

2. ЕКОЛОГІЯ ДОВКІЛЛЯ

УДК 579.8:[54-38:546.7]

Проф. О.Ф. Рильський, д-р біол. наук –
Запорізький національний університет

ВПЛИВ СУМІШІ СОЛЕЙ ДЕЯКИХ МЕТАЛІВ НА СИНТЕЗ ПІГМЕНТУ У *SERRATIA MARCESCENS* ПРИ ВНЕСЕННІ ЇХ У СЕРЕДОВИЩЕ В РІЗНИХ ФАЗАХ РОСТУ КУЛЬТУРИ

Досліджено, що найбільший ефект інгібування синтезу пігменту спостерігається в разі нанесення суміші металів на культуру *S. marcescens* через 0,5 год після засіву на поживне середовище. Більша концентрація металу (100 мг/дм³) блокує синтез пігменту повністю протягом всього часу спостереження, а за концентрації 50 мг/дм³ відбувається синтез пігменту, але значно слабкіше порівняно з контролем (≈ 50 %).

Ключові слова: пігментосинтезувальна здатність, важкі метали, лог-фаза.

Відомо, що внесення розчинних солей металів у рідке живильне середовище в різних фазах росту бактерій по-різному впливає на життєдіяльність бактеріальної культури. Найбільш чутливими клітини бактерій є у лог-фазі. У літературі є багато робіт з цього приводу [1-5]. Але використання пігментосинтезувальних бактерій як біоіндикаторів забруднення довкілля металами передбачає дослідження їх розвитку не тільки в рідкому середовищі, але й на поверхні твердого живильного середовища, наприклад, м'ясо-пептонного агару (МПА), горохового агару тощо. Тому виникла необхідність вивчити, як будуть впливати на ріст і пігментосинтезувальну здатність бактерій метали, які вносять на МПА не одночасно з культурою, а з певним часовим інтервалом після засіву бактерій на тверде середовище.

Мета роботи – вивчення впливу важких металів на синтез пігменту у бактерій *Serratia marcescens* залежно від часу нанесення металів на поверхню поживного середовища після посіву культури на МПА.

Матеріали і методика досліджень. Розчин суміші солей Ni (NO₃)₂·6H₂O, Cu (NO₃)₂·3H₂O, Pb (NO₃)₂ та Zn (NO₃)₂·6H₂O наносили на поверхню МПА у вигляді аерозолю через 1, 4, 12, 14 та 24 год після посіву *S. marcescens* суцільним газомом за допомогою скляного шпателью. Суміші солей металів готували з їх розчинів у 2-х концентраціях – 50 і 100 мг/л, тобто концентрація кожного металу в суміші була 50 або 100 мг/дм³. Оцінку інтенсивності росту та синтезу пігменту культурою проводили через 24 та 48 год.

Результати дослідження наведено у табл. 1 та на рис. 1-3.

Отримані результати свідчать про те, що найбільше інгібування синтезу пігменту продигіозину і затримка росту культури спостерігається за умов внесення суміші металів на початку її розвитку (на першу та четверту години росту) (рис. 1). Такий ефект може вказувати на те, що найбільш вразливими структурами клітини є ферментні системи та місця їх локалізації, адже відомо, що найбільш інтенсивно процес перебудови ферментативних систем бактеріальної клітини протікає в перші години після внесення культури в нове середовище.

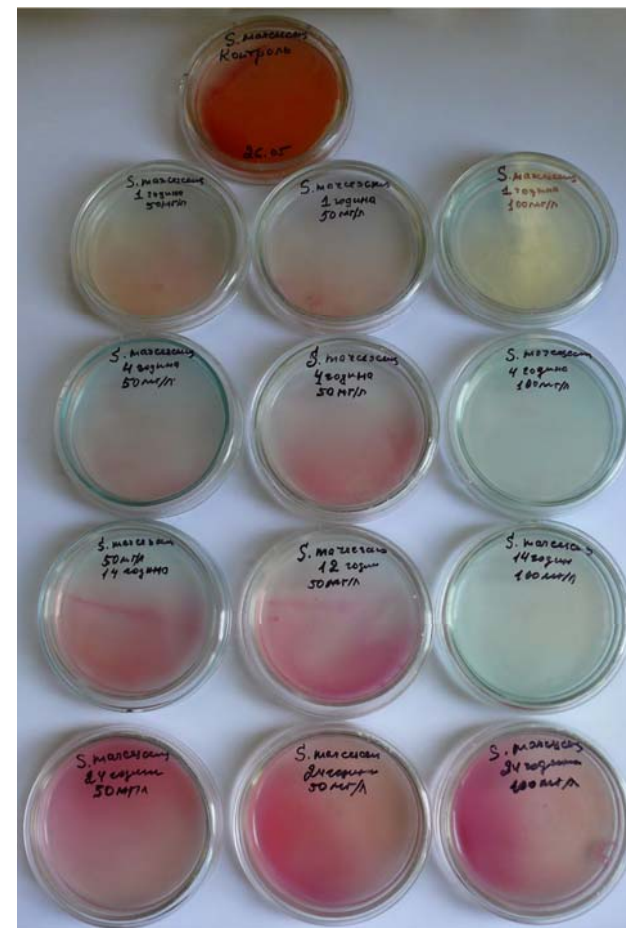


Рис. 1. Динаміка пігментоутворення культурою *S. marcescens* при нанесенні суміші металів (50, 100 мг/дм³) з різним часовим інтервалом (фото зроблено через 24 год)

Табл. 1. Вплив суміші важких металів на синтез пігменту у *Serratia marcescens* залежно від фази росту культури

Години внесення суміші металів після засіву культури	1 доба				2 доба			
	50 мг/дм ³		100 мг/дм ³		50 мг/дм ³		100 мг/дм ³	
	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
1	3	±	–	–	4	4	1	2
4	3	1	–	–	4	4	1	1
12	3	2	–	–	4	4	2	1
14	3	3	3	1	4	4	1	1
24	4	4	4	4	4	4	4	4

Примітка: 4 – суцільний ріст або пігментоутворення; 3 – добрий ріст або пігментоутворення; 2 – помірний ріст або пігментоутворення; 1 – слабкий ріст або пігментоутворення.

ментоутворення; — — відсутність росту та/або пігментоутворення; ± — наявність пігментних і безпігментних колоній.

Внесення металів через 24 год майже не змінює синтез пігменту тому, що його інтенсивність, на цей час, близька до інтенсивності пігменту в контролі. Найбільш вразливим синтез пігментів бактерій є за внесення металів через 4 год після засіву на поживне середовище. При цьому вища концентрація суміші металів (100 мг/дм^3) спричиняє більший інгібуючий ефект на синтез пігменту продигіозину (рис. 1-3).

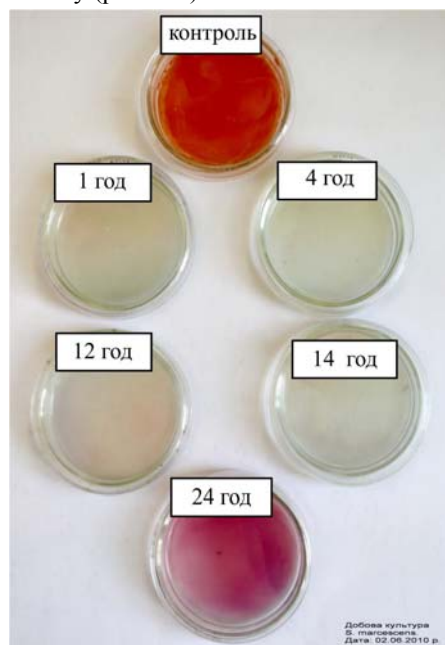


Рис. 2. Динаміка пігментоутворення *S. marcescens* при нанесенні суміші металів (100 мг/дм^3) з різним часовим інтервалом (фото через 24 год)

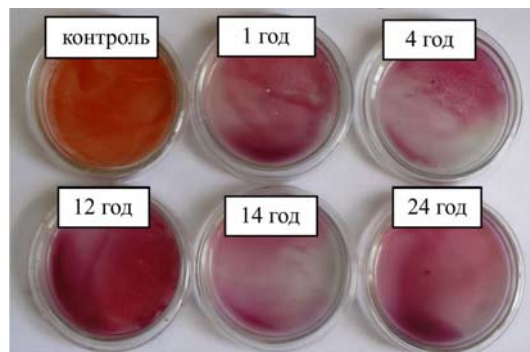


Рис. 3. Динаміка пігментоутворення *S. marcescens* при нанесенні суміші металів (100 мг/дм^3) з різним часовим інтервалом (фото через 48 год)

Окремо досліджували, як впливає на синтез продигіозину та якісний стан пігментації послідовне внесення суміші металів на поверхню засіяної на МПА бактеріальної культури з інтервалом (крок нанесення) у 0,5 год, 1 добу, 2, 3, 4-7 діб. Перше нанесення розчину суміші металів об'ємом 1,8 мл проводили через 0,5 год після засіву культури *S. marcescens* на МПА. Такої кількості розчину достатньо, щоб шляхом коливання чашки Петрі провести рівномірний розподіл розчину по всій поверхні чашки. Перше фотографування чашок робили через 24 год культивування бактерій у термостаті за $27-29^\circ\text{C}$ (рис. 4).

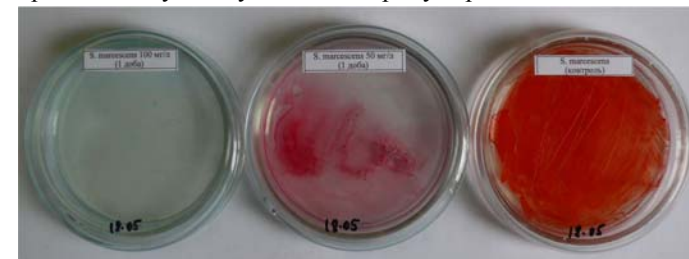


Рис. 4. Стан культури *S. marcescens* через добу після нанесення розчину суміші металів (час нанесення суміші 0,5 год після засіву культури)

Далі через кожну добу протягом 7 діб на поверхню МПА з культурою наносили розчин суміші металів об'ємом $1,8 \text{ см}^3$ і спостерігали за змінами кольору пігменту бактерій (рис. 5-7). Фотографування чашок здійснювали в однакових умовах освітлення [6]. Вибір часового інтервалу, протягом якого наносили розчин суміші металів (7 діб), обумовлений врахуванням можливого пролонгованого часу інгібування росту культури.



Рис. 5. Стан культури *S. marcescens* при нанесенні розчину суміші металів через 3 доби після засіву культури



Рис. 6. Стан культури *S. marcescens* при нанесенні розчину суміші металів через 4 доби після засіву культури

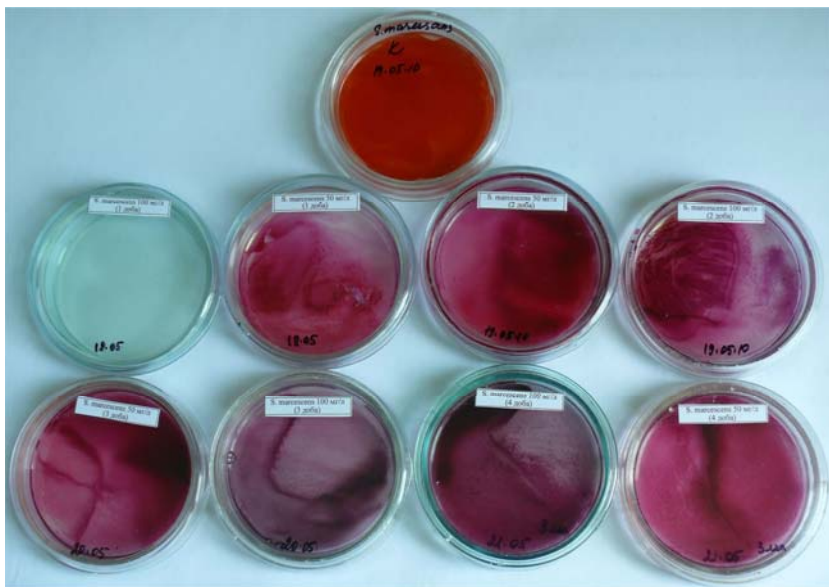


Рис. 7. Результати дослідів, які враховують інтервал нанесення суміші металів на газон культури *S. marcescens* (інтервал нанесення від 0,5 год до 7 діб)

Загальні результати дослідів наведено в табл. 2. З'ясувалося, що найбільший ефект інгібування синтезу пігменту спостерігається при нанесенні суміші металів на культуру через 0,5 год після засіву на МПА. Причому, більша концентрація металу (100 мг/дм³) блокувала синтез пігменту майже повністю протягом всього часу спостереження, а за концентрації 50 мг/дм³ відбувався синтез пігменту, але значно слабше порівняно з контролем ($\approx 50\%$). Внесення розчину металів на поверхню МПА з бактеріальною культурою, починаючи з 2-ї доби, майже не впливало на інтенсивність пігменту, але змінювало його колір з темно-червоного на темно-синій. Інтенсивність темно-синього кольору була більшою у варіанті, де концентрація суміші була 100 мг/дм³.

Табл. 2. Вплив суміші важких металів на синтез пігменту у *S. marcescens* при нанесенні розчину металів через 0,5 год після засіву культури на МПА

Доба	50 мг/дм ³		100 мг/дм ³	
	Ріст	Пігмент	Ріст	Пігмент
Контроль (культура на МПА без металу)	++++	++++	++++	++++
0,5 год	++	+	+	-
1	+++	+++	+++	+++
2	++++	++++	++++	+++
3	++++	++++	++++	+++
4	++++	++++	++++	+++
7	++++	++++	++++	++++

Висновки. Найбільший ефект інгібування синтезу пігменту спостерігається при нанесенні суміші металів на культуру через 0,5 години після засіву на МПА. Концентрація металу блокувала синтез пігменту повністю протягом всього часу спостереження. Нанесення розчину металів на поверхню МПА з бактеріальною культурою, починаючи з 2-ї доби, не впливало на інтенсивність пігменту.

Література

1. Черникова А.А. Накопление меди и марганца в клетках цианобактерии *Spirulina platensis* : автореф. дисс. на соискание учен. степени канд. биол. наук: спец. 03.00.12 "Физиология и биохимия растений" / А.А. Черникова. – М., 2009. – 18 с.
2. Tumanov A.A. Combined Effects of Heavy Metal Ions on Bacteria and the Determination of Heavy Metals by Bioassay / A.A. Tumanov, P.A. Krest'yaninov // Journal of Analytical Chemistry. – 2004. – Vol. 59, № 8. – Pp. 788-794.
3. Dilek F.B. Combined effects of Ni (II) and Cr (VI) on activated sludge / F.B. Dilek, C.F. Gokcay, U. Yetis // Water Research. – 1998. – Vol. 32, № 2. – Pp. 303-312.
4. Gikas P. Single and combined effects of nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review / P. Gikas // J. Hazard Mater. – 2008. – Vol. 30, № 159 (2-3). – Pp. 187-203.
5. Hsin-I Huang In vitro efficacy of copper and silver ions in eradicating *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Acinetobacter baumannii*: Implications for on-site disinfection for hospital infection control / Hsin-I Huang, Hsiu-Yun Shih, Chien-Ming Lee, T.C. Yang, Jinn-Jyi Lay, Yusen E. Lin // Water Research. – 2008. – Vol. 42 (1-2). – Pp. 73-80.
6. Patent for useful model № 49812 Ukraine, MPK (2009), C12Q 1/00, C12M 1/00, C12M 1/34. Way of determination of intensity of chromogenesis at bacteria / Rylsky A.F., Dombrovsky K.O., Gorokhovskiy E.Yu., Zhilenko A.V.; applicant and patent holder of ZNU. It is declared 30.11.2009; it is published 11.05.2010. Bulletin. – 2010. – № 9.

Рыльский А.Ф. Влияние смеси солей некоторых металлов на синтез пигмента у *Serratia marcescens* при внесении их в среду в разных фазах роста культуры

Исследовано, что наибольший эффект ингибирования синтеза пигмента наблюдается при нанесении смеси металлов на культуру *S. marcescens* через 0,5 часа после посева на питательную среду. Большая концентрация металла (100 мг/дм³) блокирует синтез пигмента полностью в течение всего времени наблюдения, а при концентрации 50 мг/дм³ происходит синтез пигмента, но значительно слабее в сравнении с контролем ($\approx 50\%$).

Ключевые слова: пигментсинтезирующая способность, тяжелые металлы, лог-фаза.

Rylsky A.F. Influence of salts mix of some metals on pigment synthesis at *Serratia marcescens* at their introduction in medium in different growth phases of culture

It was investigated that the greatest effect of inhibition of synthesis of a pigment is observed when drawing a mix of metals on culture of *S. marcescens* in 0,5 hours after crops on a nutrient medium. Big concentration of metal (100 мг/дм³) blocks pigment synthesis completely during the whole time of supervision, and at concentration of 50 мг/дм³ there is a pigment synthesis, but is much weaker in comparison with control ($\approx 50\%$).

Keywords: pigment synthesizing capacity, heavy metals, log-phase.