

УДК 546.48: 546.73: 546: 56: 546.815/.819:546.47 + 579

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РАЗМНОЖЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ^{1,2} Бузолёва Л.С., ¹Кривошеева А.М.¹ФГБУ НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН, Владивосток;²ФГОАУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет, Владивосток,
e-mail: buzoleva@mail.ru

Представлены результаты изучения влияния тяжёлых металлов (Co^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) на размножение патогенных бактерий: *Listeria monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 4b), *Yersinia pseudotuberculosis* (2781, 3515, 907), *Escherichia coli* (1147), *Staphylococcus aureus* (6538p/206p). Подобраны минимальные ингибирующие концентрации (МИК) солей тяжёлых металлов, при которых рост патогенных бактерий угнетался на 50% по сравнению с контролем. Показано, что патогенные бактерии обладают механизмами металл-резистентности, при этом установлены разные значения МИК используемых ионов, как на уровне видов бактерий, так и на уровне штаммов, что предполагает реализацию разных механизмов устойчивости бактерий к тяжёлым металлам. Штаммы, растущие на подобранных МИК тяжёлых металлов, являются моделью для изучения факторов патогенности и изменения биологических свойств исследуемых бактерий.

Ключевые слова: окружающая среда, тяжёлые металлы, патогенные бактерии, минимальная ингибирующая концентрация (МИК)

EFFECTS OF HEAVY METALS ON PATHOGENS BACTERIA^{1,2}Buzoleva L.S., ¹Krivosheeva A.M.¹Research Institute of Epidemiology and Microbiology of G.P. Somova RAMS, Vladivostok;²Far Eastern Federal University, Vladivostok, e-mail: buzoleva@mail.ru

The results of studying the effect of heavy metals (Co^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}) on the pathogenic bacteria: *Listeria monocytogenes* (1/2A, 1/2b, 4b), *Yersinia pseudotuberculosis* (2781, 3515, 907), *Escherichia coli* (1147), *Staphylococcus aureus* (6538r/206r) was presented. minimum of inhibitory concentration (MIC) of heavy metals, in which the growth of pathogenic bacteria which inhibited by 50% compared with the control was selected. It was shown that pathogenic bacteria has mechanisms of metal resistance, with MIC values have different ions are used at both the bacteria and the level of strain, which involves the implementation of different mechanisms of bacterial resistance to heavy metals. Strains which growing on selected MICs of heavy metals are a model for the study of pathogenicity factors and changes in the biological properties of the studied bacteria.

Keywords: environment, heavy metals, pathogenic bacteria, the minimum inhibitory concentration (MIC)

Патогенные микроорганизмы, способные обитать в объектах окружающей среды, относятся к возбудителям сапрозоонозов или факультативным паразитам. К настоящему времени число микроорганизмов, характерной особенностью которых является способность вести как сапрофитный, так и паразитический образ жизни, неуклонно растёт. Известно, что изменение природных абиотических факторов среды (температура, солёность, pH, влажность, кислородный режим, питательный субстрат) приводит к изменению биологических свойств патогенных бактерий, включая вирулентность [6]. Современная окружающая среда испытывает мощное влияние факторов антропогенного характера, к числу которых можно отнести тяжёлые металлы, определённым образом воздействующие и на микроорганизмы.

Тяжёлые металлы играют двойственную роль в процессах жизнедеятельности микроорганизмов. Некоторые из них – Mo, Cu, Mn, Zn, Ni являются жизненно необходимыми в небольших количествах. Так, общеизвестно, что ионы металлов входят

в состав многих биологически важных макромолекул (ферментов, гормонов, витаминов, дыхательных пигментов, липидов и т.д.) и являются их необходимой частью, без которой не реализуется их физиологическая функция. Другие – Cd, Pb, Sn, Hg, Ag, Co – не выполняют биологических функций, однако, при высоких концентрациях все эти элементы, за счёт хорошей способности к комплексообразованию, являются чрезвычайно токсичными для микробов. Они могут взаимодействовать с гидроксильными, карбоксильными, фосфатными, сульфгидрильными и аминокетильными, вызывая изменения свойств белков, нуклеотидов, коферментов, фосфолипидов, в состав которых входят перечисленные группировки, а также токсичность проявляется в нарушении процессов окислительного фосфорилирования и поддержания осмотического баланса клеток. Металлы могут влиять на процессы, протекающие в клетке, только проникая внутрь её и фиксируясь на субклеточных мембранах [8].

К настоящему времени установлено, что клетки разных микроорганизмов способны

аккумулировать тяжёлые металлы в количествах, намного превышающих потребность в них как в компонентах питания. Накопление металла приводит к его значительному концентрированию в клетках по отношению к среде. Из литературных данных известно, что микроорганизмы проявляют устойчивость фактически ко всем тяжёлым металлам [10].

Общим механизмом действия разных тяжёлых металлов является ингибирование ими дыхания у микроорганизмов. Этот эффект в ряде случаев, но не во всех, наблюдается при сравнительно более высоких концентрациях металлов, чем те, которые ингибируют рост [4]. Известно, что при действии тяжёлых металлов в клетках микроорганизмов происходит целый ряд дегеративных изменений, которые могут вести к ингибированию их размножения. Так, под действием тяжёлых металлов наблюдаются изменения в содержании и синтезе основных полимеров в клетках. Тяжёлые металлы могут оказывать мутагенное действие на микроорганизмы, вызывая увеличение частоты мутаций, хромосомные aberrации или другие разрушения ДНК [3].

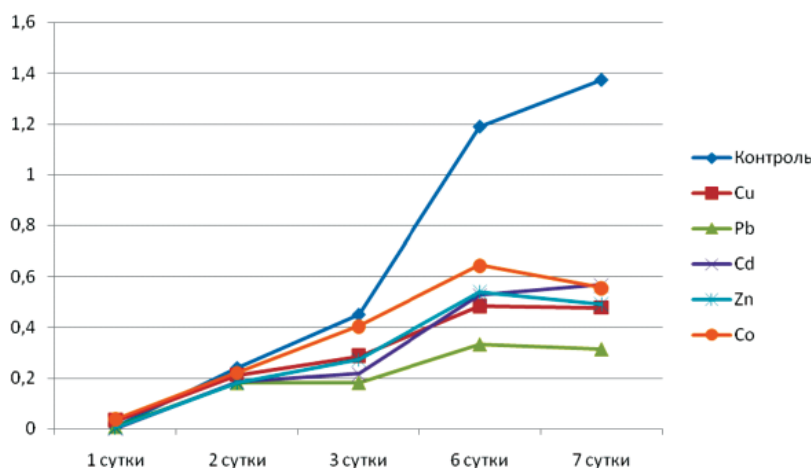
Цель исследования. Приведенные данные получены при изучении сапрофитных микроорганизмов, в отношении патогенных бактерий, способных существовать в объектах окружающей среды, такие исследования не проводились. Поэтому целью настоящей работы было определение минимальной ингибирующей концентрации катионов тяжёлых металлов, оказывающей влияние на размножение патогенных бактерий.

Материал и методы исследования

Объектами исследования были: *Listeria monocytogenes* (1/2a и 1/2b) – из коллекции НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалея; 4b – из коллекции ВГНКИ ветеринарных препаратов; *Yersinia pseudotuberculosis* (2781, 3515, 907), *Esherihia coli* (1147) – коллекция НИИЭМ, Владивосток; *Staphylococcus aureus* (6538p/206p) – ФТУЗ Хабаровская противочумная станция. Для приготовления жидких сред использовали основы следующего состава: для культивирования *L. monocytogenes* – бульон для листерий (рыбный бульон с аминным азотом 110 мг%, дрожжевой экстракт сухой 1%, глюкоза 0,2%, pH 7,3); для *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli* – бульон Хоттингера (pH 8); для *S. aureus* (6538p/206p) – сахарный бульон (бульон Хоттингера с 1% глюкозы). Подбирали минимальную ингибирующую концентрацию солей тяжёлых металлов.

Для изучения динамики роста исследуемых бактерий в средах, содержащих соли тяжёлых металлов, использовали одни и те же концентрации солей для *Y. pseudotuberculosis*, *L. monocytogenes*, *E. coli* и *S. aureus*. Предварительно штаммы подращивали в течение одних суток на плотных питательных средах, содержащих те же концентрации тяжёлых металлов, что и в жидкой среде. Динамику роста патогенных бактерий наблюдали в течение 7 дней при температуре 20–22°C. В качестве контрольных – использовали те же среды для культивирования бактерий, но без катионов металлов. Патогенные бактерии добавляли в питательные среды с солями тяжёлых металлов в дозе – 10³ КОЕ/мл. Численность бактерий определяли спектрофотометрически по оптической плотности (ОП) культуральной среды при λ 600 нм на спектрофотометре T70 UV/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd (Англия).

Ингибирующее действие катионов тяжёлых металлов на размножение патогенных бактерий определяли по изменению концентрации микроорганизмов в точке их максимального роста по отношению к контролю, выраженному в процентах: $OP_0^{600}/OP_K^{600} \cdot 100 - 100\%$ (100% – контроль) [1] (рисунок).



Динамика роста *Y. pseudotuberculosis* (шт. 3515) в питательном бульоне с солями тяжёлых металлов при температуре 20°C (6 сутки – точка сравнения результатов)

Результаты исследования и их обсуждение

Данные, полученные в результате исследования, представлены в таблице, из которой видно, что листерии, по сравнению

с другими тест-микроорганизмами, быстро откликаются на воздействие тяжелых металлов. Так, свинец, кобальт, цинк, медь и кадмий ингибировали рост *L. monocytogenes* уже на 2–3 сутки.

Минимальные ингибирующие концентрации (МИК) солей тяжелых металлов, определенные для патогенных бактерий (мг/л)

Штамм	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Zn ²⁺	Co ²⁺
<i>Y.pseudotuberculosis</i> (шт. 3515)	6 ± 0,4 (5)	98,2 ± 1,7(3)	0,8 ± 0,1 (3)	5,36 ± 1,1(5)	2 ± 0,1 (6)
<i>Y.pseudotuberculosis</i> (шт. 2781)	12 ± 0,2 (7)	98,2 ± 0,9 (7)	0,8 ± 0,1(7)	5,36 ± 1,3 (6)	2 ± 0,1 (7)
<i>Y.pseudotuberculosis</i> (шт. 907)	12 ± 0,2 (7)	98,2 ± 0,8 (7)	0,8 ± 0,15(6)	5,36 ± 1,1 (7)	2 ± 0,2(6)
<i>L. monocytogenes</i> (шт. 1/2b)	6 ± 0,4 (2)	98,2 ± 1,5(3)	0,8 ± 0,2(3)	5,36 ± 1,0(3)	2 ± 0,0 (3)
<i>L. monocytogenes</i> (шт. 1/2a)	12 ± 0,2 (2)	1960 ± 45(3)	0,8 ± 0,3 (3)	8,06 ± 1,0(3)	2 ± 0,1 (2)
<i>L. monocytogenes</i> (шт. 4b)	12 ± 0,1(2)	1960 ± 36(3)	1,6 ± 0,4(3)	8,06 ± 1,2 (3)	3 ± 0,4(3)
<i>E. coli</i> (1147)	12 ± 0,4 (7)	98,2 ± 1,5(7)	1,6 ± 0,3(7)	8,06 ± 1,1 (7)	3 ± 0,1 (6)
<i>S. aureus</i> (6538p/206p)	6 ± 0,3(7)	98,2 ± 1,8(3)	1,6 ± 0,2(7)	8,06 ± 1,0(7)	2 ± 0,2 (3)

Примечание. В скобках () указаны сутки, в течение которых произошло ингибирование.

Аналогичные результаты были получены и в отношении *S. aureus* при воздействии свинца и кобальта. Очевидно, что кобальт и свинец, поступающие в среду в результате техногенного загрязнения, оказывают быстрое угнетающее воздействие на процессы роста в большей степени грамположительных бактерий, по сравнению с грамотрицательными, что может быть связано с особенностью строения клеточной стенки. Так, у некоторых штаммов *S. aureus* тяжелые металлы вызывают конформационные изменения в клеточной мембране, обусловленные экспрессией плазмидных генов [7].

В условиях повышенных концентраций тяжелых металлов в среде у микроорганизмов могут происходить изменения в клеточной стенке, оболочке, цитоплазматической мембране. Эти процессы не всегда являются результатом токсического действия металлов. Они могут быть проявлением индуцируемых защитных механизмов, обеспечивающих ограничение поступления токсичных ионов в цитоплазму клетки и воздействия на жизненно важные клеточные компоненты [2].

В нашем эксперименте дольше всех реакция на воздействие тяжелых металлов наблюдалась у *E. coli* (6 и 7 сутки). Известно, что эти микроорганизмы относят к санитарно-показательным, хотя в последнее время отмечают их высокую устойчивость к факторам внешней среды [5]. В отноше-

нии *E. coli* известно, что поступление избыточных концентраций тяжелых металлов в клетку происходит за счёт индуцированного нарушения синтеза белка порина, участвующего в формировании транспортных каналов [9].

Если сравнивать полученные данные на уровне штаммов, то у иерсиний наблюдали стабильные результаты для всех штаммов в отношении взятых в эксперимент тяжелых металлов. Исключение составил штамм 3515, на который свинец и кадмий воздействовали быстрее, по сравнению с другими штаммами. У листерий особенно следует выделить шт. 1/2a и 4b *L. monocytogenes*, которые накапливали в больших количествах свинец (на два порядка выше по сравнению с остальными штаммами) прежде, чем он оказывал ингибирующее действие на рост бактерий. Тем не менее, у штамма 1/2b *L. monocytogenes* МИК свинца совпадали с таковыми для других штаммов, следовательно, металлы по-разному влияют на патогенные бактерии, даже на уровне штаммов, что возможно связано с их биологическими особенностями (выделены из разных мест обитания).

Действие МИК солей тяжелых металлов на размножение патогенных бактерий по мере их возрастания можно расположить в следующий ряд: Pb²⁺ > Cu²⁺ > Zn²⁺ > Co²⁺ > Cd²⁺. Так, в большей степени токсичны Cd²⁺ и Co²⁺, т.к. уже небольшие концентрации этих металлов угнетают размножение

исследуемых бактерий. В отношении тяжёлых металлов можно отметить, что МИК свинца, по сравнению с другими элементами, наиболее высок для всех штаммов, взятых в эксперимент. Следовательно, свинец в меньшей степени, по сравнению с другими тяжёлыми металлами, тормозит рост патогенных бактерий.

Заключение

Таким образом, патогенные бактерии в разной степени устойчивы к действию тяжёлых металлов. При этом скорость воздействия тяжёлых металлов на грамположительные бактерии выше по сравнению с грамотрицательными. Процессы размножения патогенных микроорганизмов в среде в большей степени тормозят кадмий и кобальт, и в меньшей степени – свинец, что может быть связано с механизмами проникновения и воздействия тяжёлых металлов на микробную клетку.

Список литературы

1. Зайцева О.В. Биотехнологические приемы оценки устойчивости сталеи к коррозии, вызываемой бактериаль-

ной сульфатредукцией, и пути повышения коррозионной устойчивости нефтегазового оборудования: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Уфа, 2009. – 23 с.

2. Алексеева А.Н., Анисимов Д.А., Хоменко В.А. Изменение состава белков оболочки и липополисахарида у кадмийустойчивых псевдомонад // Биол. Мембраны. – 1991. – Т.8. – № 8. – С. 800–804.

3. Иванова Е.П., Горшкова Н.М., Куриленко В.В. Толерантность к солям тяжёлых металлов морских протеобактерий родов *Pseudoalteromonas* и *Alteromonas* // Микробиология. – 2001. – Т. 70. – № 2. – С. 283–285.

4. Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондрачева Т.Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. – 2006. – Т. 75. – № 5. – С. 593–629.

5. Сбойчаков В.Б. Санитарная микробиология. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – С. 192.

6. Сомов Г.П., Бузолёва Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. – Владивосток: ОАО «Примполиграфкомбинат», 2004. – 167 с.

7. McEntee J.D., Woodrow J.R., Quirk A.V. Investigation of cadmium resistance in *Alcaligenes* sp. // Appl. Environ. Microbiol. – 1986. – Vol. 51. – P. 515–520.

8. Nies D.H. Microbial heavy-metal resistance // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 51. – P. 730–750.

9. Rouch D.A., Lee B.T.D., Morby A.P. Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial metal resistance // J. of Indust. Microbiol. 1995. – Vol. 14. – P. 132–141.

10. Silver S., Phung L.T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises // Annu. Rev. Microbiol. – 1996. – Vol 50. – P. 753–789.