравнительных исследованиях на примере штаммов *Gordonia paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 560 проанализированы ответные реакции и степень устойчивости алканотрофных актиномицетов к токсическому воздействию тяжелых металлов (ТМ). Устойчивость свободных и иммобилизованных клеток к металлам варьировала от 0,08 до 1280,00 мМ в зависимости от условий эксперимента и использования конкретного ТМ. Выявлены изменения бактериальных клеток в присутствии экополлютантов, способствующие снижению токсического воздействия ТМ на микроорганизмы. У исследованных штаммов актиномицетов не обнаружены мобильные генетические элементы (плазмиды). В ходе биоинформатического анализа выявлены подсистемы кодирующих последовательностей, влияющие на устойчивость к ТМ. Получена иммобилизованная на твердом носителе микробная ассоциация. Разработанный бактериальный консорциум извлекает от 80 до 100% ионов кадмия, хрома, меди железа, ртути, марганца, магния, никеля, свинца и цинка из модельных сточных вод. **Ключевые слова:** актиномицеты, *Gordonia*, *Rhodococcus*, бактериальная ассоциация, биоремедиация, тяжелые металлы, устойчивость, аккумуляция.

BACTERIAL ASSOCIATION OF ACTINOMYCETES – AN ACTIVE BIOACCUMULATOR OF HEAVY METALS

A.A. Golysheva^{1,2}, L.V. Litvinenko¹, I.B. Ivshina^{1,2}

¹Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences – Branch of the Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

²Perm State National Research University, Perm, Russia

Alkanotrophic actinomycetes *Gordonia paraffinivorans* IEGM 735 and *Rhodococcus ruber* IEGM 560 were studied for their resistance to heavy metals (HM). The resistance of free and immobilized cells varied from 0.08 to 1280.00 mM, depending on experimental conditions and the specific HM. Changes in bacterial cells helped reduce the toxic effects of heavy metals. The studied strains did not contain any plasmids. Bioinformatics analysis revealed genetic subsystems influencing resistance to HM. A microbial association immobilized on a solid support was obtained, and this consortium extracted from 80 to 100% of cadmium, chromium, copper, iron, mercury, manganese, magnesium, nickel, lead and zinc ions from model wastewater.

Keywords: actinomycetes, *Gordonia*, *Rhodococcus*, bacterial association, bioremediation, heavy metals, resistance, accumulation.

Загрязнение объектов окружающей среды опасными отходами, органическими загрязнителями, тяжелыми металлами (ТМ) и пластиком отрицательно сказывается на

природной экосистеме в ущерб живым организмам. Металлы попадают в водные и наземные экосистемы в результате деятельности промышленных предприятий [1]. Сегодня практически отсутствуют незагрязненные ТМ территории, что представляет экологическую опасность для всего живого ввиду повышенной токсичности, небиоразлагаемости и стойкости металлического загрязнения [8].

Ионы ТМ легко аккумулируются в клетках по системам транспорта щелочных и щелочноземельных металлов, занимая их место в процессах метаболизма [10]. Наиболее часто в загрязненных объектах встречаются такие ТМ, как Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Mo, Pb и Zn [6]. По статистическим данным за 2021 г., фоновое содержание ТМ 1 класса опасности (кадмия, ртути, свинца) в поверхностных водах РФ соответствовало диапазонам значений от 0,02 до 3,0 мкг/л Cd (ПДК 0,001 мг/л), от 0,21 до 0,67 мкг/л Hg (ПДК 0,5 мкг/л) и от 0,28 до 1,62 мкг/л Pb (ПДК 0,03 мг/л) [4, 7].

Для решения проблемы загрязнения тяжелыми металлами требуются эффективные стратегии защиты окружающей среды и экономически выгодные технологии биоремедиации с использованием микроорганизмов [2, 9]. Цель настоящего исследования – изучение потенциала устойчивости непатогенных актиномицетов к ионам ТМ и создание микробной ассоциации на основе высокоустойчивых штаммов, пригодной для очистки промышленных сточных вод от ионов Cd^{2+} , Cr^{6+} , Cu^{2+} , $Fe_{общ.}$, Hg^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} .

Материалы и методы. В работе использовали штаммы актиномицетов *Gordonia paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 560 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним коллекции ИЭГМ, УНУ/ЦКП 73559/480868, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, <http://www.iegmcoll.ru>). Бактериальные клетки предварительно выращивали на мясопептонном агаре в течение 48 ч. В работе использовали соли ТМ: $ZnSO_4 \times 7H_2O$, $Pb(NO_3)_2$, K_2CrO_4 , $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$, $NiSO_4 \times 7H_2O$, $CuSO_4 \times 5H_2O$, $(CH_3COO)_2Cd \times 2H_2O$, $HgCl_2$, MnO_2 , $MnSO_4 \times 7H_2O$, $MgSO_4 \times 7H_2O$ в концентрации от 0,02 до 1280,00 мМ. Для определения количественной характеристики резистентности свободных клеток актиномицетов к экотоксиканту использовали показатель минимальной ингибирующей концентрации (МИК) [5]. Влияние ТМ на морфологию и рельеф поверхности клеток исследовали с использованием системы атомно-силового (АСМ) сканирования MFP-3D-BIOTM (Asylum Research Inc., США).

Для изучения устойчивости иммобилизованных бактерий в качестве сорбента использовали отходы древесной промышленности – сосновые опилки. Степень адсорбции клеток на носителе оценивали с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 UV/Vis (Perkin-Elmer, США) по показателю оптической плотности ($\lambda=600$ нм) клеточной суспензии. Жизнеспособность бактериальных клеток определяли по появлению мутности в питательной среде, а также специфическому окрашиванию хлоридом йодонитротетразолия на 7 сут эксперимента. Для оценки локализации генов, кодирующих признак устойчивости бактерий к ТМ, применяли метод горизонтального гель-электрофореза выделения плазмидной ДНК в агарозном геле.

В качестве контроля использовали маркер длин ДНК из 10 фрагментов в диапазоне от 100 до 1000 п.н. Поиск возможных генов, кодирующих белки, обуславливающие резистентность к ТМ, проводили с помощью базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) и сервера RAST (<https://rast.nmpdr.org/rast.cgi>), используя данные полногеномного секвенирования. Для очистки модельной сточной воды (МСВ) использовали лабораторный колоночный биореактор и модель биореактора с перемешиванием, заполненные носителем с иммобилизованными бактериальными клетками. Степень адсорбции клеток контролировали с помощью спектрофотометра. В качестве контроля использовали неинокулированный носитель. МСВ соответствовали элементному составу ТМ промышленных предприятий (табл. 1). Исходное содержание ТМ принимали за 100%. Эксперименты проводили в течение 7 сут. Остаточное

содержание ТМ регистрировали с помощью атомно-абсорбционного спектрометра “МГА-1000” (Люмэкс, Санкт-Петербург). Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

Таблица 1

Элементный состав модельных сточных вод промышленных предприятий

ТМ	Концентрация ТМ, мг/л		
	МСВ № 1	МСВ № 2	МСВ № 3
Cd ²⁺	<0,005	–*	0,001
Cr ⁶⁺	0,008	0,200	0,006
Cu ²⁺	0,270	0,200	0,004
Fe _{общ.}	0,653	0,050	0,284
Hg ²⁺	0,022	4,500	0,003
Mg ²⁺	<0,050	0,600	0,008
Mn ²⁺	0,005	–*	0,159
Ni ²⁺	–*	–*	0,034
Pb ²⁺	–*	–*	0,002
Zn ²⁺	–*	–*	0,021

Примечание: МСВ № 1 – ОАО “ВОЛГОЦЕММАШ”, Тольятти; МСВ № 2 – ОАО “Уральский оптико-механический завод” имени Э.С. Яламова”, гальванический цех, Екатеринбург; МСВ № 3 – Усольская промышленная зона “р. Ангара, канава гидрозолоудаления (ГЗУ)”, г. Усолье-Сибирское; * – ТМ не входит в состав МСВ.

Результаты. По нашим данным, устойчивость исследованных штаммов к ТМ находилась в диапазоне от 0,08 до 1280,00 мМ в зависимости от физико-химических характеристик того или иного металла. По степени токсичности в отношении микробной ассоциации ТМ распределены в ряд: Hg²⁺ > Cd²⁺ > Zn²⁺ > MoO₄²⁻ > Cu²⁺ > CrO₄²⁻ > Ni²⁺ > Pb²⁺ > Mn⁴⁺ > Mn²⁺. В присутствии ТМ бактериальные клетки демонстрировали высокую (80–100 %) степень жизнеспособности. Как видно из табл. 2, иммобилизованные клетки проявляли большую устойчивость к ТМ по сравнению с нативными (табл. 2). Так, устойчивость к Mo⁶⁺ и Hg²⁺ клеток *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 повышалась в 4,0 раза, в 2,0 раза – к Pb²⁺, Cr⁶⁺ и Zn²⁺, клеток *R. ruber* ИЭГМ 560 – в 15,6 раз к Hg²⁺, в 2,0 раза – к Cd²⁺, Mo⁶⁺, Cr⁶⁺ и Zn²⁺.

Таблица 2

Устойчивость к ТМ свободных и иммобилизованных актиномицетов

ТМ	МИК, г/л			
	<i>G. paraffinivorans</i> ИЭГМ 735		<i>R. ruber</i> ИЭГМ 560	
	Свободные	Иммобилизованные	Свободные	Иммобилизованные
Cd ²⁺	17,90	17,90	8,95	17,90
Cr ⁶⁺	16,61	33,22	4,15	8,30
Cu ²⁺	0,32	0,32	0,64	0,64
Hg ²⁺	0,02	0,08	0,02	0,32
Mg ²⁺	157,67	157,67	157,67	157,67
Mn ²⁺	151,01	151,01	24,16	24,16
Mn ⁴⁺	111,30*	111,30*	111,30*	111,30*
Mo ⁶⁺	3,36	13,44	6,72	26,88
Ni ²⁺	75,14	75,14	75,14	75,14
Pb ²⁺	8,29	16,58	33,16*	33,16*
Zn ²⁺	10,46	20,92	5,23	10,46

Примечание – * – выше пределов растворимости соли.

Экспериментально обосновано изменение размеров (уменьшение длины до 1,5 раз) и шероховатости (снижение до 2,3 раз) клеточной поверхности у штамма *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 (рис. 1) в присутствии ТМ по сравнению с контролем.

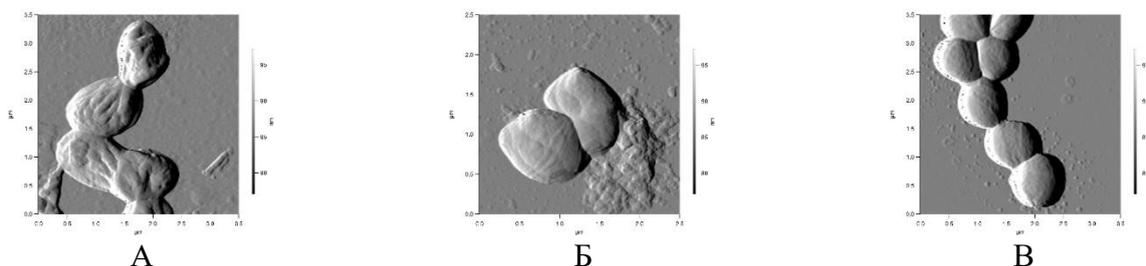


Рисунок 1. Клетки *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735, АСМ, 24 ч
А – МПБ, биотический контроль; Б – МПБ + Cd^{2+} (5,00 мМ); В – МПБ + Cr^{6+} (5,00 мМ)

Так, при воздействии кадмия наблюдалось нарушение мембран и клеточной стенки, нередко выход содержимого клетки в среду, в некоторых случаях – лизис клетки (рис. 1 Б), при этом жизнеспособность составляла 45–55%. При воздействии хрома (рис. 1 В), регистрировали формирование клеточных конгломератов, что, по-видимому, снижает негативное воздействие металла на бактериальную клетку. При воздействии ТМ на клетки *R. ruber* ИЭГМ 560 (рис. 2) также выявлены изменения размеров клеток (уменьшение длины более чем в 2,5 раза) и степени шероховатости клеточной поверхности (снижение до 2,3 раз) по сравнению с контролем.

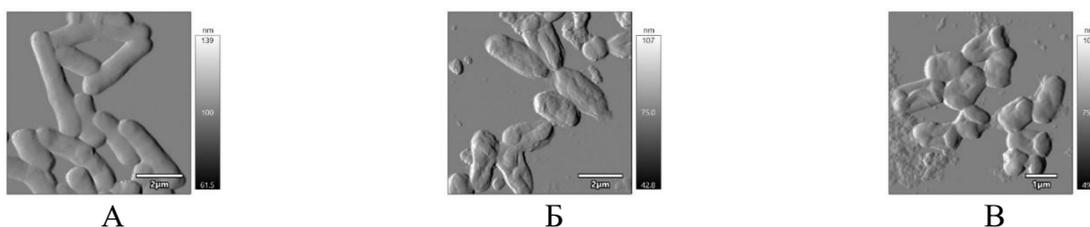


Рисунок 2. Клетки *R. ruber* ИЭГМ 560, АСМ, 24 ч
А – МПБ, биотический контроль; Б – МПБ + Cd^{2+} (5,00 мМ); В – МПБ + Cr^{6+} (5,00 мМ)

При воздействии сублетальных концентраций ТМ сохранялась исходная морфология клетки, не наблюдался лизис клеток. Однако при этом нарушалась внешняя мембрана и происходил выход клеточного содержимого (рис. 2 Б, рис. 2 В). Жизнеспособность сохраняется на уровне 65–75%. Проведенное исследование при помощи горизонтального гель-электрофореза выявило отсутствие плазмид, что свидетельствует о хромосомном характере устойчивости использованных в работе штаммов к ТМ. В результате биоинформатического анализа были обнаружены (рис. 3) наиболее распространенные подсистемы кодирующих последовательностей, которые могут обуславливать устойчивость актиномицетов к ТМ. Нуклеотидные последовательности отвечают за синтез продуктов: транспортные белки; регуляторы транскрипции РНК; транспортеры катионов двухвалентных металлов; редуктазы Hg^{2+} ; семейство белков устойчивости к Co, Zn, Cd, Cr, Ni; белки сборки цитохром-С-оксидаз и прочее.

По нашим данным, иммобилизованные на носителе актиномицеты способны к аккумуляции ТМ из МСВ. Условия проводимых экспериментов (состав МСВ, начальная концентрация ТМ, варианты очистки) влияли на процесс аккумуляции ТМ. Количество осевших на поверхность носителя клеток составляло 81,9–88,7%. При проведении процесса биоочистки (табл. 3) МСВ №1 с использованием бактериальной ассоциации в биореакторе с перемешиванием и колоночном биореакторе наблюдали полное (100%) извлечение Pb^{2+} и Zn^{2+} .

Остальные ТМ аккумулировались в диапазоне от 54,6 до 99,4%. Очистка МСВ № 2 в колоночном биореакторе от ионов Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} и Cr^{6+} составила 100%, $\text{Fe}_{\text{общ.}}$ – 96,7 %, в биореакторе с перемешиванием – 85,4–99,9 %. Очистка МСВ № 3 от ионов Pb^{2+} в колоночном биореакторе составила 100 %, в биореакторе с перемешиванием извлечение ТМ достигало 42,7–99,9 %. Очистка с помощью неинокулированного носителя не показала достоверно значимых изменений содержания ТМ.



Рисунок 3. Число кодирующих последовательностей у *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560

Таблица 3

Извлечение ТМ из модельных сточных вод с помощью бактериальной ассоциации

ТМ	Аккумуляция ТМ, %				
	Биореактор с перемешиванием				Консорциум, колоночный биореактор
	Носитель (контроль)	ИЭГМ 735	ИЭГМ 560	Консорциум	
Модельная сточная вода № 1					
Cd^{2+}	10,0	96,0	96,0	94,0	100,0
Cr^{6+}	4,5	61,8	4,5	67,7	54,6
Cu^{2+}	5,0	87,5	76,3	72,5	63,5
$\text{Fe}_{\text{общ.}}$	0,0	4,4	1,0	45,0	38,6
Ni^{2+}	3,6	99,1	98,5	98,9	99,4
Pb^{2+}	10,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Zn^{2+}	8,6	100,0	100,0	100,0	100,0
Модельная сточная вода № 2					
Cr^{6+}	9,2	99,4	98,8	99,9	100,0
Cu^{2+}	10,0	99,9	98,3	99,2	100,0
$\text{Fe}_{\text{общ.}}$	6,7	91,6	90,8	90,3	96,7
Ni^{2+}	5,0	99,6	95,5	97,5	100,0
Zn^{2+}	8,0	85,4	88,2	96,8	100,0
Модельная сточная вода № 3					
Cd^{2+}	5,8	56,0	58,6	80,7	86,5

Cr ⁶⁺	10,9	56,4	79,9	84,3	89,9
Cu ²⁺	8,9	42,7	60,8	81,9	86,0
Fe _{общ.}	6,7	56,3	53,2	60,6	63,4
Hg ²⁺	8,1	47,9	52,1	76,4	77,5
Mg ²⁺	6,3	62,5	59,6	71,7	70,9
Mn ²⁺	2,5	96,0	96,1	96,7	97,7
Ni ²⁺	4,6	86,8	85,3	88,3	91,2
Pb ²⁺	6,7	99,0	98,5	99,9	100,0
Zn ²⁺	7,6	74,4	69,7	69,3	78,6

Заключение. В результате проведенных исследований выявлены морфофизиологические изменения в клетках *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560, возникающие при стрессе в ответ на воздействие ТМ. Результаты очистки МСВ позволяют рассматривать иммобилизованный на носителе консорциум непатогенных актиномицетов *G. paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *R. ruber* ИЭГМ 560 в качестве потенциального агента биоаккумуляции ТМ. По результатам экспериментальной работы получен патент на изобретение [3].

Благодарности. Исследования выполнены в рамках госзадания 124020500028-4 при использовании оборудования ЦКП “Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов” и “Исследование материалов и веществ” Пермского федерального исследовательского центра Уральского отделения Российской академии наук.

Библиографический список

1. Булаев А.Г. Биотехнологические методы очистки сточных вод цветной металлургии // Биотехнология. 2015. № 3. С. 8–29.
2. Вертинский А.П. Физико-химические методы очистки сточных вод: проблемы, современное состояние и возможные пути усовершенствования // Инновации и инвестиции. 2019. № 11. С. 257–261.
3. Гольщева А.А., Литвиненко Л.В., Ившина И.Б. Иммобилизованная микробная ассоциация *Gordonia paraffinivorans* ИЭГМ 735 и *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 560 – активный аккумулятор тяжелых металлов. Патент РФ 2818318. Приоритет изобр. 13.12.2023. Зарег. в Госреестре изобр. РФ 02.05.2024. Бюл. № 13.
4. ГОСТ Р 70281-2022 от 5.10.2022 г. “Охрана окружающей среды. Почвы. Классификация химических веществ для контроля загрязнения”.
5. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костина Л.В. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов // Экология. 2013. № 2. С. 115–123.
6. Основные показатели охраны окружающей среды. Статистический бюллетень. М.: Федеральная служба государственной статистики. 2021. С. 24–33.
7. Черногаева Г.М. Обзор состояния и загрязнения окружающей среды в Российской Федерации за 2021 год. М.: Росгидромет. 2022. 220 с.
8. Abdel-Ghani N., El-Chagbaby G. Biosorption for metal ions removal from aqueous solutions: A review of recent studies // Int. J. Latest Res. Sci. Technol. 2014. No.3. P. 24–42.
9. Alvarez A. et al. Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals // Chemosphere. 2017. Vol. 166. P. 41–62.
10. Shen Z. et al. Ecological and health risks of heavy metal on farmland soils of mining areas around Tongling City, Anhui, China // Environ. Sci. Pollut. Res. 2019. Vol. 26. P. 15698–15709.