

СПОСОБНОСТЬ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДОВ *DIETZIA*, *GORDONIA* И *RHODOCOCCLUS* АККУМУЛИРОВАТЬ ИОНЫ НИКЕЛЯ

© 2019 г. Л. В. Литвиненко*

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения
Российской академии наук – филиал Пермского федерального исследовательского центра
Уральского отделения Российской академии наук, Пермь, 614081 Россия

*e-mail: lkostina@list.ru

Поступила в редакцию 29.06.2017 г.

После доработки 30.10.2018 г.

Принята к публикации 30.11.2018 г.

Исследована способность актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, www.iegm.ru/iegmcol) аккумулятировать ионы никеля. Обсуждаются основные физико-химические факторы, определяющие условия поглощения никеля. Отобраны штаммы с высокой (до 95%) аккумулятирующей активностью, устойчивые к повышенным (до 10.0 мМ) концентрациям ионов никеля.

Ключевые слова: актинобактерии, аккумуляция, никель, тяжелые металлы, *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*

DOI: 10.1134/S002636561902006X

Интерес многих микробиологов направлен на проблемы загрязнения окружающей среды, в том числе такими опасными ксенобиотиками, как тяжелые металлы (ТМ). Прежде всего, внимание привлекают металлы, которые наиболее широко и в значительных объемах используются в производственной деятельности. В результате, они накапливаются во внешней среде и, учитывая их биологическую активность и токсические свойства, представляют серьезную опасность. К таким металлам относится никель. Для извлечения никеля из промышленных сточных вод возможно использование бактерий, обладающих устойчивостью к его высоким концентрациям, а также способностью активно аккумулятировать никель из объектов окружающей среды. В настоящее время достаточно подробно изучены и описаны механизмы гомеостаза микроорганизмов в отношении никеля (Hausinger, Zamble, 2007), а также белки с молекулярной массой 10–50 кДа, отвечающие за регуляцию ионов Ni^{2+} в микробных клетках (Nies, 2007; Choudhary, Sar, 2009). Никель, как и другие ТМ, способен неспецифически связываться с внеклеточными метаболитами бактерий, образуя с ними нерастворимые или слаборастворимые комплексы в виде фосфатов, сульфатов, сульфидов и других солей, а также специфически связываться с поверхностными структурами клеточной стенки (Костина и соавт., 2010).

Никель также может взаимодействовать с микробными клетками грамположительных и грамотрицательных бактерий, аккумулятируясь в них транспортными системами различной специфичности, в том числе относящимися к двухкомпонентным сигналпроводящим системам (Permina et al., 2006). Так, никель проникает через клеточную оболочку с помощью HoxN, NixA, NicT и NhlF белков (Fulkerson, Mobley, 2000; Hebbeln, Eitinger, 2004). Известно, что гены устойчивости к ионам Ni^{2+} локализованы на бактериальных плазмидах (Сиунова и соавт., 2002; Silver, Phung, 1996). Для *Ralstonia metallidurans* составлен каталог генов, отвечающих за устойчивость бактериальных клеток к никелю и ряду других ТМ (Mergeay et al., 2003).

В настоящее время имеется обширная информация о большой экологической значимости немитотических актинобактерий класса *Actinobacteria*, занимающего доминирующее положение в экстремальных местообитаниях и обладающего широкими метаболическими возможностями. Несмотря на то, что биология алканотрофных актинобактерий в последнее время находится в центре внимания исследователей, работы, касающиеся кинетики потребления ТМ клетками актинобактерий единичны (Ившина и соавт., 2002; Пешкур, Ившина, 2003; Dabbs, Sole, 1988; Mirimanoff, Wilkinson, 2000; Bell et al., 2004).

Таблица 1. Перечень штаммов, использованных в работе

Род	Вид	Номер штамма в коллекции ИЭГМ
<i>Dietzia</i>	<i>maris</i>	ИЭГМ 45, ИЭГМ 55 ^T , ИЭГМ 166, ИЭГМ 291, ИЭГМ 317
<i>Gordonia</i>	<i>rubripertincta</i>	ИЭГМ 95 ^T , ИЭГМ 96, ИЭГМ 105, ИЭГМ 106, ИЭГМ 128
	<i>terrae</i>	ИЭГМ 143 ^T , ИЭГМ 144, ИЭГМ 146, ИЭГМ 147, ИЭГМ 151, ИЭГМ 157
<i>Rhodococcus</i>	<i>erythropolis</i>	ИЭГМ 185, ИЭГМ 186, ИЭГМ 201, ИЭГМ 256, ИЭГМ 266, ИЭГМ 268, ИЭГМ 269, ИЭГМ 270, ИЭГМ 708
	<i>fascians</i>	ИЭГМ 34, ИЭГМ 38, ИЭГМ 39, ИЭГМ 170, ИЭГМ 278
	“ <i>longus</i> ”	ИЭГМ 27, ИЭГМ 28, ИЭГМ 29, ИЭГМ 31, ИЭГМ 32, ИЭГМ 33, ИЭГМ 68, ИЭГМ 69
	<i>opacus</i>	ИЭГМ 56, ИЭГМ 57, ИЭГМ 59, ИЭГМ 61, ИЭГМ 246, ИЭГМ 716 ^T , ИЭГМ 717
	<i>qingsheengii</i>	ИЭГМ 267
	<i>rhodochrous</i>	ИЭГМ 62 ^T , ИЭГМ 63, ИЭГМ 64, ИЭГМ 65, ИЭГМ 646, ИЭГМ 647
	<i>ruber</i>	ИЭГМ 73, ИЭГМ 77, ИЭГМ 84, ИЭГМ 93, ИЭГМ 172, ИЭГМ 223, ИЭГМ 224, ИЭГМ 225, ИЭГМ 226, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 327

Цель настоящего исследования – изучить возможности использования актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* для биоаккумуляции никеля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования были 64 штамма актинобактерий, хранящихся в Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (ИЭГМ, № 768 во Всемирной федерации коллекций культур; www.iegm.ru/iegmcol) и принадлежащие к виду *Dietzia maris*, 2 видам *Gordonia*: *G. rubripertincta* и *G. terrae*, а также 7 видам рода *Rhodococcus*: *R. erythropolis*, *R. fascians*, “*R. longus*”; *R. opacus*, *R. qingsheengii*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* (табл. 1).

Культивирование актинобактерий. Для изучения способности актинобактерий аккумулировать ионы ГМ использовали жидкую минеральную среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.002. Компоненты питательной среды растворяли в водном растворе сульфата никеля ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) в концентрации 1.25–10.0 мМ, приготовленного на бидистиллированной воде. В качестве единственного источника углерода и энергии использовали или/или ацетат аммония – 2.0 г/л, глюкозу – 5.0 г/л, *n*-гексадекан или *n*-додекан, в концентрации 3.0 об. %.

Посевным материалом служили бактериальные культуры, предварительно выращенные в мясопептонном бульоне (МПБ) в течение 2 сут. Клеточную биомассу отделяли центрифугированием (20 мин, 5000 g), после чего дважды отмывали деионизированной водой. Осажденные клетки

ресуспендировали и использовали как инокулят, который вносили в водный раствор минеральной среды, содержащей соль никеля, в количестве, обеспечивающем начальную концентрацию клеток 3.0×10^9 кл./мл, (что соответствовало 1 об. %). Актинобактерии выращивали в условиях периодического культивирования в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на орбитальном шейкере (120–160 об./мин) при температуре 18–28°C в течение 2 сут. Пробы для измерений отбирали через 1, 3, 6, 9, 12, 22, 24 и 48 ч. Параллельно отбирали пробы для определения содержания внутриклеточного белка модифицированным для актинобактерий методом Лоури (Горина, Яковлева, 1980) с помощью двулучевого спектрофотометра Lambda EZ210 (UV/Vis) (“Perkin-Elmer”, США) при $\lambda = 750$ нм. В этих определениях клеточную биомассу отделяли центрифугированием (20 мин, 5000 g) в стационарной центрифуге, после чего дважды отмывали деионизированной водой.

Определение физиологической активности. Физиологическое состояние бактериальных культур контролировали по изменению их оптической плотности и приросту биомассы. Оптическую плотность (OP_{600}) измеряли спектрофотометрически ($\lambda = 600$ нм) с помощью спектрофотометра Lambda EZ201 (UV/Vis) (“Perkin-Elmer”, США). Накопление биомассы определяли весовым методом. Образцы (10 мл) культуры фильтровали через предварительно взвешенные нитроцеллюлозные мембранные фильтры с размером пор 0.2 мкм (“Владисард”), промывали 0.5%-ным раствором NaCl, фильтры высушивали при температуре 105°C до постоянного веса. Вес сухой биомассы рассчитывали в г/л. Чистоту культур и число жизнеспособных клеток определяли мето-

дом прямого высева аликвот культур на МПА и микроскопически, просматривая препараты в фазово-контрастном микроскопе Axiostar plus ("Carl Zeiss", Германия). Дыхательную активность бактериальных клеток оценивали с помощью респирометра Micro-Oxymax® ("Columbus Instruments", Ohio, США).

При изучении поглощения никеля бактериальными клетками использовали живые и инактивированные автоклавируемым (0.5 атм., 20 мин) клетки. Контролем служили: 1) неинокулированная питательная среда, содержащая ионы Ni^{2+} и 2) бактериальные культуры, выращенные в питательной среде без никеля. О поглощающей способности клеток актинобактерий судили по снижению концентрации Ni^{2+} в среде, что определяли по формуле: $(C_{нач} - C_{кон})/C_{нач} \times 100\%$, где $C_{нач}$ — исходная; $C_{кон}$ — конечная концентрация ТМ в среде культивирования. Одновременно регистрировали количество Ni^{2+} , поглощенного клеточной биомассой. Для этого образец культуры центрифугировали (5000 g, 20 мин), клетки тщательно отмывали (до отсутствия ионов ТМ в промывных водах) бидистиллированной водой и разрушали ультразвуком (23 кГц, 0.7 А) с помощью низкочастотного диспергатора Soniprep 150 ("Sono", Япония) в течение 15 мин в условиях охлаждения суспензии. Гомогенаты клеток центрифугировали (5000 g, 20 мин). В полученных супернатантах определяли содержание ионов Ni^{2+} диметилглиоксимным методом спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 470$ нм (Лурье, 1984). Коэффициент биоаккумуляции рассчитывали по формуле: $C_{внутри}/C_{внеш}$, где $C_{внутри}$ — количество внутриклеточного металла, мкг/г массы сухих клеток; $C_{внеш}$ — количество металла в культуральной жидкости, мкг/мл.

Статистическая обработка. Эксперименты проводили в трехкратной повторности. Результаты обрабатывали традиционными методами с помощью пакета компьютерных программ Statistica, версия 6.0 для Windows ("StatSoft Inc.", 2001), и Excel 2007 ("Microsoft Inc.", 2007). Для решения отдельных задач применяли кластерный анализ с использованием метода древовидной кластеризации. Критериями оценки явились показатели взвешенного среднего числа пары группы, расстояние (S) между которыми рассчитывали по формуле City-block Manhattan distance, позволяющей снизить влияние отдельных больших различий между объектами на рассчитываемое расстояние.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Способность актинобактерий аккумулировать ионы Ni^{2+} . В результате проведенных исследований нами обнаружено, что используемые в работе

бактериальные штаммы обладают различной способностью к поглощению никеля. Следует отметить, что адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам ТМ были описаны нами ранее (Костина и соавт., 2010; Ившина и соавт., 2013). Большинство (43) бактериальных штаммов извлекали из среды культивирования от 20 до 60% ионов Ni^{2+} при исходной концентрации металла от 0.6 до 2.5 мМ. Полученные данные, представленные в виде процентного показателя степени извлечения ионов Ni^{2+} (рис. 1), подвергались обработке методом кластерного анализа. Дендрограмма на рис. 1 иллюстрирует распределение исследуемых бактериальных штаммов по кластерам в зависимости от степени поглощения ионов никеля из среды культивирования. Как следует из дендрограммы, исследуемые штаммы оказались объединены в четыре группы А, Б, В и Г, имеющие внутригрупповой показатель сходства, не превышающий 30 усл. ед. Необходимо отметить, что для большинства (44) исследуемых штаммов аккумуляция ионов Ni^{2+} различалась не более чем на 10%.

Первую группу (А) составляют штаммы, проявляющие низкую аккумуляционную активность ионов Ni^{2+} на уровне от 15 до 22%. Эта группа представлена, в основном, тремя видами актинобактерий рода *Rhodococcus*: "*R. longus*", *R. opacus* и *R. qingsheengii* (до 3 штаммов каждого вида в группе), и характеризуется высокой степенью их сходства по исследуемому признаку (расстояние между штаммами на построенной диаграмме не превышает 10 усл. ед.). Помимо вышеперечисленных видов в состав данной группы входят отдельные штаммы — представители видов *G. rubripertincta*, *G. terrae*, *R. erythropolis*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*.

Вторая группа (Б) обладает средней (23–38%) аккумуляционной способностью, тогда как группа В характеризуется высоким (40–60%) уровнем аккумуляционной способности в отношении ионов никеля.

Группа Г включает 12 штаммов актинобактерий, относящихся, в основном, к видам *G. rubripertincta*, *R. fascians*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*. Представители данной группы проявляют наиболее высокую (66–95%) металлосеквестрирующую активность и характеризуются внутригрупповым показателем сходства 19–25 усл. ед.

Необходимо отметить, что данные группы объединяют все исследуемые в работе виды актинобактерий, и степень сходства внутри групп составляет от 18 до 22 усл. ед. (рис. 1). Представители видов *D. maris*, *G. rubripertincta*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*, имеющие красно-оранжевый недиффундирующий пигмент, а также *R. fascians* с ярко-желтой окраской бактериальных колоний, характеризуются более выраженной степенью извлечения

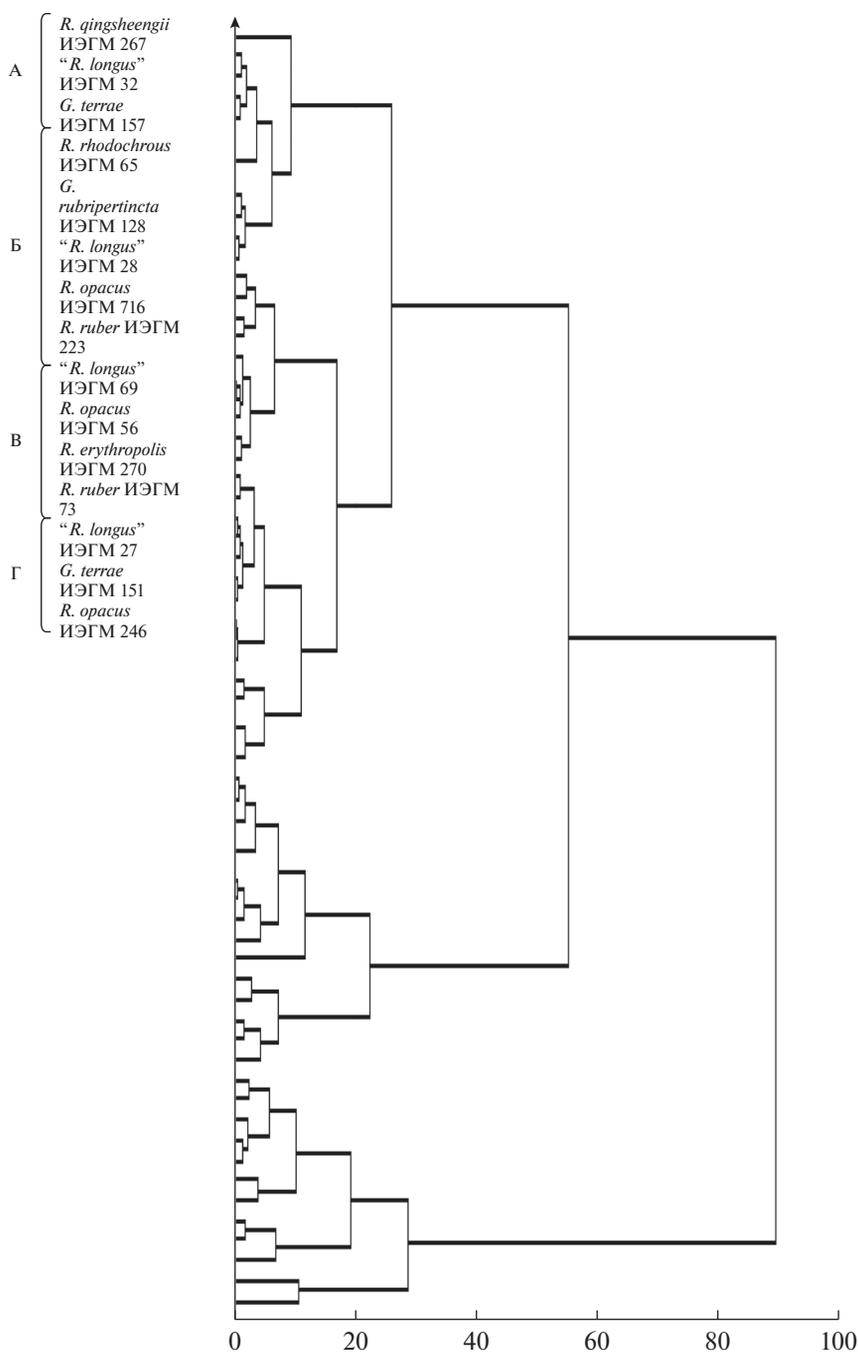


Рис. 1. Дендрограмма, иллюстрирующая способность исследуемых штаммов актинобактерий аккумулировать ионы Ni^{2+} (1.25 мМ).

ионов ТМ. В среднем они извлекают из среды культивирования от 40 до 50% ионов Ni^{2+} (рис. 2), что достоверно ($p < 0.05$) отличает их по этому признаку от представителей видов *R. erythropolis*, “*R. longus*”, *R. opacus* и *R. qingsheengii*, образующих колонии кремового и телесно-палевого цвета, и извлекающих из среды культивирования от 15 до 30% ионов никеля. Высокая степень извлечения

никеля пигментированными штаммами актинобактерий согласуется с известными литературными данными (Ившина и соавт., 2002; Gadd, 1990) и свидетельствует об участии пигментов в процессе биологической сорбции ионов ТМ. Известно (Ившина и соавт., 2013), что для пигментированных форм актинобактерий характерна повышенная жизнеспособность при воздействии неблагоприятных

ятных факторов окружающей среды, в частности, пониженной температуры, влиянии антимикробных соединений и ряда других.

Следует отметить, что строгой корреляции между видовой принадлежностью актинобактерий и их способностью аккумулировать ионы Ni^{2+} нами не выявлено. Установлено, что штаммы актинобактерий в пределах одного вида по способности аккумулировать никель отличаются друг от друга в 1.4–4.8 раза (табл. 2), как, например, штаммы, принадлежащие видам *G. rubripertincta*, *R. rhodochrous* и *R. ruber*. При этом изменений в концентрации никеля в вариантах абиотического контроля нами не обнаружено.

Возможно, неоднородность актинобактерий по способности извлечения из среды никеля связана с их экологической приуроченностью. На рис. 3 представлены данные по влиянию зависимости от источника выделения чистых культур алканотрофных актинобактерий (64 штамма) на их способности аккумулировать из среды ионы Ni^{2+} . Штаммы, выделенные из загрязненных нефтью сред, как водных, так и почвенных, по способности к извлечению никеля из среды культивирования на 10–15% превышают выделенные из незагрязненных субстратов.

Видовая неоднородность алканотрофных актинобактерий в отношении извлечения ионов Ni^{2+} из среды показана на примере штаммов вида *R. ruber*. Как видно из рис. 4, наиболее высокую (60% и более) аккумулирующую активность демонстрируют штаммы *R. ruber* ИЭГМ 93, ИЭГМ 172, ИЭГМ 226, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235 и ИЭГМ 327, тогда как, минимальную (менее 30%) способность извлекать ионы Ni^{2+} проявили штаммы *R. ruber* ИЭГМ 73, ИЭГМ 223 и ИЭГМ 225.

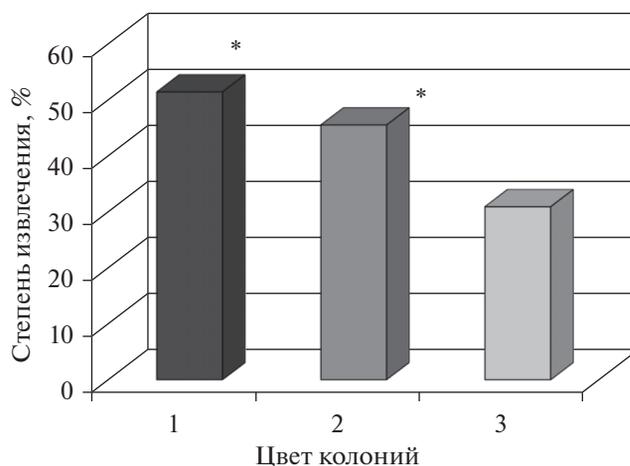


Рис. 2. Степень извлечения никеля (1.25 мМ) в зависимости от пигментирования клеток актинобактерий. 1 – красно-оранжевые (*D. maris*, *G. rubripertincta*, *G. terrae*, *R. rhodochrous* и *R. ruber* – 34 культуры); 2 – желтые (*R. fascians* – 5 культур); 3 – кремовые и пале-вые (*R. erythropolis*, “*R. longus*”, *R. opacus* и *R. qingsheengii* – 25 культур) колонии. * Статистически достоверно ($p < 0.05$) от непигментированных актинобактерий.

Динамика процесса поглощения никеля клетками актинобактерий. В следующей серии экспериментов изучали пути поступления никеля в клетки бактерий, а также основные закономерности процессов его накопления живыми и мертвыми клетками. Отметим, что как пассивное накопление никеля, так и его активный транспорт были аналогичны для 10 изученных нами видов актинобактерий. На рис. 5 представлены типичные результаты опытов с живыми и автоклавированными клетками на примере штамма *R. ruber* ИЭГМ 231 – наиболее активного биоаккумулятора никеля. Установлено,

Таблица 2. Поглощение никеля (1.25 мМ) клетками актинобактерий в присутствии глюкозы

Род, вид	Количество штаммов	Степень извлечения Ni^{2+} , %	
		минимальная	максимальная
<i>D. maris</i>	5	30.8 ± 0.63	44.2 ± 0.08
<i>G. rubripertincta</i>	5	18.0 ± 0.07	72.1 ± 0.08
<i>G. terrae</i>	6	17.1 ± 0.10	42.0 ± 0.10
<i>R. erythropolis</i>	9	21.5 ± 0.16	57.4 ± 0.05
<i>R. fascians</i>	5	29.6 ± 0.23	74.0 ± 0.16
“ <i>R. longus</i> ”	8	16.6 ± 0.34	44.0 ± 0.08
<i>R. opacus</i>	7	19.1 ± 0.08	42.0 ± 0.30
<i>R. qingsheengii</i>	1	15.1 ± 0.11	15.1 ± 0.11
<i>R. rhodochrous</i>	6	17.6 ± 0.30	78.0 ± 0.12
<i>R. ruber</i>	12	19.1 ± 0.57	92.2 ± 0.16
Абиотический контроль		0.6 ± 0.05	

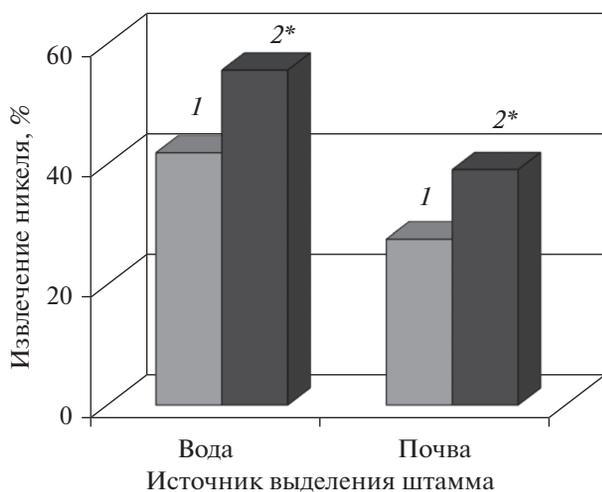


Рис. 3. Зависимость способности штаммов актинобактерий к извлечению никеля (1.25 мМ) от загрязненности источника их выделения. Варианты опыта: 1 – штаммы, выделенные из незагрязненных сред (25 штаммов); 2 – штаммы, выделенные из сред, загрязненных нефтью (36 штаммов). * Отличия статистически достоверны при $p < 0.05$.

что уровень аккумуляции ионов никеля мертвыми клетками существенно (в 9.4 раз) ниже, чем клетками развивающейся культуры. Было отмечено, что в варианте использования живых клеток степень поглощения Ni^{2+} резко увеличивалась в течение первых трех часов эксперимента, а затем снижалась. При использовании инактивированных клеток степень извлечения ионов Ni^{2+} оставалась практически постоянной в течение всего эксперимента и составляла около 9.0%. Так как степень аккумулирующей активности для живых клеток в ходе эксперимента достигала 92.2%, можно заключить, что до 83.2% аккумулирующей активности приходится на способность концентрировать ионы Ni^{2+} энергозависимым образом, то есть биоаккумуляцией. При этом увеличение времени взаимодействия клеток с ионами никеля до 48 ч не приводит к возрастанию его содержания в бактериальных клетках. Достигнутый уровень аккумуляции или не изменяется, или уменьшается, то есть никель вновь поступает из клеток в среду культивирования в результате адаптации или гибели бактериальных клеток (в зависимости от конкретного штамма актинобактерий), при этом концентрация никеля в бактериальных клетках снижается до уровня, который характерен для процесса биосорбции (6.0–19.0%). Следующей закономерностью является установленная зависимость уровня аккумуляции никеля от его исходной концентрации и источника углерода в среде культивирования. Как видно из табл. 3, аккумулирующая активность прямо зависит от концентрации ионов Ni^{2+} в среде куль-

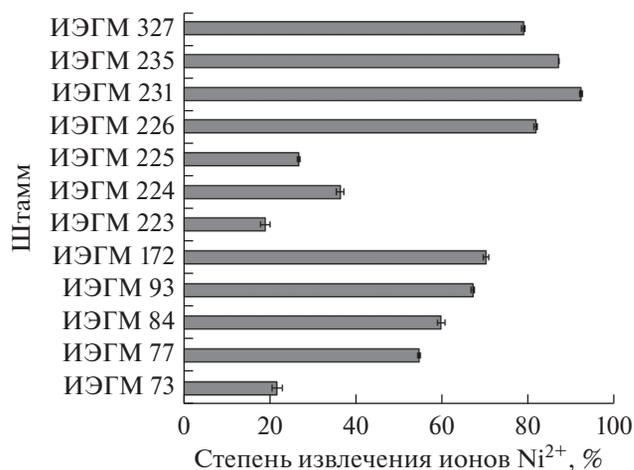


Рис. 4. Степень извлечения никеля (1.25 мМ) из среды разными штаммами вида *R. ruber*.

тивирования. Согласно полученным данным, родококки при росте на углеводородсодержащих питательных средах, а также на глюкозе более эффективно извлекают ионы Ni^{2+} по сравнению с ростом на ацетате аммония в качестве единственного источника углерода и энергии. Несмотря на то, что уровни извлечения никеля клетками родококков при их росте в среде с углеводородами или глюкозой были сопоставимы, временной промежуток, в котором фиксировался максимум поглощения Ni^{2+} клетками, в среде с глюкозой был в 12–24 раза короче. Это позволяет проводить экспресс исследования по поиску актинобактерий – активных биоаккумуляторов ТМ.

Изучение влияния таких параметров, как возраст культуры, исходная концентрация клеток актинобактерий, температура культивирования и диапазон активной кислотности на эффектив-

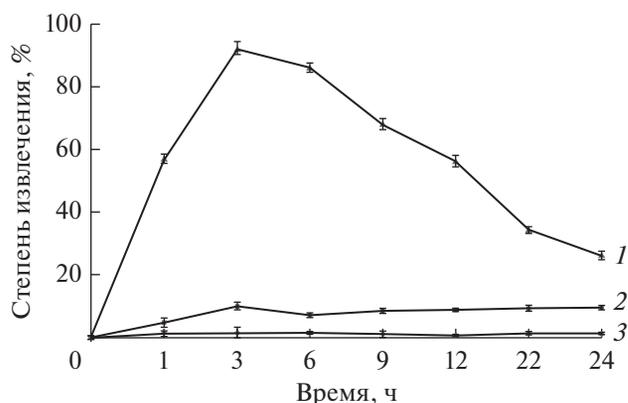


Рис. 5. Степень извлечения никеля (1.25 мМ) из среды живыми (1) и мертвыми (2) клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 по сравнению с абиотическим контролем (3).

Таблица 3. Влияние источника углерода в среде культивирования на извлечение ионов Ni^{2+} (мг/г биомассы) клетками *R. ruber* ИЭГМ 231

Исходная концентрация Ni^{2+} , мг/100 мл (мМ)	Источник углерода			
	ацетат аммония	<i>n</i> -додекан	<i>n</i> -гексадекан	глюкоза
35.2 (0.6)	27.2 ± 0.39	33.2 ± 0.80	35.2 ± 0.03	35.2 ± 0.08
76.3 (1.3)	47.9 ± 1.31	66.0 ± 1.25	75.3 ± 0.67	70.3 ± 0.12
146.7 (2.5)	36.2 ± 2.24	98.6 ± 3.64	134.2 ± 1.61	119.3 ± 1.64
293.4 (5.0)	53.7 ± 3.40	113.6 ± 4.75	159.6 ± 5.52	136.1 ± 6.45
586.9 (10.0)	64.5 ± 3.40	177.8 ± 2.58	214.8 ± 4.00	183.7 ± 5.63

Примечание. Время культивирования, при котором зафиксировано максимальное извлечение ионов Ni^{2+} : 3 ч – ацетат аммония и глюкоза, 72 ч – *n*-додекан и *n*-гексадекан.

ность процесса аккумуляции никеля клетками актинобактерий описан нами ранее (Костина и соавт., 2013). Таким образом, исследованные нами штаммы актинобактерий обладают способностью поглощать из среды культивирования от 9 до 215 мг никеля на 1 г сухой биомассы, что позволяет рассматривать актинобактерии рода *Rhodococcus* по их способности к биосорбции ионов никеля как конкурентоспособные при сравнении с достаточно широким кругом микроорганизмов (Beolchini et al., 2009; Wang, Chen, 2009).

Микроскопические исследования обнаружили морфологические изменения клеток штамма *R. ruber* ИЭГМ 231 при их культивировании в среде, содержащей никель (рис. 6а): наблюдается образование больших конгломератов, а также уменьшение размера клеток в 2 раза (до 2.5–3.5 мкм) по сравнению с контролем (без ионов Ni^{2+}) и практически отсутствуют V-образные делящиеся клетки. По нашему мнению, ионы никеля ингибируют процесс деления бактериальных клеток, так как количество делящихся клеток в среде с никелем снижается в 6 раз по сравнению с контролем. Для актинобактерий рода *Rhodococcus* экспо-

нимальной фазы роста при культивировании их в среде без никеля характерно присутствие палочковидных клеток длиной от 5.0 до 7.0 мкм и шириной 0.5–0.9 мкм, располагающихся единично, V-образно или палисавидно с большим количеством V-образных делящихся клеток (рис. 6б).

Физиолого-биохимические исследования показали, что при инкубировании актинобактерий в среде, содержащей ионы никеля, через 24 ч культивирования происходит заметное повышение (в 1.2–2.0 раза) содержания внутриклеточного белка по сравнению с контролем (без ионов Ni^{2+}) (рис. 7). Подобная закономерность выявлена для всех исследованных в работе бактериальных культур. При этом внутривидовые различия по содержанию белка в клетках культивируемых в течение 24 ч в среде, содержащей ионы Ni^{2+} , не превышают 14%. Полученные результаты подтверждают высказанное ранее предположение, что отмеченное повышение белкового синтеза является проявлением одного из механизмов адаптации бактерий к металлическому стрессу, в результате которого связывание ТМ с функциональными группами белковых моле-

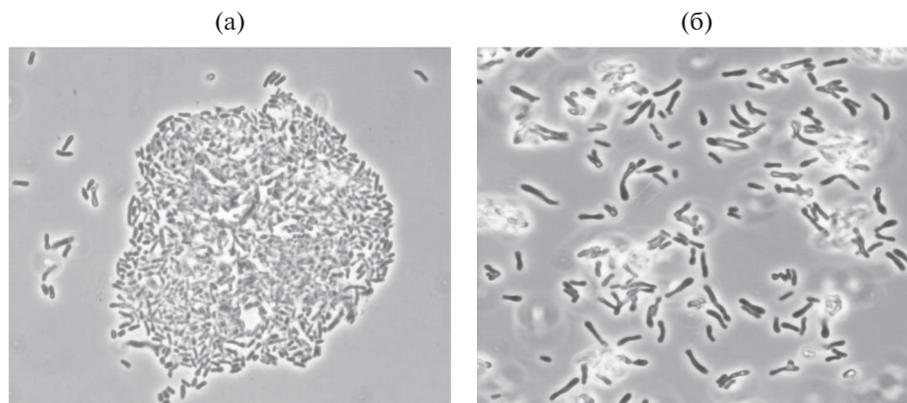


Рис. 6. Клетки *R. ruber* ИЭГМ 231 в световом микроскопе после 1 сут инкубирования в присутствии никеля (ув. ×1000). Варианты опыта: а – минеральная среда с Ni^{2+} (2.5 мМ); б – контроль (среда без добавления ионов ТМ).

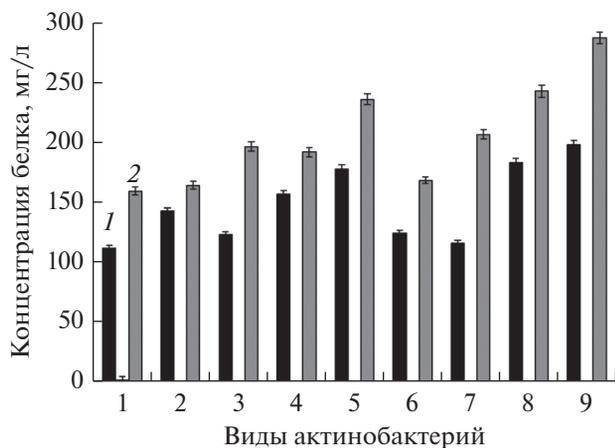


Рис. 7. Влияние ионов Ni^{2+} на содержание внутриклеточного белка. Варианты опыта: 1 – контроль (среда без внесения ионов ТМ); 2 – среда, содержащая ионы Ni^{2+} (2.5 мМ) через 24 ч культивирования. Виды актинобактерий: 1 – *D. maris* (5); 2 – *G. rubripertincta* (5); 3 – *G. terrae* (6); 4 – *R. erythropolis* (9); 5 – *R. fascians* (5 штаммов); 6 – “*R. longus*” (8); 7 – *R. opacus* (7); 8 – *R. rhodochrous* (6); 9 – *R. ruber* (12 штаммов).

кул способствует снижению токсического эффекта, вызываемого ионами ТМ (Костина и соавт., 2010).

Еще одним параметром влияния никеля на физиолого-биохимические процессы жизнедеятельности клеток актинобактерий было изменение их дыхательной активности, что было исследовано на примере штамма *R. ruber* ИЭГМ 231 (рис. 8). Интенсивность дыхания определяли по параметрам потребления бактериями кислорода и выделения углекислого газа в динамике развития бактериального штамма. Как видно из рис. 8, дыхательная активность клеток родококков была в 1.5–2.0 раза ниже при инкубировании в среде, содержащей ионы Ni^{2+} , по сравнению с ростом в минеральной среде, не содержащей ионы ТМ. При этом содержание O_2 и CO_2 в абиотическом контроле практически не изменялось и не превышало 200 мкл.

Общее потребление O_2 клетками родококков в среде без внесения ионов ТМ составило 5.97×10^{-4} мкл на клетку, тогда как в среде, содержащей ионы Ni^{2+} , 3.85×10^{-4} мкл на клетку. Выделение CO_2 в среду культивирования составило

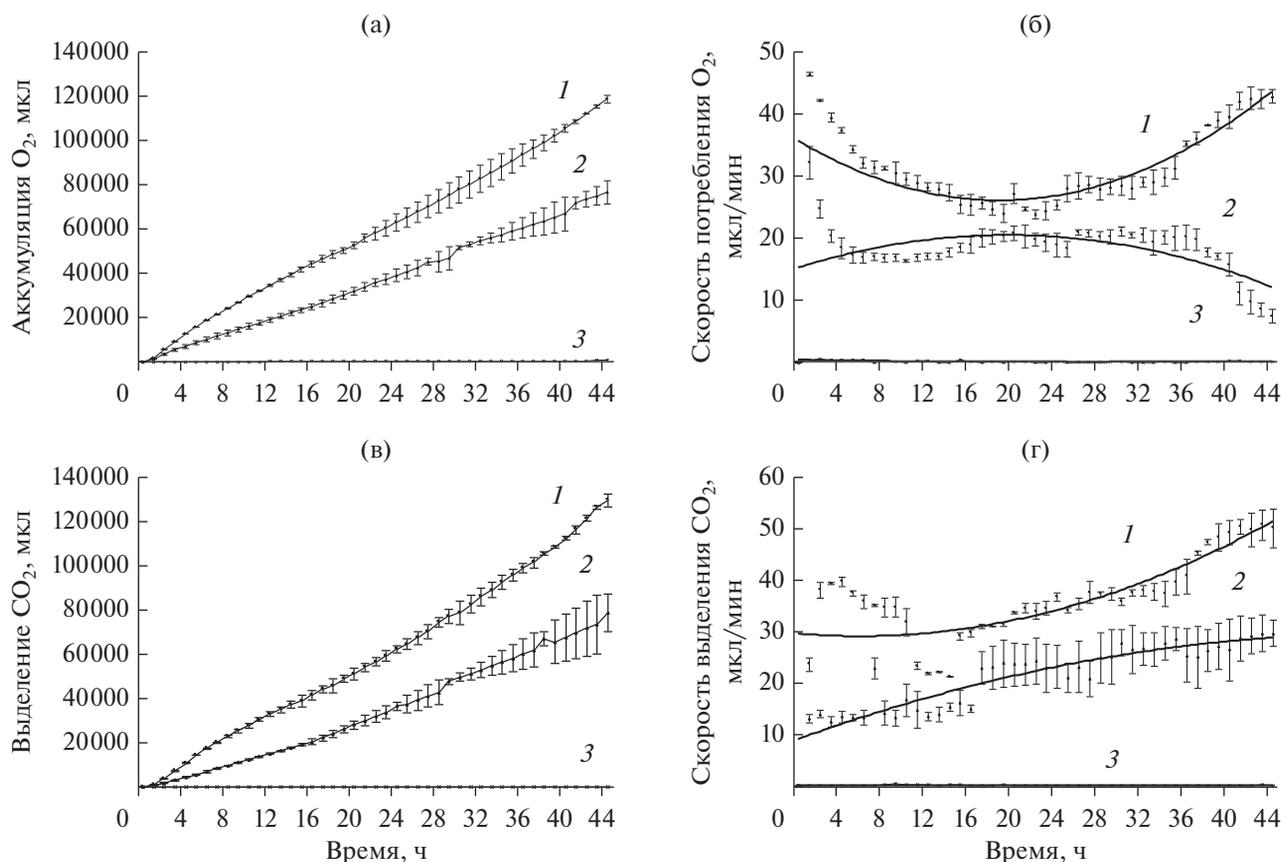


Рис. 8. Влияние ионов Ni^{2+} на дыхательную активность клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 ($\text{ОП}_{600} = 2.0$). Параметры измерений: а – аккумуляция кислорода, мкл; б – скорость потребления кислорода, мкл/мин; в – выделение углекислого газа, мкл; г – скорость выделения углекислого газа, мкл/мин. Варианты опыта: 1 – бактериальная культура в среде без внесения ионов ТМ; 2 – бактериальная культура в среде, содержащей Ni^{2+} (2.5 мМ); 3 – абиотический контроль.

1298.2 ± 29.25 мкл на мл среды, тогда как в среде, содержащей ионы Ni²⁺, составило 778.5 ± 8.67 мкл на мл среды. Контрольные показатели (среда без внесения бактериальной культуры) во всех вариантах проведенных измерений были близки к нулю (рис. 8). Кумулятивное потребление O₂ и выделение CO₂ клетками родококков при высокой оптической плотности развивающейся бактериальной культуры (ОП₆₀₀ = 2.0) в 1.5–1.7 раз выше, чем при культивировании в среде, содержащей ионы ТМ. Как видно из рис. 8, полиномиальная аппроксимация более всего соответствует описанию взаимосвязи между концентрацией клеток *Rhodococcus* и их респираторной активностью. Используя полиномиальную аппроксимацию второго порядка, было показано, что дальнейшее инкубирование не приводит к интенсификации дыхательной активности, что, возможно, связано с ограничением роста бактериальной культуры.

Динамика потребления O₂ и выделения CO₂ клетками родококков показана на рис. 8б, 8г. Средняя скорость (18.5 ± 3.66 мкм/мин) потребления кислорода в среде, содержащей ионы Ni²⁺, достигалась к 3.5 ч инкубации и поддерживалась в течение 34 ч с последующим снижением на 60% к концу инкубации. Можно отметить, что постоянная интенсивная респирация клеток родококков в присутствии ионов Ni²⁺ показала высокую активность и стабильность. Скорость потребления O₂ в среде без добавления ионов ТМ достигала 31.6 ± 6.07, что в 1.7 раз превышает таковую в среде с ионами Ni²⁺. Максимальная скорость потребления кислорода (21.2 и 46.5 мкм/мин) была зафиксирована через 29 ч и 1 ч инкубирования в среде, содержащей ионы Ni²⁺ и без внесения ТМ соответственно. Основываясь на данных, полученных при изучении динамики респирации (см. рис. 8б), и количестве жизнеспособных клеток, установлено, что скорость потребления кислорода составляла 0.18–0.32 мкл мин⁻¹/мг сухих клеток.

Подобные результаты получены при изучении скорости выделения CO₂ (рис. 8г), так средняя скорость составила 21.6 ± 5.82 и 36.5 ± 7.71 мкл/мин в среде, содержащей Ni²⁺, и без ТМ соответственно. Максимальная скорость выделения CO₂ в обоих вариантах опыта зафиксирована к 44 ч инкубирования. Следует отметить, что изменение дыхательной активности в абиотическом контроле не превышало 0.5 мкл мин⁻¹. Полученные результаты свидетельствуют о подавлении дыхательной активности клеток родококков (в 1.7–2.0 раза) при выращивании в среде, содержащей ионы Ni²⁺, по сравнению с таковой без внесения ионов ТМ.

По нашим данным, представители актинобактерий разных родов по способности аккумулировать ионы никеля распределяются в следующий порядок: *Rhodococcus* > *Gordonia* > *Dietzia*. В ре-

зультате проведенных скрининговых исследований по изучению металлаккумулирующей способности чистых культур алканотрофных актинобактерий выявлены количественные различия в степени поглощения ионов Ni²⁺ из среды культивирования. Отобраны штаммы, являющиеся наиболее активными биоаккумуляторами никеля: *G. rubripertincta* ИЭГМ 95^T, ИЭГМ 105; *R. fascians* ИЭГМ 39; *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^T, ИЭГМ 64, ИЭГМ 646; *R. ruber* ИЭГМ 84, ИЭГМ 93, ИЭГМ 172, ИЭГМ 226, ИЭГМ 231, ИЭГМ 235, ИЭГМ 327, извлекающие из среды от 60 до 95% ионов ТМ. Эти штаммы имеют практическую значимость и могут быть использованы для биотехнологической очистки природных и сточных вод, загрязненных высокими концентрациями ионов ТМ.

Исследования выполнены в рамках Комплексной программы 18-4-8-21 и государственного задания (№ госрегистрации темы: 01201353247).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Горина И.А., Яковлева В.И. Быстрый метод определения содержания белка в клетках микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. 1980. Т. 16. № 6. С. 936–937.
- 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.
- Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Kostina L.V. Adaptive mechanisms of nonspecific resistance to heavy metal ions in alkanotrophic actinobacteria // Rus. J. Ecol. (Ekologiya). 2013. P. 115–123.
- Ившина И.Б., Пешкур Т.А., Коробов В.П. Эффективное извлечение цезия клетками бактерий рода *Rhodococcus* // Микробиология. 2002. Т. 71. № 3. С. 418–423.
- Ivshina I.B., Peshkur T.A., Korobov V.P. Efficient uptake of cesium ions by *Rhodococcus* cells // Microbiology (Moscow). 2002. V. 71. P. 357–361.
- Костина Л.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Биосорбция, аккумуляция и способы извлечения тяжелых металлов. LAP Lambert Academic Publishing, 2010. 254 с.
- Костина Л.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Извлечение ионов тяжелых металлов клетками *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 // Вестн. Пермского гос. ун-та. Серия Биология. 2013. Вып. 2. С. 42–48.
- Лурье А. Аналитическая химия промышленных вод. М.: Химия, 1984. 448 с.
- Пешкур Т.А., Ившина И.Б. Особенности аккумуляции цезия бактериальными клетками *Rhodococcus ruber* при росте на *n*-гексадекане // Экология. 2003. № 1. С. 84–86.
- Peshkur T.A., Ivshina I.B. Specific accumulation of cesium by *Rhodococcus ruber* cells grown on *n*-hexadecane // Rus. J. Ecol. (Ekologiya). 2003. P. 65–67.
- Суинова Т.В., Кочетков В.В., Валидов Ш.З., Сузина Н.Е., Боронин А.М. Продукция феназиновых антибиотиков у штамма *Pseudomonas aureofaciens*, содержащего плазмиду резистентности к кобальту и никелю // Микробиология. 2002. Т. 71. № 6. С. 778–785.

- Siunova T.V., Kochetkov V.V., Validov Sh.Z., Suzina N.E., Boronin A.M.* The production of phenazine antibiotics by the *Pseudomonas aureofaciens* strain with plasmid-controlled resistance to cobalt and nickel // *Microbiology (Moscow)*. 2002. V. 71. P. 670–676.
- Bell J.M.L., Philp J.C., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Dunbar S.A., Cunningham C.J., Anderson P.* Methods evaluating vanadium tolerance in bacteria isolated from crude oil contaminated land // *J. Microbiol. Methods*. 2004. V. 58. P. 87–100.
- Beolchini F., Dell'Anno A., De Propris L., Ubaldini S., Cerone F., Danovaro R.* Auto- and heterotrophic acidophilic bacteria enhance the bioremediation efficiency of sediments contaminated by heavy metals // *Chemosphere*. 2009. V. 74. P. 1321–1326.
- Choudhary S., Sar P.* Characterization of a metal resistant *Pseudomonas* sp. isolated from uranium mine for its potential in heavy metal (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , and Cd^{2+}) sequestration // *Biores. Technol.* 2009. V. 100. P. 2482–2492.
- Dabbs E.R., Sole G.J.* Plasmid-borne resistance to arsenate, arsenite, cadmium, and chloramphenicol in a *Rhodococcus* species // *Mol. Gen. Genom.* 1988. V. 211. P. 148–154.
- Fulkerson J.F., Mobley L.T.* Membrane topology of the NixA nickel transporter of *Helicobacter pylori*: two nickel transport-specific motifs within transmembrane helices II and III // *J. Bacteriol.* 2000. V. 182. P. 1722–1730.
- Gadd G.M.* Metal tolerance // *Microbiology of extreme environments* / Ed. Edwards C. Open University Press, Milton Keynes, 1990. P. 178–210.
- Hausinger R.P., Zamble D.B.* Microbial physiology of nickel and cobalt // *Molecular Microbiology of Heavy Metals* / Eds. Nies D.H., Silver S. Berlin: Springer-Verlag, 2007. P. 287–320.
- Hebbeln P., Eitinger T.* Heterologous production and characterization of bacterial nickel/cobalt permeases // *FEMS Microbiol. Lett.* 2004. V. 230. P. 129–135.
- Mergeay M., Monchy S., Vallaeys T., Auquier V., Benotmane A., Bertin P., Taghavi S., Dunn J., van der Lelie D., Wattiez R.* *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. V. 27. P. 385–410.
- Mirimanoff N., Wilkinson K.J.* Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*) // *Environ. Sci. Technol.* 2000. V. 34. P. 616–622.
- Nies D.H.* Bacterial transition metal homeostasis // *Molecular Microbiology of Heavy Metals* / Eds. Nies D.H., Silver S. Berlin: Springer-Verlag, 2007. P. 117–142.
- Permina E.A., Kazakov A.E., Kalinina O.V., Gelfand M.S.* Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in *Eubacteria* // *BMC Microbiol.* 2006. V. 6. P. 49–60.
- Silver S., Phung L.T.* Bacterial heavy metal resistance: new surprises // *Annu. Rev. Microbiol.* 1996. V. 50. P. 753–789.
- Wang J., Chen C.* Biosorbents for heavy metals removal and their future // *Biotechnol. Advances*. 2009. V. 27. P. 195–226.

Ability of the *Dietzia*, *Gordonia* and *Rhodococcus* Actinobacteria to Accumulate Nickel Ions

L. V. Litvinenko*

Institute 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, 614081 Russia

*e-mail: lkostina@list.ru

Received June 29, 2017

Revised October 30, 2018

Accepted November 30, 2018

Accumulation of nickel ions by actinobacterial strains of *Dietzia*, *Gordonia*, and *Rhodococcus* from the Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms (IEGM; <http://www.iegm.ru/iegmcol>) was studied. The major physicochemical factors underlying the accumulation of nickel ions are discussed. The strains characterized by high (up to 95%) accumulation of and resistance to increased (up to 10.0 mM) nickel ion concentrations were selected.

Keywords: actinobacteria, accumulation, nickel, heavy metals, *Dietzia*, *Gordonia*, *Rhodococcus*