

Особенности функциональной структуры комплексов стрептомицетов, выделенных из почв с различной степенью загрязнения тяжелыми металлами

И. Г. ШИРОКИХ^{1,2}, Е. С. СОЛОВЬЕВА¹, Т. Я. АШИХМИНА¹

¹ Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ
610002, Киров, ул. Свободы, 122
E-mail: irgenal@mail.ru

² Зональный НИИ сельского хозяйства Северо-Востока
им. Н. В. Рудницкого Россельхозакадемии
610007, Киров, ул. Ленина, 166а

Статья поступила 28.01.2014

Принята к печати 17.04.2014

АННОТАЦИЯ

На основе данных о кинетике роста представителей рода *Streptomyces* в присутствии ионов свинца, цинка и меди показаны различия в функциональной структуре комплексов почвенных стрептомицетов из экотопов с различной степенью загрязнения тяжелыми металлами (ТМ). В комплексах стрептомицетов, выделенных из почв с умеренным (селитебная зона и садово-огородные участки в городе) и повышенным (транспортная и промышленная зоны города) загрязнением, частота встречаемости представителей, увеличивающих радиальную скорость роста под воздействием 3 мг/л ионов металлов, выше, а накопление биомассы в жидкой среде с 10 мг/л Pb^{2+} , напротив, ниже, чем в стрептомицетном комплексе, выделенном из почвы фонового участка.

Ключевые слова: почва, тяжелые металлы, *Streptomyces*, радиальная скорость роста, частота встречаемости, биомасса, биосорбция.

Хозяйственная деятельность человека по производству пищи, энергии, промышленных материалов, а также транспортные перевозки сопровождаются выбросом в окружающую среду солей тяжелых металлов (ТМ). В отличие от многих других загрязнителей, не встречающихся в естественной среде, ТМ считаются загрязнением только в том случае, когда их количество значительно превышает обычное содержание для данной почвы. Кроме того, токсичность металлов сильно зависит от кислотности, гранулометриче-

ского состава, содержания органического вещества, емкости катионного обмена, степени увлажнения почвы. В соответствующих эдафических условиях повышенные концентрации ТМ вызывают негативные изменения в структуре микробного сообщества почвы или в его функциональной активности, а зачастую и то, и другое одновременно [Evdokimova, Mozgova, 2003].

Значительную долю среди бактерий, доминирующих в загрязненных ТМ почвах, по данным ДНК-анализа составляют мицелиаль-

ные спорообразующие актинобактерии – стрептомицеты [Haferburg et al., 2007; Schütze, Kothe, 2012].

Род *Streptomyces* (Actinomycetales: Streptomycetaceae) объединяет виды с высокой экологической и экономической значимостью. В природе стрептомицеты играют важную роль в поддержании динамического гомеостаза почвы, перерабатывая недоступные другим бактериям углеродсодержащие субстраты. Вклад стрептомицетов в экономику связан с их крупномасштабным использованием в производстве различных биологически активных веществ: антибиотиков, противоопухолевых препаратов, гербицидов, противопаразитарных и противогрибковых препаратов [Norwood, 2007]. Благодаря активности вторичного метаболизма стрептомицеты в скором времени могут найти применение в качестве функциональных агентов в биотехнологиях, связанных с инактивацией тяжелых металлов в природных средах и объектах [Kothe et al., 2005; Majzlik et al., 2011]. Устойчивые к “металлическому прессингу” стрептомицеты выделены преимущественно из источников, подвергшихся сильному загрязнению ТМ: шахт, промышленных отходов, сточных вод [Guo et al., 2009; Lin et al., 2011]. Однако для бактерий известны случаи выделения штаммов, устойчивых к ТМ, и из незагрязненных природных источников [De et al., 2003; Смирнова, 2005].

Цель работы – сравнительная характеристика комплексов стрептомицетов, выделенных из экотопов с различной степенью за-

грязнения тяжелыми металлами, по данным оценки роста их представителей в присутствии свинца, цинка и меди.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использованы природные изоляты стрептомицетов из почв сходного генезиса, но с различным содержанием ТМ (табл. 1). Содержание в почвах подвижных форм кадмия, цинка, свинца, железа, меди и никеля определяли на атомно-абсорбционном спектрофотометре “СПЕКТР-5-4”, предварительно экстрагируя воздушно-сухие почвенные образцы аммонийно-ацетатным буфером (рН 4,8) [Воробьева, 2006].

Выделение доминирующих в почвах стрептомицетов в чистые культуры проводили при посеве на казеин-глицериновый агар [Гаузе и др., 1983]. Перед посевом образцы почв прогревали при 70 °С в течение 4 ч для ограничения роста немикелиальных бактерий. Посевы инкубировали при 28 °С в течение двух недель. Колонии дифференцировали по культуральным и морфологическим признакам и выделяли по три-пять представителей каждого типа в чистую культуру. Каждый штамм нумеровали, и фиксировали его принадлежность к определенному почвенному образцу, что необходимо для дальнейшей обработки данных. Полученная в результате коллекция составила около 60 штаммов, из которых для дальнейшей работы отобрали 30 представителей. Принадлежность выделенных культур к роду *Streptomyces* определяли, используя

Т а б л и ц а 1
Характеристика почвенных образцов

Степень загрязнения ТМ	Место отбора образцов	Содержание подвижных форм ТМ, мг/кг			
		суммарное	Cu	Pb	Zn
Повышенная	Транспортная и промышленная зоны города	66,02	6,7	19,9	28,22
		17,3–107,3	0,5–18,1	15,1–23	12,07–46,6
Умеренная	Селитебная и садово-огородная зоны города	27,09	0,43	2,09	22,07
		12,96–39,61	0,20–0,78	1,08–4,49	11,0–36,32
Низкая	ГПЗ “Нургуш” в 50 км от города	8,0	0	0,4	0,8
		0,1–3,5		0–1,1	0,05–2,4

П р и м е ч а н и е. Над чертой – средние, под чертой – минимальные и максимальные значения показателя по пяти пространственно разобленным образцам из каждого биотопа.

микроскоп “Leica DM2500” (Германия), на основании характерных морфологических признаков: нефрагментированный мицелий, длинные цепочки спор на воздушном и отсутствие спор на субстратном мицелии. Видовую идентификацию стрептомицетов проводили согласно определителю актиномицетов Г. Ф. Гаузе с соавт. [1983].

Кинетическую реакцию культур стрептомицетов на ионы свинца, меди и цинка изучали в модельных опытах, определяя радиальную скорость роста колоний. По 10 культур рода *Streptomyces*, выделенных из почв с различной степенью загрязнения ТМ, выращивали на агаризованной среде Гаузе 1. В зависимости от варианта добавляли в среду соли ТМ (ацетат свинца, сульфаты меди (11) и цинка) в концентрациях, соответствующих в пересчете на металл 3, 6 и 30 мг/кг для свинца, 3, 6 и 15 мг/кг для меди и 3, 6 и 115 мг/кг для цинка. Каждый изолят выращивали в пяти повторениях, при температуре 28 °С. Динамику роста колоний бактерий оценивали на третьи и шестые сутки после посева. Измеряли суточный прирост диаметра колоний в двух взаимно перпендикулярных направлениях. Радиальную скорость роста колоний рассчитывали по формуле

$$K_r = (d_2 - d_1)/(t_2 - t_1),$$

где d_1 и d_2 – диаметр колонии (мм) в начальный и конечный моменты измерения соответственно; t_1 и t_2 – время (сут) начального и конечного измерения.

Биосорбцию свинца и накопление стрептомицетами биомассы в присутствии металла изучали, используя по три культуры со стабильным ростом в градиенте концентраций Pb^{2+} из каждой исследуемой почвы (табл. 2). Стрептомицеты выращивали в жидкой среде с добавлением $(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ из расчета 10 мг/л Pb^{2+} , на качалке при 25 °С в течение 7 сут. Биомассу измеряли гравиметрическим методом после фильтрации жидкой культуры и ее высушивания при 105 °С до постоянного веса.

Содержание Pb^{2+} в фильтрате и биомассе определяли на атомно-адсорбционном спектрофотометре “Спектр-5-4” (пламя: ацетилен – воздух). Культуральный фильтрат предварительно осветляли кратковременным

кипячением с небольшим количеством концентрированных HNO_3 и H_2SO_4 (по 2 мл). Биомассу озоляли при 600 °С, затем обрабатывали последовательно 1М и 1%-ным растворами HNO_3 , фильтровали и анализировали фильтрат. Рассчитывали степень извлечения свинца из жидкой среды различными штаммами и процентное содержание металла в биомассе каждого штамма. Повторность в опыте трехкратная. Полученные данные усредняли для штаммов, относящихся к одной и той же почве.

Экспериментальные данные обрабатывали стандартными методами статистического анализа с использованием пакета программ Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Помимо высокой активности метаболизма, обеспечивающего устойчивость многих представителей к токсичности металлов, стрептомицеты имеют ряд связанных с жизнью в почве морфологических приспособительных особенностей. К их числу относятся наличие воздушных гиф, позволяющих проникать через границу раздела фаз в воздушную среду, разнообразие типов спорообразования и апикальный рост, которые в экстремальных условиях, в том числе при загрязнении ТМ, дают стрептомицетам возможность колонизировать новые пространства [Schütze, Kothe, 2012].

Определение кинетики роста природных изолятов стрептомицетов на кислых средах с добавлением ионов свинца, меди и цинка показало, что радиальная скорость роста (K_r) колоний под воздействием ионной токсикации может изменяться в зависимости от природы и концентрации металла, а также вида стрептомицета как в сторону снижения, так и повышения по сравнению с K_r в обычных условиях. Реакция большинства исследованных штаммов на добавление в среду ионов металлов в низкой концентрации (3 мг/л) заключалась в увеличении K_r по сравнению с контролем (см. табл. 2). Существенно скорость роста увеличилась в присутствии свинца у изолятов из городских почв *S. griseolus* у-53 и *S. californicus* у-53 (соответственно в 2 и 2,7 раза), у изолятов из фоновой почвы *S. sin-*

Радиальная скорость роста стрептомицетов из почв различной степени загрязнения на средах с добавлением ионов металлов

Штамм	К _r (мкм/ч)			Синтез (по [Гаузе и др., 1983])		
	контроль	на средах с добавлением 3 мг/л			меланинов	антибиотиков
		Pb ²⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺		
Почвы с повышенным загрязнением ТМ						
* <i>S. clavuligerus</i> y-21	28,5 ± 10,5	27,8 ± 0	26,4 ± 10,3	56,2 ± 18,2	Нет	Есть
<i>S. nigrifaciens</i> y-13	34,9 ± 6,8	20,8 ± 6,9	23,6 ± 6,2	15,3 ± 3,1	»	Нет
<i>S. spheroides</i> y-24	19,4 ± 7,5	27,8 ± 0	30,5 ± 7,9	25,0 ± 3,8	»	Есть
<i>S. globisporus</i> y-22	29,8 ± 12,0	13,9 ± 0	45,8 ± 6,2	44,4 ± 6,2	»	»
<i>S. griseolus</i> y-53	24,9 ± 6,2	50,0 ± 13,4	23,6 ± 3,8	23,6 ± 6,2	»	»
* <i>S. lavendulae</i> y-51	18,1 ± 9,3	25,0 ± 3,8	37,4 ± 9,3	27,8 ± 0	Есть	»
<i>S. californicus</i> y-53	13,9 ± 0	37,5 ± 3,8	43,0 ± 5,8	34,7 ± 6,9	Нет	»
<i>S. bacillaris</i> y-52	16,7 ± 3,8	25,0 ± 3,8	41,6 ± 9,8	37,5 ± 6,2	Есть	»
* <i>S. bacillaris</i> y-53	27,7 ± 4,9	20,8 ± 6,9	29,2 ± 7,6	30,6 ± 6,2	»	»
<i>S. spiroverticillatus</i> y- 52	23,6 ± 3,8	38,9 ± 7,9	22,2 ± 12,6	41,7 ± 13,9	Нет	Нет
Почвы с умеренным загрязнением ТМ						
<i>S. cinereorectus</i> y-56	21,8 ± 2,3	36,1 ± 5,8	33,3 ± 7,6	38,8 ± 6,2	»	Есть
<i>S. helveticus</i> y-58	35,4 ± 5,7	40,2 ± 10,3	41,6 ± 4,9	38,8 ± 3,8	»	Нет
* <i>S. felleus</i> y-57	41,6 ± 3,6	47,2 ± 5,8	41,6 ± 8,5	25,0 ± 6,2	»	Есть
<i>S. tuberoideus</i> y-58	44,7 ± 4,7	44,4 ± 3,8	51,4 ± 16,7	51,3 ± 6,2	»	»
* <i>S. exfoliatus</i> y-56	38,5 ± 8,7	47,2 ± 5,8	31,9 ± 6,2	44,4 ± 6,2	»	»
* <i>S. aureofaciens</i> y-61	30,2 ± 2,3	45,8 ± 3,8	45,8 ± 16,7	27,8 ± 4,9	»	»
<i>S. aburaviensis</i> y-55	38,5 ± 7,0	49,9 ± 7,6	37,5 ± 6,2	41,6 ± 4,9	»	»
<i>S. mutomycini</i> y-64	48,9 ± 4,7	55,5 ± 13,0	59,7 ± 6,2	73,6 ± 9,3	»	»
<i>S. globisporus</i> y-55	22,9 ± 8,7	52,8 ± 22,8	62,5 ± 6,9	61,1 ± 3,1	»	»
<i>S. filamentosus</i> y-63	33,3 ± 9,5	55,5 ± 0	51,4 ± 3,8	54,1 ± 3,1	»	»
Фоновая почва						
<i>A. cremeospinus</i> н-1	16,4 ± 5,6	20,8 ± 0	29,2 ± 11,4	0 ± 0	Нет	Есть
* <i>S. bacillaris</i> н-2	38,8 ± 3,8	39,6 ± 11,4	29,2 ± 8,7	10,4 ± 5,1	Есть	»
<i>S. sindenensis</i> н-3	8,3 ± 7,6	20,8 ± 0	50,0 ± 11,4	14,6 ± 9,3	Нет	»
* <i>S. aureofaciens</i> н-4	6,9 ± 4,9	20,8 ± 0	20,8 ± 0	8,3 ± 11,4	»	»
<i>S. candidus</i> н-5	22,2 ± 9,0	18,7 ± 8,7	20,8 ± 16,5	41,7 ± 0	»	»
* <i>S. globisporus</i> н-6	31,9 ± 3,8	29,2 ± 11,4	29,2 ± 11,4	37,5 ± 9,3	»	»
<i>S. globisporus</i> н-7	15,3 ± 3,1	20,8 ± 14,7	14,6 ± 9,3	0 ± 0	»	»
<i>S. bacillaris</i> н-8	43,0 ± 7,6	39,6 ± 11,4	35,4 ± 9,3	33,3 ± 11,4	Есть	»
<i>S. sindenensis</i> н-9	25,0 ± 6,2	4,2 ± 5,6	8,3 ± 8,7	8,3 ± 11,4	Нет	»
<i>S. candidus</i> н-10	25,0 ± 3,8	16,6 ± 5,7	29,2 ± 13,6	27,1 ± 14,0	»	»

Примечание. * В таблице приведены средние значения K_r и их ошибки. Культуры, использованные в опыте по биосорбции свинца.

denensis н-3 и *S. aureofaciens* н-4 (в 3 раза по сравнению с контролем). В присутствии меди скорость роста городских изолятов *S. californicus* y-53, *S. globisporus* y-55 и *S. bacillaris* y-52 увеличилась более чем в 2 раза, а в присутствии цинка возросла в 2,5 раза у изоля-

та *S. bacillaris* y-52 и в 3 раза – у *S. californicus* y-53. У выделенных из фоновой почвы *S. sindenensis* н-3 и *S. aureofaciens* н-4 скорость роста колоний на среде с 3 мг/л цинка превосходила в 6 и 3 раза соответственно контрольные значения K_r. Если рассмат-

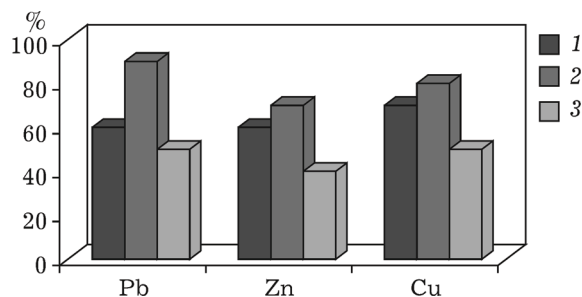


Рис. 1. Частота встречаемости представителей, увеличивающих K_r под воздействием низких концентраций металлов, в комплексах стрептомицетов в почвах с повышенным (1), умеренным (2) загрязнением и фоновой (3)

ривать кинетическую реакцию как проявление физиологической адаптации стрептомицетов к токсическому действию металла, то выделившиеся по возрастанию K_r почвенные стрептомицеты обладали толерантностью одновременно к двум (*S. bacillaris* у-52, *S. sindenensis* н-3, *S. aureofaciens* н-4) и трем (*S. californicus* у-53) различным металлам.

В то же время более чем у половины штаммов, выделенных из фоновой почвы, добавление в среду металлов в низкой концентрации, напротив, замедляло рост колоний. Анализ средних значений K_r для культур, выделенных из экотопов с различной степенью загрязнения ТМ, не выявил существенных различий между ними в кинетике роста стрептомицетов. Однако стрептомицетные комплексы из почв с различной степенью загрязнения различались по частоте встречаемости (%) представителей, ответная реакция которых на низкие дозы металлов заключалась в увеличении K_r (рис. 1).

С большей частотой культуры, увеличивающие K_r , встречались в комплексе стрептомицетов, выделенных из городских почв с умеренным (70–90 %) и повышенным (60–70 %) загрязнением ТМ, чем в комплексе фоновой почвы (40–50 %). Вероятно, представители рода *Streptomyces*, развивавшиеся в условиях загрязненной ТМ городской среды, успешнее реализуют стратегию “ухода” от токсиканта, чем представители, прежде не имевшие контакта с ТМ. Роль преадаптации в развитии у стрептомицетов устойчивости к ТМ на метаболическом уровне отмечалась неоднократно [Albarracín et al., 2008; Haferburg

et al., 2009; Schmidt et al., 2009], тогда как значение преадаптации на уровне кинетики мицелиального роста в доступной нам литературе ранее не рассматривалось. Очевидно, стратегию “ухода” реализуют виды, не способные справляться с токсичностью металла на метаболическом уровне, или же, наоборот, виды, устойчивые для того, чтобы изменять под его воздействием кинетику роста.

Следует отметить, что пределы выносливости выделенных из городских почв культур *S. bacillaris* у-52 и *S. californicus* у-53 оказались шире, чем у изолятов из фоновой почвы *S. sindenensis* н-3 и *S. aureofaciens* н-4, рост которых прекращался при увеличении в среде концентраций меди до 6 мг/л и цинка до 115 мг/л. В отличие от всех других культур в опыте, штаммы *S. bacillaris* у-52 и *S. californicus* у-53 из загрязненных почв росли в присутствии 15 мг/л меди и 115 мг/л цинка. При этом K_r *S. bacillaris* у-52 снижалась в 2–3 раза, составляя 7 и 5,6 мкм/ч, а K_r культуры *S. californicus* у-53 оставалась в обоих случаях более высокой (20,5 и 20,8 мкм/ч соответственно), чем в контроле (13,9 мкм/ч). Уже в ранней работе отмечена толерантность вида *S. californicus* к цинку, а также к ртути, кадмию и кобальту [Abbas, Edwards, 1989].

Для бактерий с множественной устойчивостью к металлам характерно существование сразу нескольких механизмов, участвующих в защите клеток от ионной токсикации [Янева, 2009]. Распространенной стратегией внеклеточного связывания токсичных ионов у стрептомицетов является продукция меланинов и других пигментов, а также синтез антибиотиков, способных понижать биодоступность металлов [Haferburg, Kothe, 2007]. Определение частоты встречаемости видов, способных к синтезу меланинов, не выявило значительных различий в структуре сравниваемых стрептомицетных комплексов. К меланинообразующим из всей выборки стрептомицетов отнесены только виды *S. bacillaris* и *S. lavendulae*. Один из них (*S. bacillaris*) часто встречался как в фоновой, так и в загрязненных городских почвах (см. табл. 2). В то же время комплексы стрептомицетов из почв с повышенным, умеренным загрязнением и фоновой различались по частоте встречаемости представителей, способных к синтезу

антибиотиков (80, 90 и 100 % соответственно), что совпадает с ранее полученными данными о более низком антибиотическом потенциале стрептомицетов в урбаноземах, чем в почвах за пределами городской черты [Широких и др., 2011].

Для меди минимальная концентрация, при которой рост у части стрептомицетов отсутствовал полностью, составила 6 мкг/мл. Эффективным способом защиты стрептомицетов от меди является деятельность экстрацеллюлярных Cu (II)-редуктаз, которые катализируют превращение токсичных форм в менее токсичные – Cu (I) [Albarracín et al., 2008]. Авторы подчеркивают роль преадаптации в развитии данного защитного механизма, указывая, что активность Cu-редуктаз обнаруживалась как у адаптированных, так и у неадаптированных к меди культур, но в первом случае этот показатель в 100 раз выше. Низкое содержание меди во всех исследуемых почвах (см. табл. 1) не могло обеспечить бактериям преадаптацию ни в одном из биотопов, поэтому стрептомицетные комплексы в почвах разной степени загрязнения различались по встречаемости (70–80 %) представителей, чувствительных к этой дозе меди, незначительно.

Для цинка минимальная ингибирующая рост стрептомицетов концентрация оказалась существенно выше, чем для меди и составила 115 мкг/л. Цинк относится к числу элементов, для которых характерен активный транспорт ионов из клетки (эффлюкс). Эффлюкс представляет наиболее обширную группу систем устойчивости бактерий к ионам металлов, в состав которых могут входить белки, принадлежащие к трем семействам: RND (resistance, nodulation, cell division), CDF (cation diffusion facilitator) и АТФазы Р-типа [Янева, 2009]. Транспортные белки АТФаз Р-типа, принимающие участие в эффлюксе ионов Zn^{2+} , обнаружены у актинобактерий [Riccardi et al., 2008]. У представителей рода *Streptomyces* в поддержании внутриклеточного гомеостаза также участвуют АТФазы Р-типа [Amoroso et al., 2000]. О том, что их работа тоже индуцируется повышенным содержанием токсичного металла в среде, говорит то, что представители стрептомицетных комплексов из городских почв в присутствии 115 мкг/л ионов цинка в основном со-

храняли способность к росту, чему, очевидно, способствовало формирование соответствующих систем устойчивости в результате селективного давления среды: содержание цинка в городских почвах на два порядка выше, чем в фоновой (см. табл. 1). Частота встречаемости (50 %) чувствительных к цинку видов в комплексе стрептомицетов фоновой почвы в 5 раз выше, чем в городских почвах (10 %).

В результате добавления в среду свинца ни у одного из штаммов рост в диапазоне исследуемых концентраций полностью не прекратился, а около трети представителей (*Actinomyces cremeospinus* н-1, *S. bacillaris* н-8, *S. globisporus* н-7, *S. globisporus* у-22, *S. helveticus* у-58, *S. tuberoidicus* у-58) в комплексах каждой из исследуемых почв характеризовались в присутствии 30 мг/л Pb^{2+} , напротив, более высокой K_m , чем при менее высоких концентрациях и в контроле. По-видимому, механизм защиты стрептомицетов от свинца как абсолютного ксенобиотика шире распространены в популяциях мицелиальных прокариот, чем механизмы устойчивости к избытку эссенциальных элементов – цинка и меди. Устойчивость стрептомицетов к свинцу связывают с его внеклеточным осаждением белком, имеющим высокую степень гомологии с Fe–Zn-содержащей супероксиддисмутазой (СОД) из *S. griseus*, но отличающимся высоким содержанием триптофана и низким тирозина от других известных СОД стрептомицетов [So et al., 2001; Rho, Kim, 2002]. СОД также снижает в клетке уровень активных форм кислорода, обусловленный токсификацией ионами металлов.

В наших экспериментах определение концентрации свинца в культуральных фильтрах спустя 7 сут от начала культивирования стрептомицетов в жидкой среде с добавлением 10 мг/л ионов свинца, показало, что количество извлеченного металла во всех случаях приближалось к 100 % вне зависимости, из какого почвенного местообитания были выделены культуры (рис. 2, а).

Содержание свинца в биомассе стрептомицетов в зависимости от штамма и места его изоляции изменялось тоже незначительно (от 4,1 до 8,81 мг/г). Эти результаты подтверждают мнение некоторых исследователей, что сорбция металлов мицелием стрептомицетов

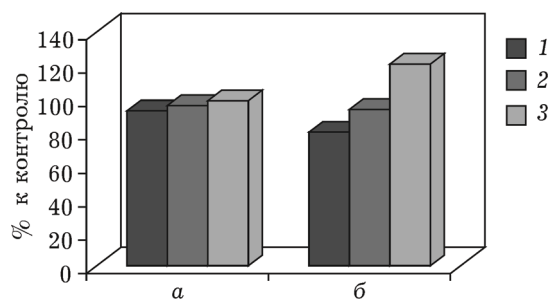


Рис. 2. Извлечение свинца из раствора (а) и накопление биомассы (б) стрептомицетами, выделенными из почв с повышенным (1), умеренным (2) загрязнением и фоновых (3)

сводится к физико-химической реакции ионов металла с компонентами клеточной стенки бактерий и не коррелирует с устойчивостью культуры к металлу [Rho, Kim, 2002].

В отличие от биосорбции рост мицелиальной массы стрептомицетов в жидкой среде с добавлением свинца различался по интенсивности в зависимости от места выделения культуры. Накопление биомассы изолятами из почв с повышенным и умеренным загрязнением ТМ было меньше, чем в контроле, в среднем на 20,1 и 6,5 % соответственно (см. рис. 2, б). Биомасса изолятов из фоновой почвы в тех же условиях, напротив, превышала на 20,7 % средние значения, полученные в контрольном варианте.

Обусловленные свинцом различия в накоплении биомассы прослеживались не только между средними значениями для сравниваемых выборок стрептомицетов, но и при сравнении штаммов одного вида, относящихся к почвам, различающимся между собой по степени загрязнения ТМ (рис. 3).

Так, биомасса культур *Streptomyces aureofaciens* и *S. bacillaris*, выделенных из фоновой почвы, превосходила на 12 и 30 % биомассу штаммов этих же видов, изолированных из городских почв. По эффективности удаления ионов Pb^{2+} из жидкой среды штаммы между собой различались незначительно. Стимуляция свинцом роста мицелиальной массы у культур из фоновой почвы, ранее не контактировавших с металлами, может быть связана с усилением метаболической активности стрептомицетов в присутствии ионов металла на уровне транскрипции [Weinberg, 1990], или же в результате ин-

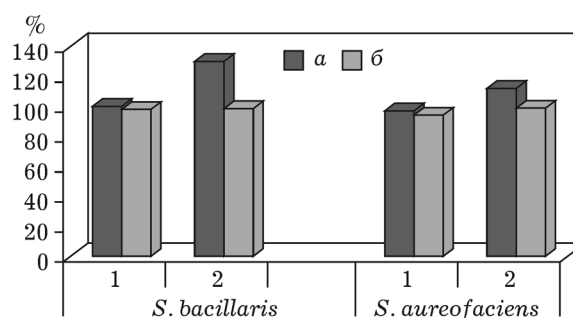


Рис. 3. Накопление биомассы в присутствии свинца (а) и его извлечение из раствора (б) изолятами стрептомицетов из загрязненных (1) и фоновой (2) почв

дукции так называемых “спящих” генов. Анализ структуры генома резистентных к ТМ представителей рода *Streptomyces* показал, что системы устойчивости к ионам металлов появились у актинобактерий задолго до техногенного загрязнения окружающей среды [Alvarez et al., 2013]. Поэтому известные случаи выделения устойчивых штаммов из незагрязненных природных источников объясняются индукцией металлами “спящих” генов устойчивости [Haferburg et al., 2009].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований показали, что комплексы стрептомицетов в почвах сходного генезиса, но с различной степенью загрязнения ТМ, при относительно высоком сходстве таксономической структуры могут значительно различаться по своим функциональным проявлениям. Стрептомицетные комплексы, подвергшиеся селективному давлению металлов-загрязнителей городской среды, характеризовались в нашей работе более высокой частотой встречаемости представителей, увеличивающих радикальную скорость роста под влиянием невысоких доз свинца, меди и цинка, чем комплекс стрептомицетов фоновой почвы. Кинетическая реакция на возрастающие концентрации металлов в среде зависела от природы металла и вида стрептомицета. Минимальная ингибирующая рост стрептомицетов концентрация для меди (6 мкг/мл), оказалась значительно ниже, чем для цинка (115 мкг/л). Для свинца ингибирующая концентрация в

исследованном диапазоне (3–30 мкг/мл) не выявлена. Устойчивые к свинцу, цинку и меди штаммы стрептомицетов встречались как в городских (*S. bacillaris* у-52, *S. californicus* у-53) почвах, так и в почве фоновой (*S. sindenensis* н-3, *S. aureofaciens* н-4). Если в первом случае их устойчивость являлась следствием адаптации к постоянному воздействию на них ТМ, то во втором, вероятно, – индукции “спящих” генов устойчивости.

В жидкой среде с добавлением 10 мг/л Pb^{2+} более высокую, чем в контроле, биомассу наращивали культуры стрептомицетов из фоновой почвы, а более низкую – культуры из городских почв. Величина сорбции свинца мицелиальной массой стрептомицетов не связана непосредственно с устойчивостью штамма к металлу.

Выявленные особенности структуры комплексов почвенных стрептомицетов представляют интерес, в первую очередь, в связи с проблемой биоремедиации загрязненных ТМ сред и объектов, расширяя наши представления о разнообразии экотопов, пригодных для поиска и выделения штаммов с высоким биоремедиационным потенциалом, а также в связи с созданием биосенсорных систем для обнаружения металлов.

ЛИТЕРАТУРА

- Воробьева Л. А. Теория и практика химического анализа почв. М.: ГЕОС, 2006. С. 400.
- Гаузе Г. Ф., Преображенская Т. П., Свешникова М. А., Терехова Л. П., Максимова Т. С. Определитель актиномицетов. Роды *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Chainia*. М.: Наука, 1983. 248 с.
- Смирнова Г. Ф. Распространение бактерий, устойчивых к кислородосодержащим ксенобиотикам // Микробиол. журн. 2005. Т. 67, № 5. С. 11–18.
- Широких И. Г., Ашихмина Т. Я., Широких А. А. Особенности актиномицетных комплексов в урбаноэкомах г. Киров // Почвоведение. 2011. № 2. С. 199–205.
- Янева О. Д. Механизмы устойчивости бактерий к ионам тяжелых металлов // Микробиол. журн. 2009. Т. 71, № 6. С. 54–65.
- Abbas A., Edwards C. Effects of metals on a range of *Streptomyces* species // Appl. Environ. Microbiol. 1989. Vol. 55. P. 2030–2035.
- Albarracin V. H., Avila A. L., Amoroso M. J., Abate C. M. Copper removal ability by *Streptomyces* strains with dissimilar growth patterns and endowed with cupric reductase activity // FEMS Microbiol. Lett. 2008. Vol. 288. P. 141–148.
- Alvarez A., Catalano S. A., Amoroso M. J. Heavy metal resistant strains are widespread along *Streptomyces* phylogeny // Mol. Phylogenet. Evol. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2012.11.025>.
- Amoroso M.-J., Schubert D., Mitscherlich P., Schumann P., Kothe E. Evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant *Streptomyces* spec // J. Basic Microbiol. 2000. Vol. 40. P. 295–301.
- De J., Ramaiah N., Mesquita A., Verlekar X. N. Tolerance to various toxicants by marine bacteria highly resistant to mercury // Mar. Biotechnol. 2003. Vol. 5, N 2. P. 185–193.
- Evdokimova G. A., Mozgova N. P. Restoration of properties of cultivated soils polluted by copper and nickel // J. Environ. Monitoring. 2003. Vol. 5, N 4. P. 667–670.
- Guo J. K., Lin Y. B., Zhao M. L., Ran Sun, Wang T. T., Tang M., Wei G. H. *Streptomyces plumbiresistens* sp. nov., a leadresistant actinomycete isolated from lead-polluted soil in north-west China // Int. Journ. System. and Evolutionary Microbiol. 2009. Vol. 59. P. 1326–1330.
- Haferburg G., Groth I., Mollmann U., Kothe E., Sattler I. Arousing sleeping genes: shifts in secondary metabolism of metal tolerant actinobacteria under conditions of heavy metal stress // Biometals. 2009. Vol. 22. P. 225–234.
- Haferburg G., Reinicke M., Merten D., Schmidt A., Schmidt T., Schütze E. Microbes adapted to acid mine drainage as source for strains active in retention of aluminum or uranium // J. Geochem. Explor. 2007. Vol. 92. P. 196–204.
- Haferburg G., Kothe E. Microbes and metals: interactions in the environment // J. Basic Microbiol. 2007. Vol. 47. P. 453–467.
- Hopwood D. A. *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York: Oxford University Press Inc., 2007. 250 p.
- Kothe E., Bergman H., Buchel G. Molecular mechanisms in bio-geo-interactions: from a case study to general mechanisms // Geochemistry. 2005. Vol. 65. P. 7–27.
- Lin Y. B., Wang X. Y., Li H. F., Wang N. N., Wang H. X., Tang M., Wei G. H. *Streptomyces zinciresistens* sp. nov., a zinc-resistant actinomycete isolated from soil from a copper and zinc mine // Int. Journ. System. and Evolutionary Microbiol. 2011. Vol. 61. P. 616–620.
- Majzlik P., Strasky A., Adam V., Nemeč M., Trnkova L., Zehnalek J., Hubalek J., Provazník I., Kizek R. Influence of Zinc (II) and Copper (II) Ions on *Streptomyces* Bacteria Revealed by Electrochemistry // Int. Journ. Electrochem. Sci. 2011. N 6. P. 2171–2191.
- Rho J., Kim J. Heavy Metal Biosorption and its Significance to Metal Tolerance of *Streptomyces* // J. Microbiol. 2002. Vol. 40. P. 51–54.
- Riccardi G., Milano A., Pasca M. R., Nies D. H. Genomic analysis of zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis* // FEMS Microbiol. Lett. 2008. Vol. 287. P. 1–7.
- Schmidt A., Haferburg G., Schmidt A., Merten D., Gherghel F., Buchel G., Kothe E. Heavy metal resistance to the extreme: *Streptomyces* strains from a former uranium mining area // Chemie Erde. 2009. Vol. 69, S2. P. 35–44.

Schütze E., Kothe E. Heavy Metal-Resistant Streptomycetes in Soil. In: Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils // Soil Biol. 2012. Vol. 31. P. 163–182.
So N. W., Rho J. Y., Lee S. Y., Hancock I. C., Kim J. H. A lead-absorbing protein with superoxide dismutase

activity from *Streptomyces subbrutilus* // FEMS Microbiol. Lett. 2001. Vol. 194. P. 93–98.
Weinberg E. D. Roles of trace metals in transcriptional control of microbial secondary metabolism // Biol. Metals. 1990. Vol. 2. P. 191–196.

Functional Specificity in the Structure of Streptomycete Complexes in the Soils Contaminated with Heavy Metals

I. G. SHIROKIKH^{1,2}, E. S. SOLOVYEVA¹, T. Ya. ASHIHMINA¹

¹ Laboratory of Biomonitoring, Institute of Biology
Komi Scientific Center of Ural Division of RAS and Vyatka State University of Humanities
610002, Kirov, Svobody str., 122
E-mail: irgenal@mail.ru

² N. V. Rudnitski Zonal North-East Agricultural Research Institute
610007, Kirov, Lenina str., 166a

The data on growth kinetics of the representatives of the genus *Streptomyces* under the influence of lead, zinc and copper ions was used to show the differences in the functional structure of soil streptomycete complexes in ecotopes with various degrees of heavy metal pollution. We compared streptomycetes obtained from moderately (residential zone, garden patches) and severely polluted soils (traffic zone, industrial area) with streptomycetes taken on the background site. As the result, the former showed higher radial growth rate under the influence of 3 mg/l of metal ions and lower biomass accumulation in liquid medium supplemented with 10 mg/l of Pb²⁺ than the latter.

Key words: soils, heavy metals, *Streptomyces*, radial growth rate, frequency of occurrence, biomass, biosorption.