

А. Б. Таширев, Н. А. Матвеева, В. А. Романовская,
А. А. Таширева, П. В. Рокитко

Полирезистентность и сверхустойчивость к тяжелым металлам антарктических микроорганизмов

(Представлено академиком НАН Украины П. Ф. Гожижком)

It is shown for the first time, that in Antarctic Region (island Galindez of the Argentine archipelago) are occurred the microorganisms which are resistant to high concentrations of toxic heavy metals. The microorganisms which grow under aerobic conditions in the presence of 200–500 ppm Hg^{2+} , 1000–3000 ppm Cu^{2+} , and 3000–60000 ppm CrO_4^{2-} are isolated. Microorganisms are characterized by a polyresistance to metals (Hg^{2+} , Cu^{2+} and CrO_4^{2-}). They grow in the presence of these three metals separately and in their mixture. On adding glucose to a nutrient medium (20 g/l), microorganisms reduce CrO_4^{2-} up to insoluble $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$. The absence of correlation between the resistance of microorganisms to high concentrations of metals and the concentration of these metals in the Antarctic soils is shown. The number of soil microorganisms, which are resistant to 1000 ppm Cu^{2+} , was $10^6 \dots 10^8$ cells/g of soil, and the concentration of copper in soils was in a range 13 ... 172 ppm. Probably, the isolated microorganisms are “retro-forms”, and their resistance to high concentrations of toxic metals was formed during an epoch of neotectonic activities in the Antarctic Region.

Исследования антарктической микрофлоры начаты нами в 2002 г. на биогеографическом полигоне острова Галиндез (Galindez) [1]. Остров входит в состав Аргентинского архипелага, расположен рядом с Антарктическим полуостровом и отделен от него проливом Пенола (Penola) шириной 7 км. Ранее нами показано, что в Антарктике (в том числе и на о. Галиндез) широко распространены микроорганизмы, резистентные к бактерицидным концентрациям тяжелых металлов [2]. В данной работе приведены результаты изучения полирезистентности антарктических микроорганизмов к тяжелым металлам, а также выделены микроорганизмы, устойчивые к сверхвысоким концентрациям (более 500 мг/л) Hg^{2+} , Cu^{2+} и CrO_4^{2-} .

Образцы почво-субстратов отбирали на о. Галиндез (почва в Антарктике не полностью сформирована и отличается от почв регионов с умеренным климатом; поэтому условно обозначена как “почво-субстрат”). Образцы хранили при -18°C . Размороженные образцы (100 мг) растирали в фарфоровой ступке, добавляли дистиллированную воду (10 мл), перемешивали на магнитной мешалке (2 ч) и высевали на поверхность агаризованной среды: мясопептонный агар и/или среда “Nutrient Agar” (фирма HiMedia Laboratories Pvt. Ltd). В качестве дополнительного источника углерода и энергии в среды вносили глюкозу (10–20 г/л). Металлы вносили в среду в концентрационном диапазоне 100–3000 мг/л Cu^{2+} , 10–500 мг/л Hg^{2+} , 100–60000 мг/л Cr(VI). Хром(VI) вносили в среду в виде $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$, в пересчете на концентрацию Cr(VI) (катиона Cr^{6+}). Чистые культуры выделяли стандартными методами, чередуя посевы на среды с металлами и без них, и культивировали при 20°C . Изолированные штаммы хранили при 5°C на скошенной агаризованной среде (как с металлами, так и без них).

Установлено, что в 60% образцов, отобранных на о. Галиндез (всего исследовано — 50 образцов), количество медьрезистентных микроорганизмов составляло от 10^8 до 10^9 клеток/г образца. Вместе с тем результаты химического анализа этих образцов показали низкое содержание в них токсичных тяжелых металлов. Так, в 19 пробах биогеографического полигона на о. Галиндез концентрация тяжелых металлов находилась в пределах, мг/кг образца: меди — 13–75, никеля — 8–12, свинца — 3–25, хрома и ртути — менее 1. Несмотря на столь низкое содержание тяжелых металлов в исследованных образцах, из них были изолированы микроорганизмы, устойчивые к 100–400 мг/л меди (Cu^{2+}). При высеве образца грунтовой высыпки (северо-восточный сектор полигона) на среду с содержанием 1000 мг/л Cu^{2+} количество выросших микроорганизмов составляло 10^8 клеток/г почвы, а концентрация меди на этом участке полигона находилась в диапазоне 13–172 мг/кг почвы. Обильный рост микроорганизмов наблюдали на 2-е — 3-и сут как в контроле без Cu^{2+} , так и при высокой концентрации меди — 1000 мг/л Cu^{2+} (рис. 1). Полученные результаты позволили сделать вывод о существовании и широком распространении в исследованной нами зоне Антарктики медьрезистентных микроорганизмов.

Медьрезистентные микроорганизмы не только росли в присутствии Cu^{2+} , но и взаимодействовали с медью. Мы предполагаем, что взаимодействие носило характер детоксикации. Возможные микробные механизмы детоксикации Cu^{2+} микроорганизмами указаны ниже.

1. Восстановление токсичной Cu^{2+} до нерастворимых, а значит, и нетоксичных соединений Cu(I) . Так, при росте культуры В-3205 в присутствии 200 мг/л Cu^{2+} в агаризованной среде образовывались друзы кристаллов коричневого цвета (0,3–0,5 мм), по-видимому, вследствие восстановления микроорганизмами Cu^{2+} до нерастворимых соединений Cu(I) , например $\text{CuOH} \downarrow$ или $\text{Cu}_2\text{O} \downarrow$ (рис. 2, а).

2. Выделение микроорганизмами в среду металлтионеинов и подобных им соединений коричневого цвета, связывающих катионы тяжелых металлов. При наличии в среде 200 мг/л Cu^{2+} культуры В-3201, В-3206, В-3208, В-3209 на протяжении 10–12 сут изменяли цвет агаризованной среды от голубой до темно-коричневой. Такое окрашивание появлялось в зоне, примыкающей к растущей культуре. Поэтому можно предположить, что микроорганизмы в качестве защитной реакции выделяют метаболиты, сходные с металлтионеинами (см. рис. 2, б).

3. Детоксикация катионов тяжелых металлов экзометаболитами — органическими кислотами, образующими комплексные соединения металлами, в том числе и Cu^{2+} . При наличии в среде 1000 мг/л Cu^{2+} микроорганизмы В-3201, В-3206, В-3208 на протяжении 10–14 сут роста изменяли цвет агаризованной среды от блекло-бирюзового до яркого сине-фиолетового (см. рис. 2, в). Интенсивность окраски среды усиливалась по мере роста микроорганизмов. В аналитической химии [3] для количественного определения соединений меди(II) используется колориметрическая реакция Cu^{2+} с ацетатом или другими органическими кислотами, вследствие которой катион Cu^{2+} образует комплексное соединение с ярко-фиолетовым окрашиванием. Поэтому можно предположить, что некоторые изолированные нами микроорганизмы синтезируют органические кислоты в качестве защитной реакции на присутствие в среде 1000 мг/л Cu^{2+} .

Таким образом, возможно, антарктические микроорганизмы осуществляют, по крайней мере, три механизма детоксикации Cu^{2+} : восстановление до нерастворимых соединений Cu(I) , связывание Cu^{2+} металлтионеинами и образование комплексных соединений Cu^{2+} с органическими кислотами.

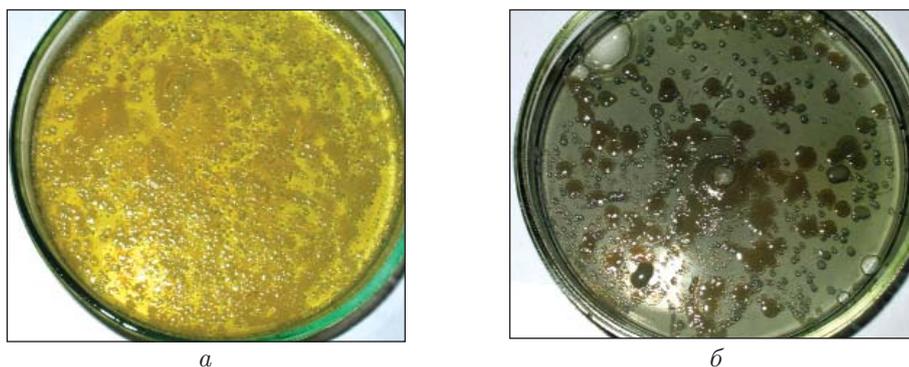


Рис. 1. Рост антарктических микроорганизмов при 1000 мг/л Cu^{2+} . Колонии, выросшие при посеве почвенной суспензии (разведение $1:10^8$) на мясопептонный агар: *a* — контроль, в отсутствие Cu^{2+} ; *б* — при 1000 мг/л Cu^{2+}

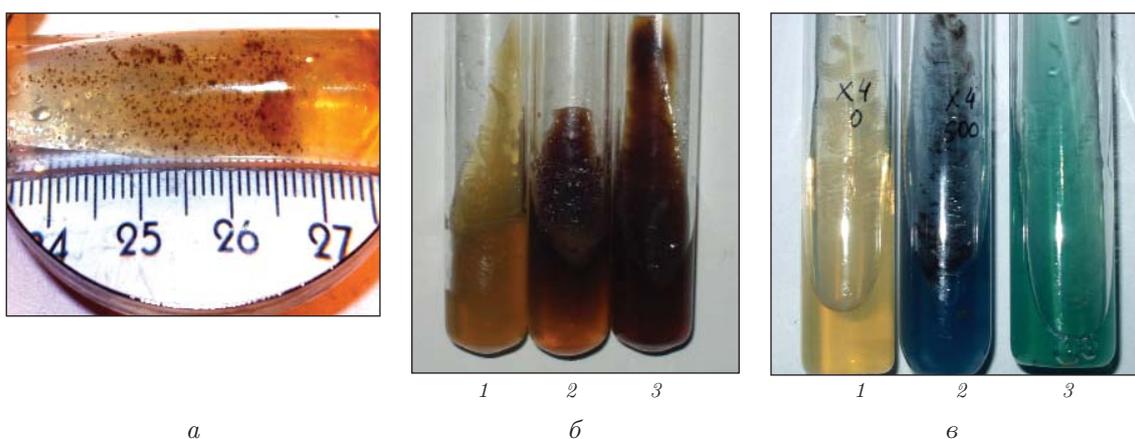


Рис. 2. Влияние меди на антарктические микроорганизмы. *a* — образование микрокристаллов соединений меди (0,3–0,5 мм) при росте культуры В-3205 на среде, содержащей 200 мг/л Cu^{2+} . *б* — индуцирование медью (200 мг/л Cu^{2+}) синтеза пигментов коричневого цвета при росте культуры В-3201 на 7-е (1), 14-е (2) и 21-е (3) сутки. *в* — ярко-фиолетовое окрашивание среды при росте культуры В-3210 в присутствии 500 мг/л Cu^{2+} . Рост культуры: 1 — на среде без Cu^{2+} ; 2 — при 500 мг/л Cu^{2+} ; 3 — стерильная среда, содержащая 500 мг/л Cu^{2+}

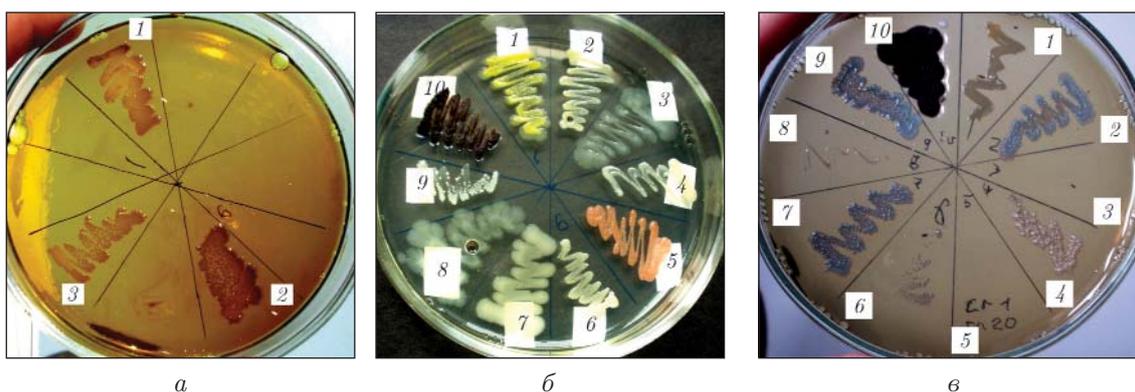


Рис. 3. Влияние хромата на антарктические микроорганизмы. *a* — рост культур: В-3202(1), В-3207 (2), В-3209 (3) в присутствии 50000 мг/л Cr(VI) . *б, в* — появление серо-голубой пигментации культур при росте на мясопептонном агаре с глюкозой (20 г/л) в отсутствие Cr(VI) (*б*) и при Cr(VI) (*в*): 1 — В-3201, 2 — В-3202, 3 — В-3203, 4 — В-3204, 5 — В-3205, 6 — В-3206, 7 — В-3207, 8 — В-3208, 9 — В-3209, 10 — В-3210

Все выделенные микроорганизмы оказались устойчивыми к высоким концентрациям Cu^{2+} . Даже при 1000 мг/л Cu^{2+} не наблюдалось ингибирующего действия меди. Лишь у одного штамма (В-3205) из десяти исследованных увеличивалась лаг-фаза (до 48 ч) при 1000 мг/л Cu^{2+} . Три культуры (В-3201, В-3208 и В-3210) росли в присутствии 2500 мг/л Cu^{2+} , однако при 3000 мг/л Cu^{2+} наблюдали более длительную лаг-фазу и уменьшение размера колоний. При более 3000 мг/л Cu^{2+} рост микроорганизмов отсутствовал. Таким образом, 3000 мг/л Cu^{2+} является предельно допустимой концентрацией для исследованных антарктических микроорганизмов.

Известно, что микроорганизмы могут проявлять множественную устойчивость (полирезистентность) к токсичным тяжелым металлам [4, 5]. Поэтому мы исследовали влияние на рост медьрезистентных микроорганизмов еще двух весьма токсичных тяжелых металлов: CrO_4^{2-} и Hg^{2+} .

Медь, хром и ртуть имеют различные повреждающие механизмы при воздействии на микроорганизмы. Катион Cu^{2+} относится к низкопотенциальным ($E'_0 = +440$ мВ) металлам-заместителям, необратимо замещающим металлы в активных центрах ферментов. Отрицательно заряженный двухвалентный анион CrO_4^{2-} является сильным окислителем ($E'_0 = +570$ мВ), и именно поэтому он оказывает сильное токсическое действие на микроорганизмы. Катион Hg^{2+} — высокопотенциальный металл-окислитель ($E'_0 = +790$ мВ), сочетающий одновременно повреждающие механизмы как металла-окислителя, так и двухвалентного металла-заместителя. Указанные особенности повреждающего действия этих металлов предполагают одновременное функционирование у микроорганизмов альтернативных механизмов устойчивости. Поэтому мы предполагали, что выделенные нами медьрезистентные микроорганизмы окажутся чувствительными, по меньшей мере, или к CrO_4^{2-} , или к Hg^{2+} .

Результаты экспериментов показали, что некоторые медьрезистентные микроорганизмы проявили устойчивость как к CrO_4^{2-} , так и к Hg^{2+} . Установлено, что штаммы В-3203, В-3205, В-3206, В-3208 росли в присутствии 500 мг/л Hg^{2+} (табл. 1), причем лаг-фаза составляла, как и в контроле, 1–2 сут. При этом не наблюдалось изменения окраски культур и сред. Следовательно, устойчивость микроорганизмов к Hg^{2+} не связана с синтезом

Таблица 1. Влияние ионов Hg^{2+} и Cr(VI) на рост медьрезистентных микроорганизмов

Номер штамма*	Концентрация ионов металлов в питательной среде, мг/л							
	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Cr(VI)					
	1000	500	1000	5000	30000	30000**	50000**	60000**
В-3201	+	–	+	+	–	+	–	–
В-3202	+	–	+	+	+	+	+	+
В-3203	+	+	+	–	–	–	–	–
В-3204	+	–	+	+	–	+	–	–
В-3205	+	+	–	–	–	–	–	–
В-3206	+	+	+	+	–	–	–	–
В-3207	+	–	+	+	+	+	+	+
В-3208	+	+	+	–	–	–	–	–
В-3209	+	–	+	+	+	+	+	–
В-3210	+	–	+	+	–	–	–	–

Примечание. (–) и (+) означают отсутствие и наличие роста соответственно.

*Номер штамма в Украинской коллекции микроорганизмов.

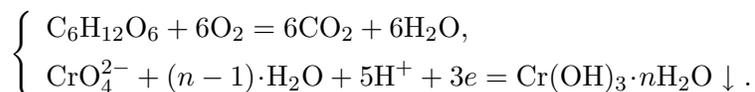
**В среду внесена глюкоза (20 г/л).

“защитных” экзометаболитов (металлтионеинов, сульфидов и т. д.). Все культуры (кроме В-3205) росли в присутствии 1000 мг/л ионов Cr(VI). Следует подчеркнуть, что для посева на среды с ртутью и хроматами использовались микроорганизмы, выращенные на среде без металлов, т. е. была исключена возможность постепенной адаптации микроорганизмов к повышению концентрации этих металлов в питательной среде.

Повышение концентрации Cr(VI) в среде приводило к ингибированию роста микроорганизмов. Так, при 5000 мг/л Cr(VI) продолжали расти семь культур, при 30000 — 50000 мг/л — три культуры: В-3202, В-3207 и В-3209 (рис. 3, а), а при 60000 мг/л — только две культуры: В-3202 и В-3207 (см. табл. 1).

Внесение в среду дополнительного источника углерода и энергии (глюкозы) повышало устойчивость микроорганизмов к хромату. Так, в присутствии глюкозы (20 г/л) две культуры микроорганизмов (В-3202 и В-3207) росли даже при 60000 мг/л Cr(VI) (см. табл. 1). Вероятно, глюкоза является для микроорганизмов не только дополнительным источником углерода, но и донором электронов, необходимых для осуществления защитной реакции — восстановления токсичного металла-окислителя CrO_4^{2-} до нерастворимого и нетоксичного $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Так, Cr(VI) в форме хромат-аниона при концентрации в среде 100–500 мг/л Cr(VI) практически не влияет на пигментацию металлрезистентных антарктических микроорганизмов. Как в контроле, без хромат-аниона, так и в опыте, при 100–500 мг/л Cr(VI), культура В-3201 — желтая, В-3202 — желтовато-кремовая, В-3203, В-3206, В-3207 — белые, В-3205 — розовая, В-3209 — снежно-белая (см. рис. 3, б). Однако при более высоких концентрациях Cr(VI) (1000–50000 мг/л) культуры (кроме В-3205), как правило, приобретали серо-голубую (иногда — бирюзовую) пигментацию, характерную для гидроксида хрома(III) (см. рис. 3, в).

Таким образом, при концентрации Cr(VI), превышающей 1000 мг/л, антарктические микроорганизмы осуществляют защитную сопряженную редокс-реакцию окисления глюкозы ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) и восстановления хромат-аниона (CrO_4^{2-}) до нерастворимого, а значит, и нетоксичного гидроксида хрома(III):



По-видимому, восстановление хромата связано непосредственно с клетками микроорганизмов, но не с экзометаболитами-восстановителями, поскольку характерный для $\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ серо-голубой цвет присутствует только в микробной биомассе (рост по штриху) и не обнаруживается в среде.

Итак, нами показано, что выделенные антарктические микроорганизмы устойчивы к высоким концентрациям трех самых токсичных металлов — Cu^{2+} , Hg^{2+} и CrO_4^{2-} .

Следующим закономерным и логически оправданным шагом было изучение возможности роста антарктических микроорганизмов при одновременном присутствии в среде указанных трех металлов (Hg^{2+} , Cu^{2+} и CrO_4^{2-}).

Металлы вносили в среду одновременно в таких концентрациях, при которых каждый из них не ингибировал рост исследуемых микроорганизмов. Установлено, что антарктические микроорганизмы В-3203, В-3206 и В-3208 устойчивы к высоким концентрациям (100–500 мг/л) Cu^{2+} , Hg^{2+} и Cr(VI) при различных концентрационных комбинациях этих металлов в среде (табл. 2).

Следует подчеркнуть, что микроорганизмы, проявляющие полирезистентность к трем самым токсичным металлам, выделены из экологически чистой зоны Антарктики, в ко-

торой антропогенное и техногенное влияние цивилизации практически отсутствует. Кроме того, геохимический анализ исследованных нами образцов (о. Галиндез) показал низкое содержание в них меди, хрома и ртути, мг/л: Cu^{2+} 13–172, Cr(VI) 6–60, Hg^{2+} 0,01–0,2. Отсюда следует, что полирезистентность антарктических микроорганизмов не связана с их адаптацией к окружающей среде. Возможно, выделенные микроорганизмы являются аборигенными древними формами жизни, которые адаптировались к высоким концентрациям металлов в период неотектонической активности в Антарктике, сопровождавшейся выбросом в окружающую среду глубинных растворов, насыщенных подвижными формами тяжелых металлов.

Необходимо отметить, что большинство коллекционных микроорганизмов чувствительны уже к 1–10 мг/л тяжелых металлов (Hg^{2+} , Cu^{2+} и CrO_4^{2-}) [6–10]. Устойчивость антарктических микроорганизмов к токсичным тяжелым металлам практически не изучена. Лишь в одной из немногих публикаций показано, что из морской воды Антарктической зоны (по меридиану от Индийского полуострова до Антарктиды) выделены микроорганизмы, устойчивые к 100 мг/л солей кадмия и хрома и к 10 мг/л ртути [11].

Таким образом, нами впервые показано, что антарктические микроорганизмы проявляют как сверхустойчивость, так и полирезистентность к высоким концентрациям трех самых токсичных металлов (500–60000 мг/л Hg^{2+} , Cu^{2+} и CrO_4^{2-}). Впервые показано, что микроорганизмы способны к росту при сверхвысоких концентрациях Cr(VI) : 50000–60000 мг/л (см. рис. 3, а). Установлено широкое распространение устойчивых к высоким концентрациям Cu^{2+} микроорганизмов при несопоставимо малой концентрации этого металла на о. Галиндез. Устойчивость антарктических микроорганизмов к высоким концентрациям Cu^{2+} , Hg^{2+} и CrO_4^{2-} является, по-видимому, конститутивной и генетически детерминированной, так как при выделении металлрезистентных антарктических микроорганизмов отсутствовала постепенная адаптация культур к возрастающим концентрациям металлов. Поэтому можно предположить, что выделенные микроорганизмы являются “ретроформами”, а их

Таблица 2. Влияние смеси тяжелых металлов (Cu^{2+} , Hg^{2+} и Cr(VI)) на рост антарктических микроорганизмов

Варианты комбинации тяжелых металлов в среде (МПА*)		Номер штамма		
Металлы	Концентрации металлов, мг/л	В-3203	В-3206	В-3208
Cu^{2+}	500	+	+	+
Cr(VI)	100			
Cu^{2+}	500	–	+	+
Hg^{2+}	100			
Cr(VI)	100	+	–	+
Hg^{2+}	100			
Cu^{2+}	200	+	+	+
Cr(VI)	100			
Hg^{2+}	100			
Cu^{2+}	500	+	+	–
Cr(VI)	100			
Hg^{2+}	100			

Примечание. (–) — отсутствие роста, (+) — наличие роста.

* МПА — мясоептонный агар (см. также табл. 1).

устойчивость к высоким концентрациям указанных токсичных металлов сформировалась в эпоху геологической активности в Антарктике, при поступлении в окружающую среду глубинных растворов или расплавов, содержащих металлы в высокой концентрации.

Существование в Антарктике микроорганизмов, устойчивых к высокой концентрации (500–60000 мг/л) токсичных металлов (Cu^{2+} , Hg^{2+} и CrO_4^{2-}), описано впервые.

Авторы выражают благодарность директору Национального антарктического научного центра В. А. Литвинову и акад. НАН Украины П. Ф. Гожуку за консультативную помощь, а также проф., д-ру биол. наук Э. З. Самышеву и Ю. П. Копытову (Институт биологии южных морей НАН Украины) за организацию и выполнение геохимических анализов образцов из Антарктики.

1. *Tashyrev O. B., Tashyreva G. O., Voinitskiy V. M.* Характеристика мікробних ценозів антарктичних ґрунтосубстратів // Вісн. КНУ ім. Тараса Шевченка. – 2004. – № 43. – С. 107–109.
2. *Tashyreva G., Matveeva N., Tashyrev O.* Occurrence of Cu^{2+} -resistant microorganisms on Antarctic island Galindez // Укр. антаркт. журн. – 2006. – No 4–5. – С. 219–222.
3. *Лурье Ю. Ю.* Справочник по аналитической химии. – Москва: Химия, 1971. – 454 с.
4. *Geier B. M., Wendt B., Arnold W., Zimmermann U.* The effect of mercuric salts on the electro-rotation of yeast cells and comparison with a theoretical model // Biochim. et biophys. acta: Biomembrans. – 1987. – 900 (M 149), No 1. – P. 45–55.
5. *Rensing C., Sun Y., Rosen B. P., Mitsa B.* Pb(II)-translocatin P-type ATPase // J. Biol. Chem. – 1998. – **273**, No 49. – P. 32614–32617.
6. *Babich H., Stotzky G.* Differential toxicities of mercury to bacteria and bacteriophages in sea and in lake water // Can. J. Microbiol. – 1979. – **25**, No 11. – P. 1252–1257.
7. *Bowman J. P., Sly L. I., Hayward A. C.* Patterns of tolerance to heavy metals among methane-utilizing bacteria // Lett. Appl. Microbiol. – 1990. – **10**, No 2. – P. 85–87.
8. *Brhynchildsen L., Lundgren Bo V., Allard B., Rosswall Th.* Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury, and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp. // Appl. and Environ. Microbiol. – 1988. – **54**, No 7. – P. 1689–1693.
9. *Kumar N. C., Ramachandra R. T. K.* Effect of cadmium on microorganisms and microbe-mediated mineralization process in the soil // Bull. Environ. Contam. and Toxicol. – 1988. – **41**, No 5. – P. 657–663.
10. *Naidu C. K., Ramachandra R. T. K.* Protection of cadmium, toxicity to *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Aspergillus niger* // Zbl. Mikrobiol. – 1988. – **143**, No 5. – P. 383.
11. *De Souza M. J., Nair S., Loka Bharathi P. A., Chandramohan D.* Metal and antibiotic-resistance in psychrotrophic bacteria from Antarctic Marine waters // Ecotoxicology. – 2006. – **15**, No 4. – P. 379–384.

*Национальний антарктичний научний
центр МОН України, Київ
Інститут мікробіології і вірусології
ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ*

Поступило в редакцію 06.07.2007