

**ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДІВ ДИСПЕРСІЙНОГО І КЛАСТЕРНОГО АНАЛІЗУ
ДЛЯ ПОРІВНЯННЯ СТІЙКОСТІ ДО ВАЖКИХ МЕТАЛІВ
АЦИДОФІЛЬНИХ ХЕМОЛІТОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ,
ВИДІЛЕНИХ ІЗ ТЕХНОГЕННОЇ СИРОВИНИ**

Н. Васильєва¹, І. Блайда^{1*}, Т. Васильєва¹, В. Баранов², І. Барба¹

¹Одеський національний університет імені І.І. Мечникова
вул. Дворянська, 2, Одеса 65082, Україна

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

*e-mail: iblayda@ukr.net

У представленій роботі досліджена стійкість до важких металів типового штаму *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 і восьми штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, виділених із відвальних продуктів паливно-енергетичного комплексу України різного типу. Для вивчення були використані «метали-замісники» (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}), метали «комбінованої дії» (Cu^{2+}) і метали, які не виконують біологічних функцій (Cd^{2+} , Pb^{2+}), але здатні утворювати нерозчинні комплекси на/в клітині або взаємодіяти з нуклеїновими кислотами. Встановлено, що вплив металів на виділені штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій неоднозначний і не відповідає шкалі взаємодії металів з азотистими гетероциклічними основами ДНК (шкалою Ейхгорна). Максимальна кількість штамів виявилася стійкою до іонів кобальту (66,6 % при значенні МІС 0,09 М). До іонів міді, кадмію і цинку були резистентними 55,5 % штамів з показниками за мінімальними інгібуючими концентраціями (МІК) 0,13, 0,061 і 0,083 М відповідно. Проведено статистичний аналіз отриманих результатів оцінки стійкості ацидофільних хемолітотрофних бактерій до важких металів з використанням методів дисперсійного та кластерного аналізів у програмі R 3.4.0. Кластеризація результатів аналізу за значеннями мінімальних інгібуючих концентрацій дала змогу згрупувати досліджені метали таким чином: одиничний кластер (Pb^{2+}), кластер (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) і підкластер (Cu^{2+}). Ієрархічний кластерний аналіз значень МІК дав змогу розділити вивчені штами на три групи залежно від рівня їхньої резистентності до металів. Найбільш стійкими до досліджених металів виявилися штами, ізольовані з відходів збагачення вугілля. На основі аналізу літературних даних у вивчених штамів припустимі експресовані системи транспорту металів. Різницю у рівні стійкості до металів у *A. ferrooxidans* і *A. thiooxidans* частково можна зв'язати з використанням двовалентного феруму і тіосульфату відповідно як джерел енергії. Показано неоднорідність відгуку ефлюкс-систем на дію важких металів.

Ключові слова: ацидофільні хемолітотрофні бактерії, резистентність, важкі метали, мінімальні інгібуючі концентрації, ефлюкс-системи

Відомо, що у зв'язку з високою токсичністю і мобільністю більшості металів, у першу чергу «металів-замісників» і металів «комбінованої дії», у мікроорганізмів сформувалися різноманітні способи регуляції концентрування металів у клітині та механізми їхнього транспорту. В опублікованих наукових дослідженнях цих механізмів [1, 3, 5, 8, 13, 15, 16, 24] використаний раніше термін «резистентність до важких металів» вже не є достатнім

для опису цих механізмів. Більш правильно на сьогоднішній день оперувати поняттями «гомеостаз» або «ефлюкс-системи».

Вивчення питань існування і стабільності мікробних асоціацій у субстратах з підвищеною концентрацією металів на сьогоднішній день стало ще більш актуальним, оскільки воно спрямоване на практичні цілі, зокрема, на пошук штамів, здатних до вилуговування металів зі середовищ із їхньою підвищеною концентрацією. Ацидофільні хемолітотрофні бактерії (АХБ) є найбільш перспективною групою в цьому сенсі за рахунок своєї унікальної фізіології та здатності до вилуговування металів. Саме ці мікроорганізми займають екологічну нішу з підвищеною кислотністю, високими концентраціями іонів важких металів і відіграють ведучу роль у солюбілізації металів. Висока адаптивність АХБ до мінливих умов навколишнього середовища викликає підвищений науковий інтерес до проблеми вивчення механізмів, які забезпечують функціонування подібних систем, а самі АХБ є джерелом виникнення нових штамів із більш високим рівнем резистентності і, як наслідок, із більш вираженою здатністю до біовилуговування металів.

Вивчення резистентності до важких металів мікроорганізмів різних груп дало змогу виявити у них системи стійкості, які регулюються оперонами або кластерами генів, локалізованих у хромосомах і плазмідах грампозитивних та грамнегативних бактерій. Механізми формування стійкості бактерій до важких металів залежать від типу мікроорганізмів, місця їхнього існування, взаємодії з іншими бактеріями, а також від кількості можливих (для даного мікроорганізму) шляхів транспорту іонів металу в клітину, локалізації генів стійкості на хромосомі, плазміді або транспозоні [1, 3, 5]. Один штам може одночасно мати різні механізми захисту, зокрема, за рахунок наявності позаклітинного бар'єру, активного транспорту іонів металів з клітини (ефлюксу), позаклітинної або внутрішньоклітинної секвестрації, відновлення іонів металів [1, 3, 5]. Додаткову складність у розумінні формування систем гомеостазу вносить біологічна значущість металу для клітини, оскільки іони перехідних металів являють собою певну проблему – біологічно необхідні за низьких, вони стають токсичними за високих концентрацій, що передбачає регулювання дії системи залежно від концентрації металу в клітині [1, 3, 8, 13, 15, 16, 24]. З точки зору розвитку сучасних біотехнологій вилучення металів із природних руд і відходів особливий інтерес становлять АХБ, які виділені з мікробіоценозів техногенної сировини, що формується в екстремальних фізико-хімічних умовах із підвищеними концентраціями важких металів, що очікувано має сприяти формуванню механізмів підвищеної стійкості бактерій. Використання методів однофакторного і дисперсійного аналізу в сукупності з відомими літературними даними дає можливість виявити, які саме фактори викликають стійкість бактерій до металів, і припустити наявність у досліджених мікроорганізмів одної з відомих ефлюкс-систем.

Метою даної роботи було порівняти стійкість до важких металів ацидофільних хемолітотрофних бактерій, які були ізольовані з відвальних продуктів паливно-енергетичного комплексу України, з використанням методів дисперсійного та кластерного аналізу.

Матеріали та методи

Дослідження проводили з ацидофільними хемолітотрофними мезофільними і помірно термофільними штамми бактерій (табл. 1), які були виділені з мікробіоценозів відвальних продуктів ПЕК України: породних відвалів вуглезбагачення центральної збагачувальної фабрики (ЦЗФ) «Червоноградська» Львівсько-Волинського вугільного басейну різного терміну накопичення (24–28 місяців – чорного кольору і ті, що зберігалися по-

над 60 місяців, – червоного кольору), золошлаку і золи виносу після спалювання вугілля відповідно на Добротвірській і Ладжинській теплоелектростанціях (ТЕС). Властивості штамів описані в роботі [7]. Відповідні дослідження проводили також із типовим штамом *A. ferrooxidans* ATCC 23270, що був виділений із бурого вугілля шахт США (Американської колекції типових культур, Роквілл, штат Меріленд, США). Усі штами зберігаються в музеї кафедри мікробіології, вірусології та біотехнології Одеського національного університету імені І.І. Мечникова, яка є філією Національної колекції мікроорганізмів НАН України.

Таблиця 1

Штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій, виділених із відвальних продуктів ПЕК

№№	Штам	Джерело виділення
1	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv red 9	Червона порода ЦЗФ «Червоноградська»
2	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lv black 37	Чорна порода ЦЗФ «Червоноградська»
3	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> DTV 1	Золошлак Добротвірської ТЕС
4	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 5	Зола виносу Ладжинської ТЕС
5	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> Lad 27	Зола виносу Ладжинської ТЕС
6	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270	Буре вугілля зі шахт США
7	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv red 11	Червона порода ЦЗФ «Червоноградська»
8	<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i> Lv black 6	Чорна порода ЦЗФ «Червоноградська»
9	<i>Sulfobacillus sp.</i> Lad 29	Зола виносу Ладжинської ТЕС

Резистентність штамів визначали під час їхнього культивування на стандартному середовищі Сільвермана-Лундгрема 9К складу, г/дм³: K₂HPO₄ – 0,50; (NH₄)₂SO₄ – 3,00; MgSO₄·7H₂O – 0,50; KCl – 0,10; Ca(NO₃)₂ – 0,01. Як джерела енергії під час роботи з *A. ferrooxidans* і *Sulfobacillus sp.* використовували сіль FeSO₄·xH₂O у концентрації 44,5 г/дм³; під час культивування *A. thiooxidans* – Na₂S₂O₃ у концентрації 5,0 г/дм³. Солі металів у формі сульфатів розчиняли в дистильованій воді, стерилізували на киплячій водяній бані протягом 10 хв і вносили до розплавленого щільного середовища 9К. Контролем слугувало середовище без іонів металів. Посіви здійснювали штрихом; мезофільні штами культивували за 35,0±0,2 °С, помірно термофільні – за 50,0±0,2 °С протягом 7 діб. Облік результатів здійснювали візуально, порівнюючи зростання штамів у дослідних і контрольних варіантах. Усі досліди проводили в трьох повторностях. Мінімальною інгібуючою вважали концентрацію (МІК, М), за якої ще зберігається життєздатність досліджуваного штаму, але цілком немає його зростання. Концентрацію металів у розчинах визначали стандартним відомим методом атомно-абсорбційної спектроскопії на приладах ААС-1 (Німеччина) і С-115ПК Selmi (Україна) [4]. Достовірність отриманих результатів оцінювали за критерієм Стьюдента з вірогідністю P<0,05.

Для проведення статистичної обробки результатів визначення стійкості АХБ використовували метод однофакторного дисперсійного та кластерного аналізу в програмі R 3.4.0 [10].

Результати і їхнє обговорення

Мінімальні інгібуючі концентрації для штамів, ізольованих із відвальних продуктів ПЕК України, й типового *A. ferrooxidans* ATCC 23270 наведені в табл. 2.

Усереднені значення МІК для досліджених штамів (на підставі даних табл. 1) склали, М: Cu²⁺ – 0,13±0,01; Cd²⁺ – (0,61±0,03)×10⁻¹; Co²⁺ – 0,09±0,01; Zn²⁺ – 0,008±0,002; Ni²⁺ – 0,007±0,002; Pb²⁺ – (0,25±0,05)×10⁻² (рис. 1).

При цьому до іонів купруму була стійкою максимальна кількість штамів – 86,3 %.

Однофакторний дисперсійний аналіз, який було проведено, показав достовірне розходження концентраційних діапазонів МІК іонів важких металів залежно від штамів.

Таблиця 2

Штами	Іони металів					
	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Pb ²⁺ , x10 ⁻²	Cd ²⁺ , x10 ⁻¹	Co ²⁺	Ni ²⁺
<i>A. ferrooxidans</i> Lv red 9	0,18±0,03	0,12±0,02	0,34±0,05	0,88±0,05	0,12±0,02	0,10±0,02
<i>A. ferrooxidans</i> Lv black 37	0,18±0,03	0,09±0,02	0,34±0,05	0,88±0,05	0,12±0,02	0,13±0,02
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 5	0,08±0,02	0,06±0,01	0,17±0,02	0,66±0,04	0,06±0,01	0,06±0,01
<i>A. ferrooxidans</i> Lad 27	0,18±0,03	0,06±0,01	0,17±0,02	0,88±0,05	0,09±0,01	0,10±0,02
<i>A. ferrooxidans</i> DTV 1	0,18±0,03	0,06±0,01	0,34±0,05	0,21±0,01	0,12±0,02	0,06±0,01
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	0,04±0,01	0,06±0,01	0,17±0,02	0,21±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
<i>A. thiooxidans</i> Lv black 6	0,08±0,02	0,09±0,02	0,17±0,02	0,44±0,02	0,06±0,01	0,06±0,01
<i>A. thiooxidans</i> Lv red 11	0,10±0,02	0,09±0,02	0,17±0,02	0,44±0,02	0,09±0,01	0,03±0,01
<i>Sulfobacillus</i> sp. Lad 29	0,16±0,03	0,12±0,02	0,34±0,05	0,88±0,05	0,12±0,02	0,10±0,02

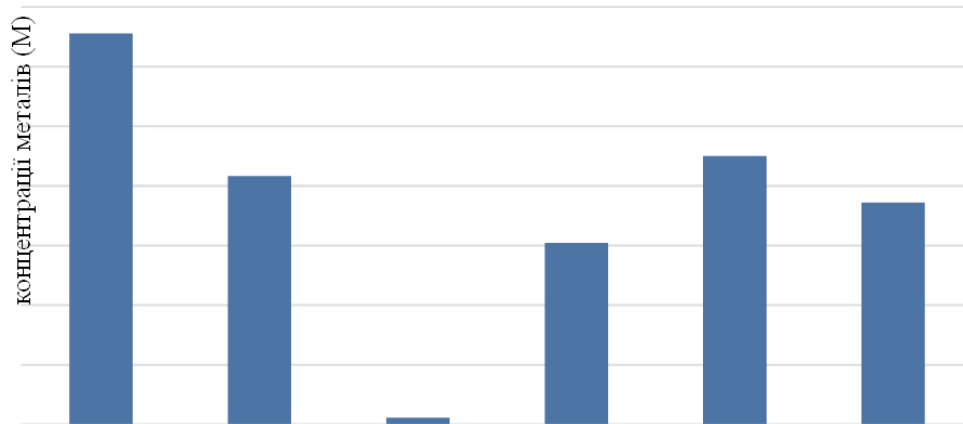
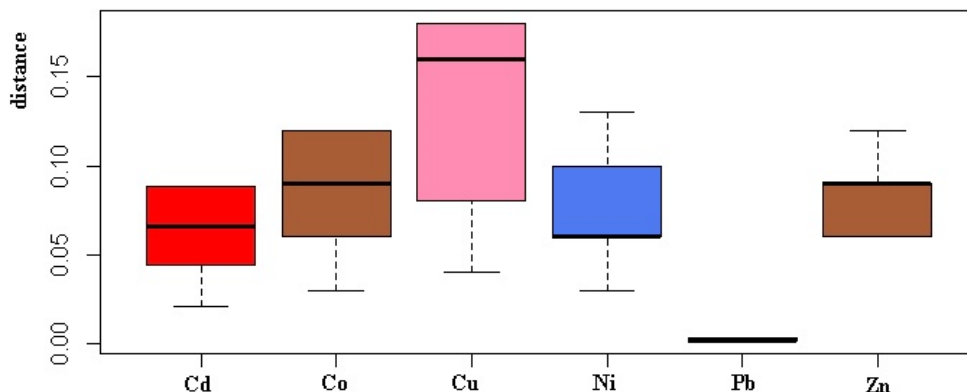
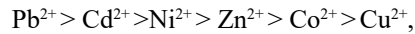


Рис. 1. Усереднені значення мінімальних інгібуючих концентрацій іонів важких металів стосовно штамів, які вивчали

Розрахунковий критерій Фішера, що дорівнює $F_{st} = 29,05$ при рівні достовірності $p=0,05$, порівняно з табличним критерієм Фішера ($F_{tab} = 2,15$), підтверджує необхідність прийняти альтернативну гіпотезу (рис. 2).

Рис. 2. Результати однофакторного дисперсійного аналізу за значеннями МІК іонів важких металів для вивчених штамів ($F_{st} = 29,05$; $F_{tab} = 2,15$; $p=0,05$). У boxplot вказано мінімальні значення концентрацій металів, значення першого (Q1) кватртіля, медіани, значення третього (Q3) кватртіля, максимальні значення концентрацій металів

Ранжуючи іони важких металів у напрямі зниження їхньої токсичної дії на вивчені штами АХБ (на підставі отриманих значень МІК), отримуємо такий рядок:



який не відповідає ранжуванню металів за їхньою здатністю до взаємодії з азотистими гетероциклічними основами ДНК за шкалою Ейхгорна ($\text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$) [2, 5].

Іони Cu^{2+} і Cd^{2+} вважаються найбільш токсичними, оскільки мають найбільшу спорідненість до азотистих гетероциклічних основ ДНК; вони викликають пошкодження клітинної мембрани і структури ДНК, призводять до клітинних морфологічних змін [9]. Незважаючи на це, відомо, що АХБ, такі як *Acidithiobacillus ferrooxidans*, здатні рости й акумулювати Cu^{2+} і Cd^{2+} аж до концентрацій 0,5–0,6 і 0,09–0,45 М відповідно [11]. Більше половини досліджених штамів АХБ (55,5 %) проявили стійкість до іонів купруму, кадмію та цинку (рис. 1). Трохи менше половини штамів була стійкою до дії іонів нікелю (44,4 %). Мінімальна кількість штамів була резистентною до плюмбуму (33,3 %). До дії іонів кобальту виявилися резистентними майже 66,6 % штамів. Ієрархічний кластерний аналіз показав спорідненість між впливом іонів цинку, кобальту, кадмію та нікелю на досліджувані штами АХБ (рис. 3). Показано формування одиничного кластера (Pb^{2+}) та підкластера (Cu^{2+}). Аналізуючи дані, наведені на рис. 3, та дані літератури, ми припустили, що така кластеризація показників МІС може вказувати на активацію найбільшої групи систем стійкості бактерій до іонів металів – ефлюкс-системи, які активуються за наявності високих концентрацій металів та існують у більшості мікроорганізмів [5]. При цьому можна зауважити відмінності в системі транспорту залежно від низьких і високих концентрацій металу [8].

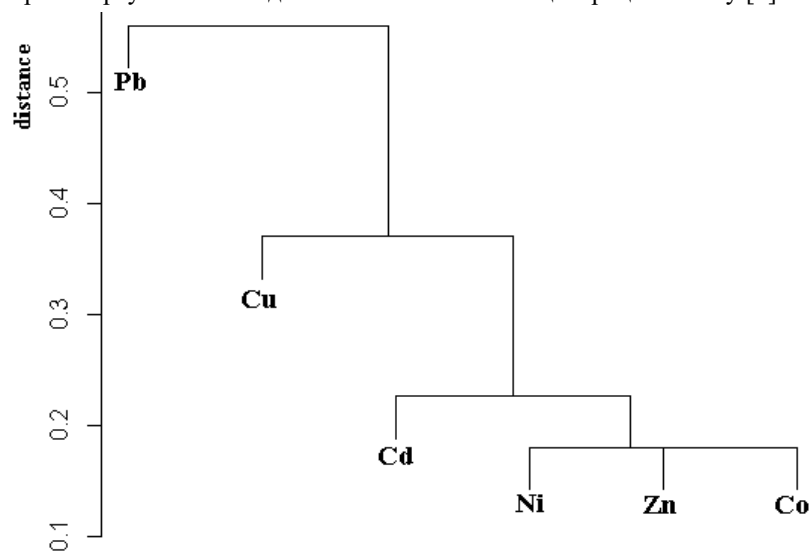


Рис. 3. Дендрограма результатів кластеризації токсичності іонів важких металів щодо штамів ацидофільних хемоліотрофних бактерій, які вивчали (матриця відстаней – method «manhattan», спосіб агрегування – method «single»)

Ефлюксні системи можуть кодуватись як хромосомними, так і плазмідними генетичними детермінантами, а також транспозонами і бактеріофагами, а тому можуть ефективно передаватись іншим членам спільноти. Для експорту іонів металів системи ефлюксу використовують енергію АТФ або хеміосмотичного градієнта [17, 20, 23].

Усі штами АХБ, в тому числі типовий *A. ferrooxidans* ATCC 23270, мають гени, пов'язані з гомеостазом міді [6]. Насамперед це білки сімейства АТФ-ази, пов'язані з транспортом Cu^{2+} (*copA1_{AF}*, *copA2_{AF}* і *copB_{AF}*); три гени, що кодують білки сімейства RND і пов'язані зі системою ефлюксу (*cusA_{AF}*, *cusB_{AF}*, *cusC_{AF}*); а також два гени кодування периплазматичних шаперонів для Cu^{2+} (*cusF_{AF}* і *copC_{AF}*). У роботі [21] показано, що ці детермінанти стійкості до Cu^{2+} у *A. ferrooxidans* зазвичай понадекспресовані під час адаптації до іона металу у вигляді солі CuSO_4 . Слід відзначити, що АТФ-ази Р-типу транспортують в основному іони металів, які пов'язують сульфгідрильні групи білків (Cu^+/Ag^+ , $\text{Zn}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$). Це основні білки ефлюкс-системи, до якої, крім них, входять білки, що належать сімействам RND і CDF. АТФ-ази Р-типу і CDF-білки грамнегативних бактерій переносять специфічні для них субстрати крізь цитоплазматичну мембрану в периплазматичний простір, причому CDF-білки в основному специфічно взаємодіють з іонами двовалентних металів (Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} і Fe^{2+}), на відміну від білків АТФ-аз Р-типу. RND-білки утворюють транспортний комплекс, який переносить катіони з периплазматичного простору крізь зовнішню мембрану та займають центральне місце у процесі гомеостазу катіонів металів, який адаптований до високих концентрацій Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} [20].

Найбільш вивченою RND-системою є система CzcCBA, що регулює стійкість до іонів кобальту, цинку й кадмію та складається зі субодиниць С, В і А. Є також інші хеміосмотичні ефлюкс-системи CnrCBA (стійкість до іонів Co^{2+} і Ni^{2+}), NccCBA (Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}), cus-CBA (Ag^+ , Cu^{2+}) і czrCBA (Cd^{2+} , Zn^{2+}) [12, 14, 22].

Сформовані кластери можна пояснити активацією різних систем: система CzcCBA, або системи гомеостазу – АТФази Р-типу cadA, що забезпечують стійкість до цих іонів, або системи cadAB, гомологічні системі cop [19]. Точніші вказівки на транспортні системи потребують додаткового аналізу з використанням молекулярно-біологічних досліджень.

Цікавим виявився факт формування окремого кластеру, який містить іон плумбуму. У *A. ferrooxidans* відома система, спільна для іонів кадмію і плумбуму, в якій регулятор транскрипції, що реагує на ці метали, кодується одним геном (cmtRAAF), ефлюксові білки кадмію кодуються чотирма генами (czcA1AF, czcA2AF, czcB1AF і czcC1AF), а передбачуваний білок катіонного каналу, пов'язаний з транспортом кадмію, кодується двома генами (cadA1AF і cadB1AF) [18]. Однак у нашому випадку ми спостерігаємо формування окремого кластеру (рис. 3).

На наступному етапі роботи було проаналізовано залежність рівня МІК від виділеного штаму. Проведений однофакторний дисперсійний аналіз по угрупованнях показав достовірне розходження рівнів резистентності до важких металів залежно від штамів (рис. 4). Для дослідження можливих угруповань отриманих даних використовували метод ієрархічного кластерного аналізу в пакеті R 3.4.0. Для перевірки достовірності отриманої дендрограми додатково використовували бутстрап, реалізований у пакеті pvclust. Як видно із даних, наведених на рис. 5, вивчені штами залежно від рівня резистентності до металів, можна розділити на дві групи. До першої входять штами з мінімальними рівнями резистентності: *A. thiooxidans* Lv red 11, *A. thiooxidans* Lv black 6, *A. ferrooxidans* Lad 5 і *A. ferrooxidans* ATCC23270. До другої групи входять штами з більш високим рівнем резистентності (рис. 5): *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Lv black 37, *Sulfobacillus* sp. Lad 29, *A. ferrooxidans* Lad 27 і *A. ferrooxidans* DTV 1.

Almarcegui зі співавт. [6] відмітив, що в умовах, коли як джерело енергії під час культивування штамів ацидофільних хемолітотрофних бактерій використовували похідні сірки, а не двовалентний ферум, то рівень їхньої резистентності до Cu^{2+} знижувався. Це явище пояснювали тим, що у процесі використання як джерела енергії двовалентного феруму у

A. ferrooxidans ATCC 23270 за наявності іонів Cu^{2+} підвищується рівень регуляції систем RND-типу й різних відкачуючих насосів RND-типу і швидше за все відбувається придрушення основного поріну зовнішньої мембрани та деяких іонних переносників, що вказує на загальне зниження припливу металу до клітини [6, 8]. Оскільки ми під час культивування штамів *A. thiooxidans* використовували тиосульфат, то низький рівень резистентності цих штамів до металів і, зокрема, до Cu^{2+} також можна пов'язати з описаним процесом.

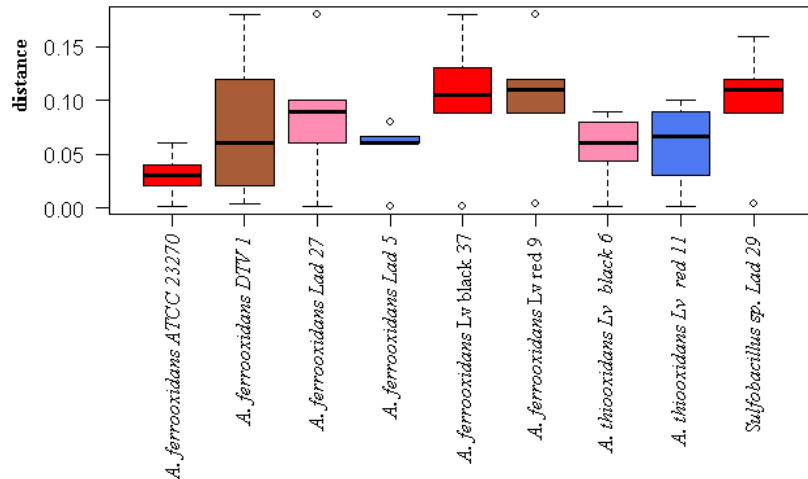


Рис. 4. Результати однофакторного дисперсійного аналізу за показниками резистентності штамів, які вивчали, до іонів металів ($F_{it}=13,136$; $F_{tab}=1,72$; $p=0,05$). У boxplot вказано мінімальні значення концентрацій металів, значення першого (Q1) кватили, медіани, значення третього (Q3) кватили, максимальні значення концентрацій металів

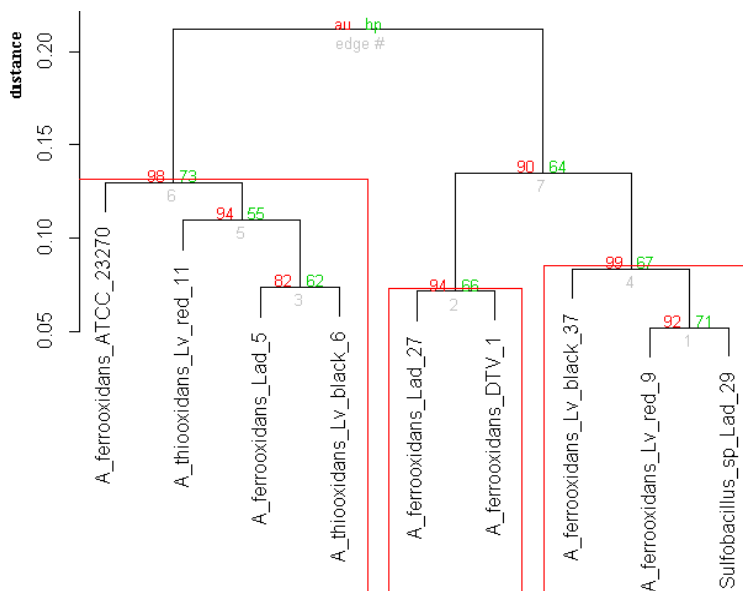


Рис. 5. Дендрограма результатів кластеризації показників резистентності штамів, які вивчали, до важких металів. Кластеризація даних з використанням функції pvcust за nboot = 1000 (матриця відстаней – method «manhattan», спосіб агрегування – method «single»)

Більш наочний розподіл штамів АХБ на групи залежно від їхнього рівня резистентності до важких металів представлено на рис. 6. Значні відмінності в показниках резистентності дають змогу розглядати штам *A. ferrooxidans* DTV 1 як окрему групу, що входить до підкластеру, який об'єднує штами *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Lv black 37, *Sulfobacillus* sp. Lad 29, *A. ferrooxidans* Lad 27 і *A. ferrooxidans* DTV 1. З нього випливає, що штами *A. ferrooxidans* DTV 1 і *A. ferrooxidans* Lad 27 мають «нерівномірний» рівень стійкості. Якщо для штамів *A. ferrooxidans* Lv red 9, *A. ferrooxidans* Lv black 37 та *Sulfobacillus* sp. Lad 29 характерна максимальна стійкість до всіх металів, для *A. ferrooxidans* ATCC 23270 і *A. ferrooxidans* Lad 5 – мінімальна, то штам *A. ferrooxidans* DTV 1 проявив високу резистентність тільки до Pb^{2+} , Cu^{2+} , і Co^{2+} , а *A. ferrooxidans* Lad 27 – тільки до Cu^{2+} і Cd^{2+} (рис. 6).

Варто відзначити, що типовий штам *A. ferrooxidans* 23270 належить до кластеру, який об'єднує штами з меншою стійкістю до важких металів. Це свідчать про те, що штами, які перебувають в умовах постійного впливу іонів важких металів, набувають більшої резистентності порівняно з лабораторними штамами, а також є непрямим доказом того, що наявність важких металів у середовищі існування мікроорганізмів стимулює експресію ефлюкс-систем.

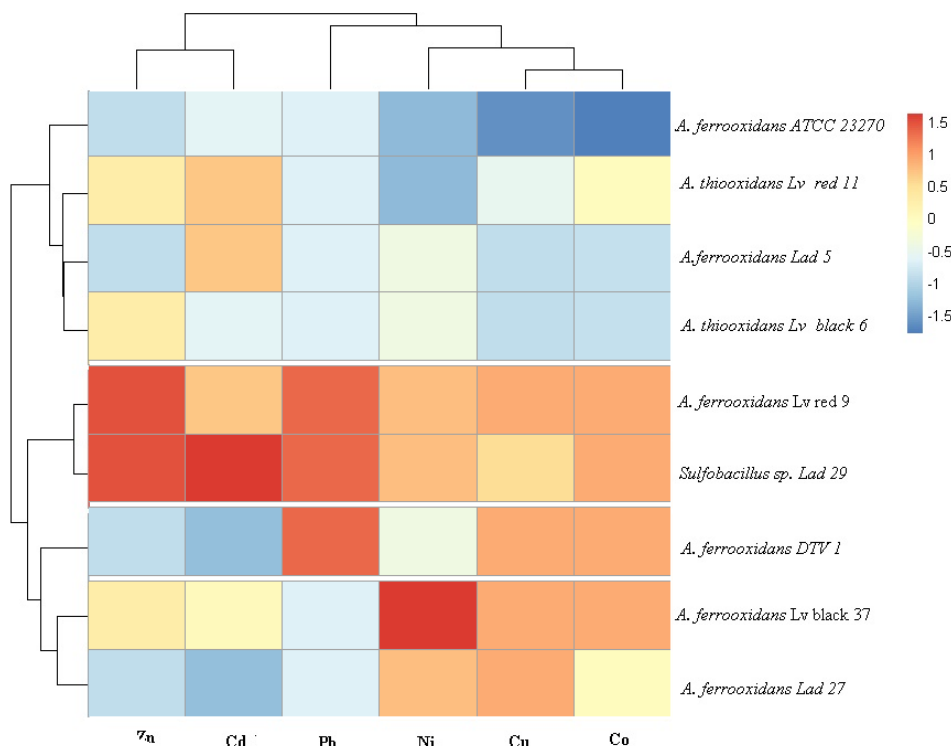


Рис. 6. Heatmap за рівнем подібності між показниками резистентності штамів АХБ залежно від металів. Схожість між змінними була розрахована за допомогою пакета heatmap у програмі R 3.4.0

Таким чином встановлено, що ізольовані з мікробіоценозів відвалів паливно-енергетичного комплексу України штами ацидофільних хемолітотрофних бактерій, як і очікувалося, мають високий рівень резистентності до ряду важких металів, причому до іонів кобаль-

ту проявила стійкість максимальна кількість штамів. Застосування статистичних методів дало змогу чіткіше згрупувати іони важких металів за рівнем їхнього впливу на штами, які досліджували. Аналіз отриманих закономірностей і літературних даних дав змогу припустити, що рівень резистентності до важких металів залежить від рівня активації систем гомеостазу виділених штамів АХБ. Використання двовалентного заліза як джерела енергії сприяє підвищенню рівня резистентності до металів, що частково пояснює різницю в рівні стійкості до металів у *A. ferrooxidans* і *A. thiooxidans* і не суперечить літературним даним [6, 11]. Показники рівня резистентності типового штаму *A. ferrooxidans* ATCC 23270 свідчать, що мікроорганізми, які перебувають в умовах постійного пресу дії важких металів у техногенних субстратах, набувають більшої резистентності до важких металів порівняно зі штамами, які зберігаються в колекціях. Показано, що резистентність залежить від джерела виділення мікроорганізмів. Можна припустити, що і рівень експресії генів, відповідальних за стійкість до іонів важких металів, також залежить від джерела виділення.

З огляду на велику кількість транспортних систем і пов'язаних із ними генів, що підтримують гомеостаз у мікроорганізмів, вивчення всіх можливих варіантів за допомогою молекулярно-генетичних методів є складним для вирішення завданням. Однак з огляду на те, що більшість таких систем є кластери генів, то і рівень їхньої регуляції має бути співрозмірний. Можливо, проводячи оцінювання реального відгуку мікроорганізмів на дію важких металів за допомогою статистичних методів із залученням додаткових факторів у вигляді фізичних або хімічних характеристик субстрату чи умов культивування, а також доповнюючи дослідження аналізом літературних даних, буде можливо виявити закономірності між реакцією мікроорганізмів і відомими ефлюкс-системами. Крім того, ми вважаємо, що більш глибоке розуміння формування системного відгуку мікроорганізмів на негативний вплив навколишнього середовища дасть змогу пояснити причини високої варіабельності показників резистентності всередині групи штамів *A. ferrooxidans*, виділених зі субстрату одного типу.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2007. Вип. 45. С. 3–28.
2. Помогайло А. Д., Уфлянд И. Е. Макромолекулярные металлохелаты. М.: Химия, 1991. 304 с.
3. Таширеві А.Б. Множественная устойчивость к токсичным металлам микроорганизмов антарктических клифов (остров Галиндез) // Укр. антаркт. журнал. 2012. № 10–11. С. 212–221.
4. Хавезов И., Цалев Д. Атомно-абсорбционный анализ. Л.: Химия, 1983. 144 с.
5. Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Мікробіол. журнал. 2009. Т. 71. № 6. С. 54–65.
6. Almarcegui R. J., Navarro C. A., Paradela A. et al. Response to copper of *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 grown in elemental sulfur // Research in Microbiology. 2014. Vol. 165. P. 761–772. doi.org/10.1016/j.resmic.2014.07.005
7. Blayda I., Vasylieva T., Sliusarenko L. et al. Isolation and study of the main properties of acidophilic chemolithotrophic bacteria isolated from the waste dumps of fuel-energy complex of Ukraine // Studia Biologica. 2018. Vol. 12. N 3–4. P. 3–16. doi: <https://doi.org/10.30970/sbi.1203.570>

8. Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. Microbial resistance to metals in the environment // *Ecotoxic. Environ. Safe.* 2000. Vol. 45. P. 198–207. doi.org/10.1006/eesa.1999.1860
9. Chakravarty R., Banerjee P. C. Morphological changes in an acidophilic bacterium induced by heavy metals // *Extremophiles.* 2008. Vol. 12. N 2. P. 279–284. doi:10.1007/s00792-007-0128-4
10. Dalgaard P. *Introductory Statistics with R.* Springer Science, 2008. 370 p. doi: 10.1007/978-0-387-79054-1
11. Dopson M., Baker-Austin C., Koppineedi P., Bond P. L. Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms // *Microbiol.* 2003. Vol. 149. P. 1959–1970. doi: 10.1099/mic.0.26296-0
12. Franke S., Grass G., Nies D. H. The product of the ybdE gene of the *Escherichia coli* chromosome is involved in detoxification of silver ions // *Microbiol.* 2001. Vol. 147. P. 965–972. doi:10.1099/00221287-147-4-965
13. Garcia-Domnguez M., Lopez-Maury L., Florencio F. J., Reyes J. C. A gene cluster involved in metal homeostasis in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* strain PCC 6803 // *J. Bacteriol.* 2000. Vol. 182. N 6. P. 1507–1514. doi: 10.1128/JB.182.6.1507-1514.2000
14. Grass G., Fan B., Rosen B. P. et al. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A Is a Nickel-Induced Transporter Conferring Nickel Resistance // *J. Bacteriol.* 2001. Vol. 183. N 9. P. 2803–2807. doi: 10.1128/JB.183.9.2803-2807.2001
15. Honsa E. S., Johnson M. D. L., Rosch J. W. The roles of transition metals in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae* // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013. Vol. 3. N 92. P. 1–15. doi:10.3389/fcimb.2013.00092
16. Karelov E., Harichov J., Stojnev T. et al. The isolation of heavy-metal resistant culturable bacteria and resistance determinants from a heavy-metal-contaminated site // *Biologia.* 2011. Vol. 66. P.18–26. doi: 10.2478/s11756-010-0145-0.
17. Lee S.-W., Glickmann E., Cooksey D. A. Chromosomal locus for cadmium resistance in *Pseudomonas putida* consisting of a cadmium-transporting ATPase and a MerR family response regulator // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. Vol. 67. N 4. P. 1437–1444. doi:10.1128/AEM.67.4.1437-1444.2001
18. Mergeay M., Monchy S., Vallaeys T. et al. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal responsive genes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. Vol. 27. N 2–3. P. 385–410. doi:10.1016/S0168-6445(03)00045-7
19. Nies D. H. CzcR and CzcD, gene products affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus* // *J. Bacteriol.* 1992. Vol. 174. P. 8102–8110.
20. Nies H. D. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. Vol. 27. N 2–3. P. 313–339. doi:10.1016/S0168-6445(03)00048-2
21. Orellana L. H., Jerez C. A. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011. Vol. 92. P. 761–767. doi:10.1007/s00253-011-3494-x
22. Outtenb F. W., Huffman D. L., Hale J. A., O'Halloran T. V. The independent cue and cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli* // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276. N 33. P. 30670–30677. doi:10.1074/jbc.M104122200
23. Van Houdt R., Monchy S., Leys N., Mergeay M. New mobile genetic elements in *Cupriavidus metallidurans* CH34, their possible roles and occurrence in other bacteria // *Ant. Van Leeuwenhoek.* 2009. Vol. 96. P. 205–226. doi:10.1007/s10482-009-9345-4

24. Wakeman C. A., Skaar E. P. Metalloregulation of Gram-positive pathogen physiology // Curr. Opin. Microbiol. 2012. Vol. 15. N 2. P.169–174. doi:10.1016/j.mib.2011.11.008

Стаття: надійшла до редакції 02.05.19

доопрацьована 20.06.19

прийнята до друку 07.10.19

APPLICATIONS OF METHODS OF DISPERSION AND CLUSTER ANALYSIS TO COMPARE THE RESISTANCE OF ACIDOPHILIC CHEMOLITHOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM DUMP PRODUCTS TO HEAVY METALS

N. Vasylieva¹, I. Blayda¹, T. Vasylieva¹, V. Baranov², I. Barba¹

¹I.I. Mechnikov Odesa National University

2, Dvoryanska St., Odesa, 65082, Ukraine

²Ivan Franko National University of Lviv

4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

e-mail: iblayda@ukr.net

In the present work, the resistance to heavy metals of one reference strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 and eight strains of acidophilic chemolithotrophic microorganisms isolated from dump products of the fuel and energy complex of Ukraine of various types was investigated. For the study were used metals that have the property of substituents (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}), metals of the “combined” action (Cu^{2+}), and metals that do not perform biological functions (Cd^{2+} , Pb^{2+}), but which are able to form insoluble complexes on/into the cells or interact with nucleic acids. It was established that the impact of metals on the studied strains of acidophilic chemolithotrophic bacteria is ambiguous and does not correspond to the scale of interaction of metals with nitrogenous heterocyclic bases of DNA. The maximum number of strains were resistant to cobalt ions (66.6 % with an MIC value of 0.09 M), about 55.5 % of the strains were resistant to impact of copper, cadmium and zinc ions with indicators of MIC of 0.13, 0.061, and 0.083 M, respectively. A statistic analysis of obtained results of the resistance to heavy metals of acidophilic chemolithotrophic bacteria with used using the methods of dispersion and cluster analyzes in the R 3.4.0 program was carried out. Clustering of the results according to the minimum inhibitory concentrations allowed us to group the studied metals into three clusters: a single (Pb^{2+}), a cluster (Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}) and subcluster (Cu^{2+}). Also, hierarchical cluster analysis based on the level of resistance of strains allowed us to divide the studied strains into two groups depending on their level of resistance to metals. The strains that were isolated from coal wastes were the most resistant to the studied metals. The active systems of metal transport of studied acidophilic chemolithotrophic bacteria were theoretically predicted based on literature data analysis. The difference in the level of resistance to metals in *A. ferrooxidans* and *A. thiooxidans* was partially associated with the use of bivalent iron as an energy source. The heterogeneity of efflux systems response to the action of heavy metals within the group of microorganisms belonging to *A. ferrooxidans* was shown.

Keywords: acidophilic chemolithotrophic bacteria, resistance, heavy metals, minimal inhibitory concentrations, efflux systems