

УДК 579.22/24:546.47/49

**Влияние солей меди, цинка и кадмия на рост и уровень
биологической агрессивности условно-патогенной микрофлоры**

О.В.Обухова

Астраханский государственный технический университет (ФГБОУ ВПО «АГТУ», г. Астрахань)
E-mail: obuhova-ov@yandex.ru

В условиях антропогенного загрязнения гидроэкосистем особую значимость приобретают методы контроля состояния водной среды, которые сочетают быстроту, информативность и доступность. Перспективными тест-объектами могут быть микроорганизмы, обладающие рядом преимуществ: они легко культивируются, чувствительны к токсикантам, поэтому могут использоваться в биотестировании при оценке биологической опасности загрязнения природных вод. Материалом для исследования служили штаммы бактерий, выделенные из речной воды дельты р. Волги: *Enterobacter cloacae* (авирулентный); *Aeromonas sobria* (авирулентный) и *A. sobria*, обладающий гемолитической, протеолитической, лецитиназной и ДНК-азной активностью — по 3 штамма, соответственно. После определения численности колониеобразующих единиц исследуемые бактерии высевали в 3-х повторностях на МПА с добавлением сульфатов кадмия, меди и цинка в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/л. Результаты проведенной работы показали максимальную чувствительность авирулентных штаммов *A. sobria* на средах с 20 мкг/л с сульфатом кадмия, количество колоний сократилось в 8,7 раза, а численность *E. cloacae* и *A. sobria* с патогенными свойствами снизилась только в 1,5 и 1,9 раза, соответственно, по сравнению с контролем. Сульфаты меди и цинка, наоборот, стимулировали рост всех штаммов бактерий даже при максимальных концентрациях. При этом, у авирулентных штаммов *A. sobria* и *E. cloacae* появились некоторые патогенные свойства. Полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности некоторых аэромонад и энтеробактеров в гидроэкосистеме дельты Волги к солям тяжёлых металлов и возможности их использования при биотестировании.

Ключевые слова: вода, микроорганизмы, аэромонады, энтеробактеры, факторы патогенности, соли кадмия, меди, цинка, биотестирование.

ВВЕДЕНИЕ

Тяжёлые металлы являются главной компонентой в загрязнении Волго-Каспийского бассейна [Кузин, 2009; Катунин, 2014]. Попадая в водоёмы со сточными водами с урбанизированных территорий, они обуславливают необратимые изменения природных экосистем. Для этих металлов не существует механизмов самоочищения; они не подвергаются трансформации и, попав в биохи-

мический цикл, крайне редко покидают его, выступая в качестве наиболее токсических загрязнителей техногенного происхождения в сравнении с другими поллютантами. Изменение условий существования бактерий в результате техногенного загрязнения гидроэкосистем приводит к активизации факторов, способствующих циркуляции микроорганизмов в объектах окружающей среды и сопровождающихся процессами их измен-

чивости. Одним из следствий этого процесса может быть изменение факторов патогенности, обеспечивающих питание, размножение и защиту микробных популяций от хищников и конкурентов, тем самым, поддерживая их оптимальную численность [Бухарин, 1999; 2012]. Установлено, что возбудители сапрозоонозов способны адаптироваться к широкому спектру тяжёлых металлов благодаря своим биологическим свойствам. Их персистентные признаки в то же время зависят от вида и концентрации металла. Выявлено, что они оказывают как стимулирующее, так и угнетающее воздействие на факторы патогенности сальмонелл и иерсиний. Штаммы с высокими вирулентными свойствами были наиболее устойчивы к свинцу и никелю. Бактерии с подобными свойствами сокращали сроки гибели лабораторных животных [Бузолева и др., 2013]. Водный штамм *A. caviae*, циркулирующий в гидроэкосистемах Индии, обладал толерантностью к свинцу, цинку, кадмию, меди, ртути и трибутилтин хлориду. На основании проведённых исследований сделан вывод, что этот микроорганизм может быть использован в качестве тест-объекта для мониторинга в среде, загрязнённой трибутилтин хлоридом и свинцом [Shamin et al., 2013]. Исследования в условиях гидроэкосистем экспериментальных водоёмов на фоне нагрузки Pb и Cd показали, что свинец вызывал более резкие изменения в структуре бактериопланктона, но кадмий оказался более токсичным для полифосфатаккумулялирующих бактерий открытого биотопа [Морозова, 2014]. Приведены данные экспериментальных исследований по влиянию различных концентраций тяжёлых металлов на рост микрофлоры для выявления металлоустойчивых форм микроорганизмов. Полученные результаты показали доступность и информативность микробной индикации, необходимые для оценки уровня содержания тяжёлых металлов в среде, краткосрочного прогноза изменения экологического состояния прибрежных морских вод и предварительного биогеохимического картирования [Дмитриева, Безверная, 2002]. Ранее в Волго-Каспийском регионе была установлена частая встречаемость различных видов аэромонад и энтеробактеров в воде

и промысловых видах рыб [Ларцева, 1998]; отмечена значительная металлоустойчивость авирулентных и вирулентных штаммов *A. hydrophila* и *Citrobacter freundii*, выделенных из воды [Обухова, 2004].

Следовательно, изучение металлоустойчивости распространённых в гидроэкосистеме *A. sobria* и *E. cloacae* является актуальной проблемой, имеет научный и практический интерес в области биотестирования.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материалом для исследования служили штаммы бактерий, выделенные из воды р. Волги: *Enterobacter cloacae* (авирулентный); *Aeromonas sobria* (авирулентный) и *A. sobria*, обладающая протеолитической, лецитиназной, гемолитической и ДНК-азной активностью — по 3 штамма, соответственно.

Для эксперимента с каждым металлом готовили новую суспензию, для приготовления которой использовали чистые суточные культуры бактерий. После 3-х кратного разведения производили посев глубинным методом в 3-х повторностях на МПА с добавлением сульфатов кадмия, меди и цинка в концентрациях 5, 10 и 20 мкг/л.

На третьи сутки после посевов проводили подсчёт колоний и их тестирование на наличие факторов патогенности (протеолитической, лецитиназной, гемолитической и ДНК-азной активности) посредством пересева бактерий на специальные среды методом укола. Результат учитывали по зоне просветления в мм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты проведённых нами экспериментов показали, что все используемые концентрации соли кадмия (5, 10 и 20 мкг/л) оказывали ингибирующее действие на испытываемые штаммы (*E. cloacae*, *A. sobria* авирулентный и вирулентный штаммы) (рис. 1). Однако, наиболее устойчивым к действию соли были — энтеробактеры, численность которых даже при максимальной концентрации металла — 20 мкг/л уменьшилась только в 1,5 раза по сравнению с контролем.

Авирулентный штамм *A. sobria* оказался самым чувствительным из испытываемых бактерий, количество колоний выросших на питательной

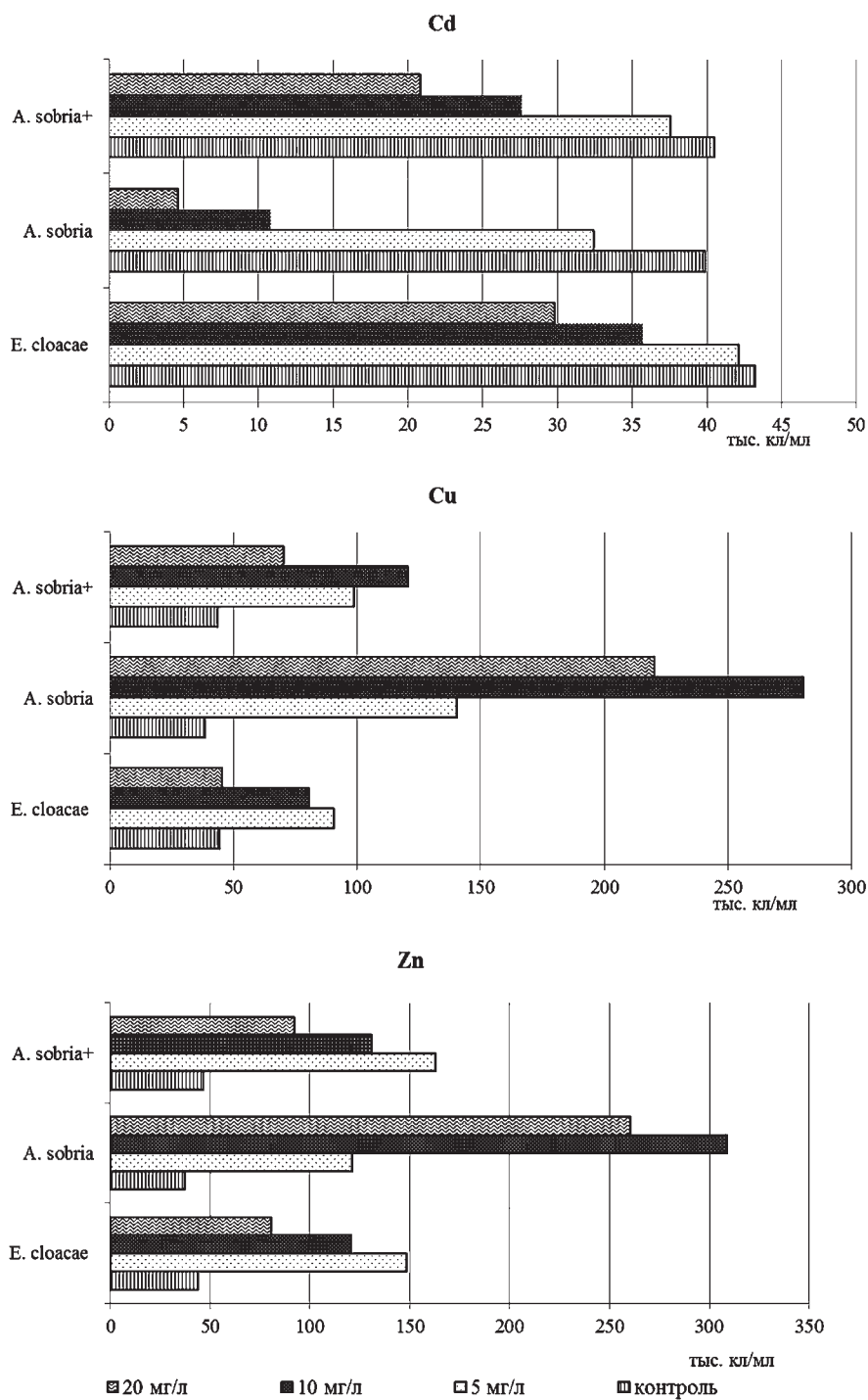


Рис. 1. Толерантность условно-патогенной микрофлоры к тяжелым металлам.
A. sobria+ — с факторами патогенности; *A. sobria* — без факторов патогенности

среде (МПА) с 20 мкг/л сульфата кадмия сократилось в 8,7 раза, по сравнению с контролем, а численность *A. sobria* с патогенными свойствами — только в 1,9 раза.

В присутствии соли кадмия в концентрации 10 и 20 мкг/л было отмечено изменение морфологических признаков — замедление роста и уменьшение в 1,5 раза размеров колоний ави-

рулентных аэромонад, при этом у *E. cloacae* и *A. sobria* с патогенными свойствами данные признаки были на уровне контроля.

Сульфаты меди и цинка стимулировали рост всех штаммов бактерий, используемых в опыте. Наиболее устойчивыми были штаммы *E. cloacae*. Их численность была выше, чем в контроле при всех концентрациях сульфатов, достигая максимальных величин при контакте с 10 мкг/л сульфатом меди и 5 мкг/л сульфатом цинка, увеличиваясь в 2,7 и 3,5 раза, соответственно. Самыми чувствительными к действию этих сульфатов были авирулентные штаммы *A. sobria*; при этом максимальное отклонение количества колоний зарегистрировано при концентрации 10 мкг/л солей меди и цинка и было в 7,3 и 8,3 раза больше, чем в контроле.

Следует отметить, что содержание цинка в питательной среде (МПА) значительно повлияло на морфологию колоний авирулентных аэромонад. В контроле диаметр их колоний не превышал 0,5 см, при 5 и 20 мкг/л $ZnSO_4$ размеры увеличились до 0,7–0,8 см, а при 10 мкг/л — от 1,2 до 2,3 см. Сульфат меди оказал незначительное влияние на морфологические признаки этого штамма, только при 10 мкг/л $CuSO_4$ размеры колоний увеличились до 0,6–0,7 см. У вирулентного штамма *A. sobria* при всех концентрациях солей меди и цинка колонии были одинаковых размеров, соответствующих контролю. Изоляты *E. cloacae* при взаимодействии с 5 мкг/л $CuSO_4$ и 5 и 10 мкг/л $ZnSO_4$ стали более подвижными, т. е. колонии срослись, образуя одну сплошную массу по всей чашке Петри. Подобную реакцию ранее регистрировали при взаимодействии солей этих металлов с цитробактерами [Обухова, 2004].

Известно, что изменение условий существования бактерий в результате техногенного загрязнения гидросистемы приводит к активизации факторов, способствующих циркуляции микроорганизмов в объектах окружающей среды и сопровождающихся процессами их изменчивости. Одним из следствий этого процесса может быть изменение маркеров патогенности, обеспечивающих питание, размножение, поддерживающих оптимальную численность микробной популяции, её защиту

от хищников и конкурентов [Бухарин, 1999, 2012].

В связи с этим, параллельно с изменением морфологии и роста вышеприведённых штаммов бактерий, было изучено влияние солей тяжёлых металлов на изменение их патогенных свойств, играющих роль адаптивных факторов. В эксперименте использовали авирулентные штаммы *E. cloacae* и *A. sobria*, а также изоляты *A. sobria* со следующими маркерами патогенности: гемолитическая активность — 1,5 мм; лецитиновая активность 2,0 мм; ДНК-азная активность 3,0 мм и с ярко выраженной протеолитической активностью.

Анализ полученных данных показал, что штамм вирулентных аэромонад сохраняли свои патогенные свойства на уровне контроля, кроме ДНК-азной активности, которая снизилась при контакте на МПА с 20 мкг/л сульфатов меди и кадмия с 3,0 до 1,0 мм. У авирулентных штаммов *A. sobria* при взаимодействии с 10 мкг/л сульфатом цинка, 5 и 10 мкг/л сульфатом меди появились слабовыраженные лецитиновая и гемолитическая активность (на уровне 1 мм в диаметре) отсутствующие в контроле.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой металлоустойчивости природных микроорганизмов (аэромонад и энтеробактеров), связанной по-видимому, с постоянно повышенным фоном данных металлов в водах Волго-Каспийского бассейна. Установлена способность условно-патогенной микрофлоры сохранять и даже приобретать некоторые патогенные свойства при воздействии с высокими концентрациями сульфатов тяжёлых металлов.

ЛИТЕРАТУРА

- Бузолева Л.С., Богатыренко Е.А., Ким А.В. 2013. Влияние тяжёлых металлов на факторы патогенности у возбудителей сапрозоонозов // Фундаментальные исследования. № 10. ч. 14. С. 3076–3079.
- Бухарин О.В. 1999. Персистенция патогенных бактерий. М.: Медицина. 336 с.
- Бухарин О.В. 2012. От персистенции к симбиозу // Микробиология. № 4. С. 4–9.
- Дмитриева Г.Ю., Безвербная И.П. 2002. Микробная индикация — эффективный инструмент для

- мониторинга загрязнения прибрежных морских вод тяжёлыми металлами // *Океанология*. Т. 42. № 3. С. 408–415.
- Катунин Д.Н.* 2014. Гидроэкологические основы формирования экосистемных процессов в Каспийском море и дельте реки Волги. Астрахань Изд-во: КаспНИРХ. 478 с.
- Кузин А.В.* 2009. Формирование биотопов устьевой области Волги под влиянием природных факторов и хозяйственной деятельности. Автореф. дис. ... канд. геогр. наук. Астрахань. 24 с.
- Ларцева Л.В.* 1998. Гигиеническая оценка по микробиологическим показателям рыбы и рыбных продуктов Волго-Каспийского региона. Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М. 44 с.
- Морозова О.В.* 2014. Влияние свинца и кадмия на структуру бактериопланктона экспериментальных водоёмов // *Тенденции и инновации современной науки: Материалы 13 Международной научно-практической конференции, Краснодар, 23 апр. 2014: Сборник научных трудов. Краснодар. С. 60.*
- Обухова О.В.* 2004. Бактериоценоз воды и судака (*Stizostedion lucioperca*) в дельте Волги. Автореф. дис. ...канд. биол. наук. М. 23 с.
- Shamin K., Naik M., Pandey A., Kumar D.* 2013. Isolation and identification of *Aeromonas caviae* strain KS-1 as TBTC- and lead-resistant estuarine bacteria // *Environ. Monit. and Asses.* Vol. 185. no. 6. P. 5243–5249.
- REFERENCES**
- Buzoleva L.S., Bogatyrenko E.A., Kim A.V.* 2013. Vliyanie tyazhelykh metallov na faktory patogennosti u vzbuditelej saproozoozov [The effect of heavy metals on the factors of pathogenicity of causative agents of saprotosa] // *Fundamental'nye issledovaniya.* № 10. ch. 14. S. 3076–3079.
- Bukharin O.V.* 1999. *Persistentciya patogennykh bakterij.* M.: Meditsina. 336 s.
- Bukharin O.V.* 2012. Ot persistentcii k simbiozu [From persistence to symbiosis] // *Mikrobiologiya.* № 4. S. 4–9.
- Dmitrieva G.Yu., Bezverbnaya I.P.* 2002. Mikrobnaya indikatciya — ehffektivnyj instrument dlya monitoringa zagryazneniya pribrezhnykh morskikh vod tyazhelymi metallami [Microbial indication is an effective tool to monitor contamination of coastal waters with heavy metals] // *Okeanologiya.* Т. 42. № 3. S. 408–415.
- Katunin D.N.* 2014. Gidroehkologicheskie osnovy formirovaniya ehkosistemnykh protcessov v Kaspijskom more i del'te reki Volgi [Hydroecological bases of formation of ecosystem processes in the Caspian Sea and the Volga river Delta]. Astrahan' Iz-vo: KaspNIRKH. 478 s.
- Kuzin A.V.* 2009. Formirovanie biotopov ust'evoj oblasti Volgi pod vliyaniem prirodnykh faktorov i khozyajstvennoj deyatel'nosti [The formation of habitats of the estuarine region of the Volga under the influence of natural factors and economic activities]. Avtoref. dis. ... kand. geogr. nauk. Astrakhan'. 24 s.
- Lartceva L.V.* 1998. Gigienicheskaya otcenka po mikrobiologicheskim pokazatelyam ryby i rybnnykh produktov Volgo-Kaspijskogo regiona [Hygienic evaluation of microbiological indicators of fish and fish products in the Volga-Caspian region]. Avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk. M. 44 s.
- Morozova O.V.* 2014. Vliyanie svintsya i kadmiya na strukturu bakterioplanktona ehksperimentalnykh vodoemov [Influence of lead and cadmium on the structure of bacterioplankton experimental ponds] // *Tendencii i innovacii sovremennoj nauki: Materialy 13 Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii, Krasnodar, 23 apr. 2014: Sbornik nauchnyh trudov.* Krasnodar. S. 60.
- Obukhova O.V.* 2004. Bakteriotsenoz vody i sudaka (*Stizostedion lucioperca*) v del'te Volgi [Bacteriocins of the water and the pike perch (*Stizostedion lucioperca*) in the Volga Delta]. Avtoref. dis. ...kand. biol. nauk. M. 23 s.

Поступила в редакцию 24.04.16 г.
Принята после рецензии 21.07.16 г.

The effect of salts of copper, zinc and cadmium on the growth and biological aggressiveness of opportunistic microflora

O.V.Obukhova

Astrakhan State Technical University

In the conditions of anthropogenic pollution of aquatic ecosystems special attention is given to methods of monitoring the aquatic environment, which combine an agile, informative and accessible. Prospective test objects can be microorganisms, has a number of advantages: they are easily cultivated, sensitive to toxicants, therefore, may be used in the bioassay in the evaluation of biological hazards of pollution of natural waters. The material for the study served as the strains of bacteria isolated from river water of the Volga Delta: *Enterobacter cloacae* (avirulent); *Aeromonas sobria* (avirulent) and *A. sobria* with hemolytic, proteolytic, and lecithinase Dnesday activity — 3 strain, respectively. After determining the number of colony-forming units of the studied bacteria were sown in 3 replications for MPA with addition of sulphates of cadmium, copper and zinc in concentrations of 5, 10 and 20 $\mu\text{g/l}$. The results of this work showed the maximum sensitivity of avirulent strains of *A. sobria* on media with 20 mg/l with sulphate of cadmium, the number of colonies decreased by 8.7 times, while the number of *E. cloacae* and *A. sobria* pathogenic properties decreased only 1.5 and 1.9 times, respectively, compared to control. The sulphates of copper and zinc, on the contrary, stimulated the growth of all the bacterial strains even at maximum concentrations. Thus, avirulent strains of *A. sobria* and *E. cloacae* appeared some pathogenic properties. The data obtained indicate high sensitivity of some aeromonad and enterobacteria accordingly, in the Delta of the Volga to the salts of heavy metals and possibility of their use in the bioassay.

Key words: water, microorganisms, aeromonads, enterobacteria, factors of pathogenicity, salts of cadmium, copper, zinc, bioassay.