

УДК 579.26

МНОЖЕСТВЕННАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К ТОКСИЧНЫМ МЕТАЛЛАМ МИКРООРГАНИЗМОВ АНТАРКТИЧЕСКИХ КЛИФОВ (остров ГАЛИНДЕЗ)

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

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины;
Киев, ул. Заболотного, 154; tach2007@ukr.net*

Множественная устойчивость к токсичным металлам микроорганизмов антарктических клифов (о-в Галиндез). А.Б. Таширев, В.А. Романовская, П.В. Рокитко, А.А. Таширева.

Реферат. Исследована множественная устойчивость к пяти токсичным металлам десяти штаммов антарктических микроорганизмов, выделенных с клифов острова Галиндез (станция Академик Вернадский). Для этого использованы металлы-заместители (Ni^{2+} , Co^{2+}), окислители (CrO_4^{2-}) и металлы «комбинированного действия» (Hg^{2+} , Cu^{2+}), т.е. обладающие свойствами как металлов-окислителей, так и заместителей. Микроорганизмы изолировали на агаризованной среде, не содержащей металлов, а затем изучали их рост в жидкой среде, содержащей по одному из указанных металлов. Повышение концентрации металлов в среде закономерно приводило к снижению количества жизнеспособных штаммов. Так, в присутствии 0.1 г/л Cu^{2+} росли все 10 штаммов, 0.4 г/л – 3 штамма, 1.0 – 2 штамма, а при 1.25 г/л – только один штамм. Наименьшую устойчивость микроорганизмы проявили к Hg^{2+} – высокопотенциальному ($E_o' = + 920$ мВ) металлу-заместителю. При концентрации 0.01 г/л Hg^{2+} росли 6 из 10 штаммов, а при 0.05 г/л – только 1 штамм. Наиболее устойчивы микроорганизмы были по отношению к Cr(VI) . При его концентрации в среде 1.25 г/л, 2.0 и 20.0 г/л росли соответственно 8, 3 и 1 штаммы. Получен ряд устойчивости к металлам, при которых наблюдался рост хотя бы одного штамма (в г/л): $20.0 \text{ Cr(VI)} > 2.0 \text{ Ni}^{2+} > 1.25 \text{ Cu}^{2+} > 0.1 \text{ Co}^{2+} > 0.05 \text{ Hg}^{2+}$. Штамм 190п2 проявил максимальную устойчивость к металлам, он рос при высоких концентрациях всех пяти металлов. Таким образом, показано, что микроорганизмы антарктических клифов проявляют полирезистентность к пяти наиболее токсичным металлам, сочетающим в себе повреждающее действие металлов-заместителей, металлов-окислителей и металлов комбинированного действия.

Множинна стійкість до токсичних металів мікроорганізмів антарктичних кліфів (о-в Галіндез). О.Б. Таширев, В.О. Романовська, П.В. Рокитко, Г.О. Таширева.

Реферат. Досліджено множинну стійкість до п'яти токсичних металів десяти штамів антарктичних мікроорганізмів, виділених із кліфів острова Галіндез (станція Академік Вернадський). Для цього використано метали-замінники (Ni^{2+} , Co^{2+}), окислювачі (CrO_4^{2-}) і метали «комбінованої дії» (Hg^{2+} , Cu^{2+}), тобто такі, що мають властивості як металів-окислювачів, так і замінників. Мікроорганізми ізолювали на агаризованому середовищі, яке не містило металів, а потім вивчали їх ріст у рідкому середовищі, що містило по одному із вказаних металів. Підвищення концентрації металів у середовищі закономерно призводило до зниження кількості життєздатних штамів. Так, у присутності 0.1 г/л Cu^{2+} росли всі 10 штамів, 0.4 г/л – 3 штами, 1.0 – 2 штами, а при 1.25 г/л – тільки один штам. Найменшу стійкість мікроорганізми проявили до Hg^{2+} – високопотенційного ($E_o' = + 920$ мВ) метала-замінника. При концентрації 0.01 г/л Hg^{2+} росли 6 із 10 штамів, а при 0.05 г/л – тільки 1 штам. Найбільш стійкішими мікроорганізми були до Cr(VI) . При його концентрації в середовищі 1.25 г/л, 2.0 і 20.0 г/л росли відповідно 8, 3 і 1 штам. Отримано ряд стійкості до металів, при яких спостерігався ріст хоча б одного штаму (у г/л): $20.0 \text{ Cr(VI)} > 2.0 \text{ Ni}^{2+} > 1.25 \text{ Cu}^{2+} > 0.1 \text{ Co}^{2+} > 0.05 \text{ Hg}^{2+}$. Штам 190п2 проявив максимальну стійкість до металів, він ріс при високих концентраціях усіх п'яти металів. Таким чином, показано, що мікроорганізми антарктичних кліфів проявляють полірезистентність до п'яти найбільш токсичних металів, що поєднують в собі ушкоджуючу дію металів-замінників, металів-окислювачів і металів комбінованої дії.

Multiple resistance to toxic metals of the Antarctic cliff microorganisms (island Galindez).

A.B. Tashyrev, V.A. Romanovskaya, P.V. Rokitko, A.A. Tashyeva.

Abstract. The focus of the study is multiple resistance to five toxic metals of 10 microbial strains isolated from the cliffs of Antarctic island Galindez (Vernadsky station). The growth of strains in presence metals which possess replacing (Ni^{2+} , Co^{2+}), oxidative properties (CrO_4^{2-}) and metals of the "combined" action (Hg^{2+} , Cu^{2+}), both replacing and oxidizing agents, had been studied. The microorganisms were isolated on agar medium containing no metal, and then were grown in liquid medium containing one of these metals. Increasing the concentration of metals in the media naturally decreased the number of viable strains. Thus, all 10 strains were resistant to 0.1 g/l Cu^{2+} , 0.4 g/l - 3 strains, 1.0 g/l - 2 strains, and at 1.25 g/l - only one strain. The highest sensibility strains showed to Hg^{2+} - which is high potential metal ion ($E_o' = +920$ mV), replacing metals in cell enzymes. At a concentration 0.01 g/l Hg^{2+} grew 6 of 10 strains, and at 0.05 g/l - only 1 strain. The most resistant microorganisms were in relation to Cr(VI). At chromium concentration in cultivation media 1.25 g/l, 2.0 and 20.0 g/l grew, respectively, 8, 3 and 1 strains. The following range of resistance of strains towards specified toxic metal ions is obtained (in g/l): $20.0 \text{ Cr(VI)} > 2.0 \text{ Ni}^{2+} > 1.25 \text{ Cu}^{2+} > 0.1 \text{ Co}^{2+} > 0.05 \text{ Hg}^{2+}$. Strain 190n2 showed maximal resistance to metals, it grew at high concentrations of all five metals. Thus, we have shown that Antarctic cliff microorganisms are polyresistant to five the most toxic metals that combine the damaging effects of replacing and oxidizing metals, and metals of combined action.

Keywords: Antarctic cliffs, microorganisms, toxic metals, multiple metal resistance.

1. Вступление

В наземных экосистемах Антарктики биоценозы клифов (вертикальных скал) находятся в наиболее экстремальных условиях. Клифы (высотой 10–14 м) сложены из скальных плит, часто с отрицательными углами наклона. Именно поэтому они никогда не заносятся снегом и круглый год открыты для воздействия комплекса экстремальных факторов. К ним относятся резкие перепады температуры, циклы «замораживания–оттаивания», «высушивания–увлажнения», ураганный ветер (до 40 м/сек), усиливающий негативное воздействие низких температур. Экосистемы клифов круглогодично подвергаются действию УФ излучения [19]. На клифах наблюдается крайне неравномерное распределение органических веществ. Это является причиной конкуренции микроорганизмов за источники питания и приводит к антибиозу. Антибиоз проявляется как в синтезе антибиотиков микроорганизмами, так и в устойчивости к ним. Наконец, вследствие биогеохимической активности микроорганизмов поверхность скал разрушается и мобилизуются токсичные металлы, входящие в состав изверженных пород. Отсюда следует, что микробные ценозы клифов более всего подходят для исследования механизмов устойчивости антарктических микроорганизмов к комплексу экстремальных факторов. Ранее нами было показано, что микроорганизмы антарктических клифов устойчивы к УФ излучению и антибиотикам [7, 19]. Также наши данные свидетельствуют о широком распространении металлрезистентных микроорганизмов в почве и фитоценозах Антарктики [11, 12, 20]. Целью данной работы было изучение устойчивости к токсичным металлам (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} и CrO_4^{2-}) репрезентативных микроорганизмов антарктических клифов, неадаптированных к металлам. Выбор этих металлов обусловлен тем, что они являются наиболее токсичными и сочетают в себе все известные механизмы ингибирования металлами микроорганизмов. Они действуют на микроорганизмы как металлы-окислители (CrO_4^{2-} , $E_o' = +555$ мВ) [17], металлы-заместители (Ni^{2+} , Co^{2+}) [13, 16] и металлы «комбинированного действия» (как окислители, и как заместители). К типичным металлам комбинированного действия относятся прежде всего Hg^{2+} и Cu^{2+} . Катионы ртути и меди – активные заместители [2] и, кроме того, являются носителями высокого редокс-потенциала (${}^1E_o'$ для Hg^{2+} и Cu^{2+} равен +920 и +440 мВ соответственно) [17].

¹ E_o' – стандартный редокс-потенциал реакции при равенстве концентраций окисленной и восстановленной форм металла и при pH = 7,0

2. Материалы и методы

Объектами исследований служили 10 штаммов аэробных хемоорганотрофных бактерий, изолированных из семи образцов наскальных лишайников на клифе «Скалодром-2». Образцы отбирали по двум профилям в семи стационарных точках наблюдения: Т-Ск-1, Т-Ск-2, Т-Ск-3, Т-Ск-6, Т-Ск-8, Т-Ск-9, Т-Ск-11 (рис. 1). Изучаемая экосистема «Скалодром-2» – это клиф (вертикальная скала), расположенный на биогеографическом полигоне Украинской антарктической станции Академик Вернадский (о. Галиндез). «Скалодром-2» представляет собой клиф высотой 10–14 м, сложенный из гладких вертикальных плит, на некоторых участках расположенных под отрицательным углом. Именно поэтому клифы никогда не покрываются снегом и их биоценозы подвергаются в течение круглого года действию экстремальных факторов.

Микроорганизмы выделяли методом посева из последовательных десятикратных разведений образцов на агаризованную питательную среду Nutrient Agar (NA) фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Среда не содержала токсичные металлы, то есть была неселективной. Чистые культуры выделяли стандартными методами [5]. Изолированные штаммы хранили в пробирках на скошенной агаризованной среде NA при 5 °С. Морфологические свойства клеток выделенных штаммов, в том числе окрашивание по Граму, Пешкову и др., определяли по руководству [5].

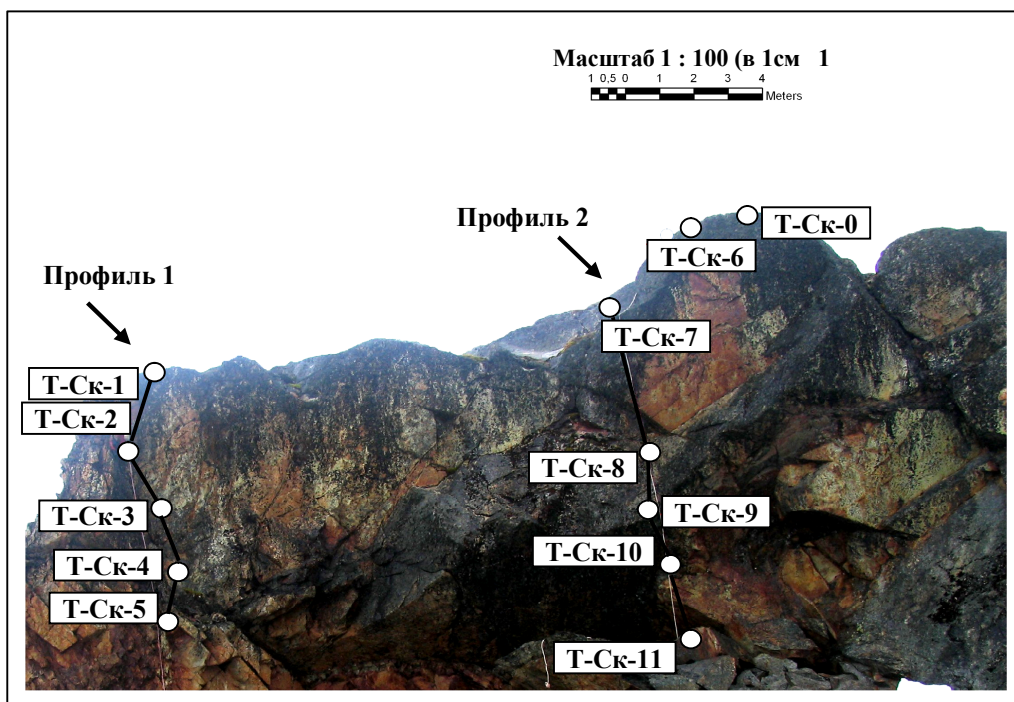


Рис. 1. Стационарные точки отбора образцов «Т-Ск» на вертикальном клифе «Скалодром-2».

Устойчивость к токсичным металлам. Действие токсичных металлов на микроорганизмы изучали на жидкой среде Nutrient broth (NB) фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Соли металлов растворяли в дистиллированной воде и стерилизовали на кипящей водяной бане 10 минут. Раствор Hg^{2+} готовили отдельно из металлической ртути, как описано ранее (Tashyrev et al., 2009). Микроорганизмы культивировали в пробирках (10 мл среды NB) в

течение 10 суток при 28°C на качалке (220 об./мин). В каждом варианте эксперимента в среду вносили только один металл. Металлы вносили в следующем концентрационном диапазоне, в г/л: Hg^{2+} – 0.05...0.075; Cu^{2+} – 0.1...3.0; Ni^{2+} – 0.5...3.0; Co^{2+} – 0.05...0.2; $Cr(VI)$ в виде CrO_4^{2-} – 0.25...21.0. Среду с металлами инокулировали 2-суточными культурами и помещали на качалки. Для достоверного учёта результатов использовали следующие контрольные варианты: (1) контроль стерильности среды (стерильная среда без инокулюма и металлов); (2) контроль стерильности металлов и отсутствия осаждения металлов в среде (стерильная среда с металлами); (3) среда с металлами и с заведомо чувствительными к металлам коллекционными штаммами *E. coli* CR63 и *B. subtilis* В-901. Отсутствие роста в последнем варианте свидетельствовало о том, что металлы оказывают токсичное действие на микроорганизмы, а компоненты среды не оказывают защитного действия на микроорганизмы. Все варианты эксперимента ставили в трёх повторностях. При оценке результатов нами постулировано, что *минимально ингибирующей* является такая концентрация металла, при которой отсутствует рост по меньшей мере одного штамма. *Максимально допустимой* является концентрация металла, при которой наблюдается рост хотя бы одного штамма.

3. Результаты и их обсуждение

Из образцов наскальных лишайников на агаризованной среде без токсичных металлов было изолировано 18 штаммов антарктических бактерий. Из них для работы было отобрано 10 штаммов, изолированных из предельных разведений, в которых количество колоний не превышало 10–30 на чашку, т.е. микроорганизмов, доминирующих в данном образце. Это позволяет считать их **репрезентативными** представителями микробных ценозов в данных биотопах. Установлено, что исследованные штаммы являются грамположительными. Большинство из них представлены палочками, исключение – штамм 190n2, клетки которого являются кокками. Некоторые штаммы (182n1, 185n1, 187n3) образуют споры. Большинство штаммов (80%) пигментированы (табл. 1).

Таблица. 1. Морфологические признаки штаммов, изолированных из наскальных лишайников Скалодрома-2

№ п/п	№ штамма	Точка клифа	Пигментация колоний	Морфология клеток	Наличие спор
1	180n1	Т-Ск-1	Отсутствует	Палочки; Γ^+	–
2	180n2	Т-Ск-1	Отсутствует	Цепочки из палочек; Γ^+	–
3	181n2	Т-Ск-2	Желтый	Палочки; Γ^+	–
4	181n3	Т-Ск-2	Желтый	То же	–
5	182n1	Т-Ск-3	Розовый	То же	+
6	185n1	Т-Ск-6	Белый	То же	+
7	187n3	Т-Ск-8	Оранжевый	То же	+
8	188n2	Т-ск-9	Розовый	То же	–
9	190n1	Т-Ск-11	Розовый	То же	–
10	190n2	Т-Ск-11	Белый	Кокки, образуют группы и цепочки; Γ^+	–

Примечание. Γ^+ – грамположительные.

Для определения полирезистентности микроорганизмов клифов мы использовали металлы с разным типом действия, а именно металлы-заместители (Co^{2+} и Ni^{2+}), металл-окислитель ($Cr(VI)$ в виде аниона CrO_4^{2-}) и металлы «комбинированного действия», которые имеют одновременно свойства как металлов-окислителей, так и металлов-заместителей (Hg^{2+} и Cu^{2+}).

Металлы-заместители. Главное повреждающее действие металлов-заместителей заключается в необратимом замещении двухвалентных катионов в активных центрах ферментов и клеточных структурах микроорганизмов, что приводит к ингибированию роста или к гибели клеток [9].

Установлено, что металлы в стерильной среде NB не выпадали в осадок. Это свидетельствует об их стабильности как в катионной, так и в анионной формах. Кроме того, чувствительные к металлам коллекционные штаммы *E. coli* CR63 и *B. subtilis* B-901 хорошо росли в среде NB без металлов. В то же время в среде NB с минимальными концентрациями металлов их рост полностью отсутствовал. Это свидетельствует о том, что металлы в питательной среде NB сохраняют свои токсичные свойства.

Данные об устойчивости репрезентативных антарктических штаммов к металлам представлены на рис. 2. Установлено, что кобальт в концентрации 0.05 г/л не ингибировал рост ни одного из исследуемых штаммов. При увеличении концентрации до 0.1 г/л Co^{2+} количество устойчивых штаммов уменьшилось до 3, а при 0.2 г/л Co^{2+} наблюдалось полное ингибирование всех 10 штаммов.

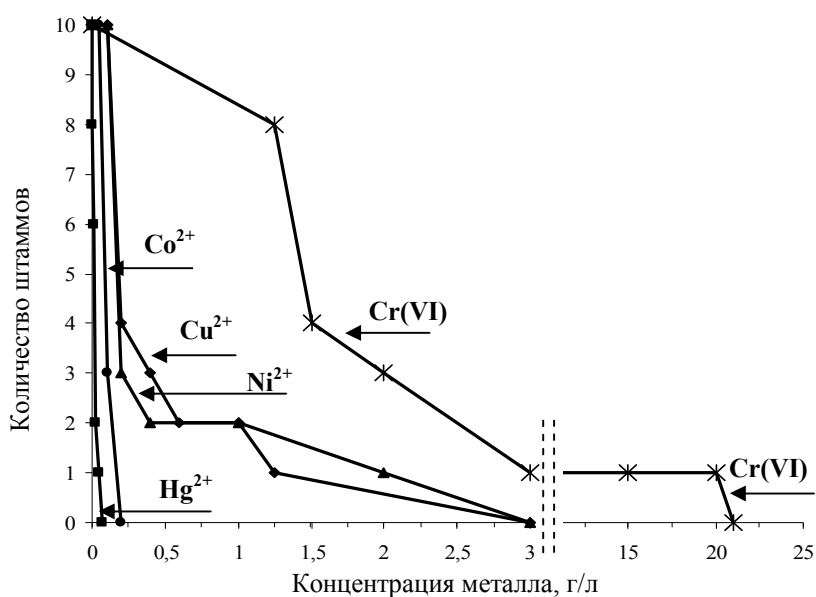
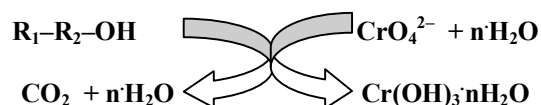


Рис. 2. Зависимость количества выживших штаммов микроорганизмов антарктических клифов от концентрации Hg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Cr(VI) в среде NB.

При концентрации 0.1 г/л никеля росли все 10 штаммов, однако уже при 0.2 г/л Ni^{2+} количество устойчивых штаммов уменьшилось до 3. Дальнейшее повышение концентрации никеля в среде закономерно приводит к усилению ингибирования микроорганизмов, и при 2.0 г/л наблюдался рост только одного штамма 190n2. Никель в концентрации 3.0 г/л ингибировал рост всех 10 штаммов. Таким образом, среди металлов-заместителей кобальт оказался более токсичным металлом для наскальных антарктических штаммов, чем никель. Проникновение в клетку катионов никеля и кобальта может происходить с помощью системы NiCoT, которая есть у бактерий, археобактерий, грибов. Кобальт и никель являются необходимыми для клеток микроэлементами, но в избытке они токсичны. Считается, что их ионы (Co^{2+} ; Ni^{2+}) в два раза более токсичны, чем их комплексные соединения [18].

Металлы-окислители. Как и другие кислородсодержащие анионы VI группы элементов, хромат вследствие его стереохимической аналогии с сульфатом конкурирует за

ферменты и транспортные системы микроорганизмов [3]. Соединения хрома(VI), в том числе и хромат-анион CrO_4^{2-} , являясь высокопотенциальными металлами, оказывают повреждающее действие на микроорганизмы за счет необратимого окисления ферментов и структурных компонентов микробных клеток по следующей схеме:



Из десяти исследованных штаммов только два (181n2 и 187n3) оказались чувствительны к хрому и не росли даже при минимальных его концентрациях (1.25 г/л Cr(VI)). Остальные штаммы проявили очень высокий уровень устойчивости к хрому. Так, при концентрации Cr(VI) равной 1.25 г/л, которая является «сверхбактерицидной» для большинства микроорганизмов, росли 8 наскальных антарктических штаммов. И даже при 2.0 г/л Cr(VI) устойчивость к этому металлу-окислителю проявили 3 штамма.

Для сравнения отметим, что к Ni^{2+} при такой же концентрации устойчив только один штамм, а для всех остальных металлов предельно допустимые концентрации намного меньше и находятся в диапазоне 0.05...1.25 г/л металл-иона. Наконец, один из штаммов (190n2) проявил сверхустойчивость к хрому. Он растет в присутствии 20.0 г/л Cr(VI). Считается, что в присутствии токсичного хромата, являющегося сильным металло-окислителем, могут расти только высокоспециализированные, специально адаптированные к этому металлу микроорганизмы [3]. Поэтому особый интерес представляет высокая устойчивость большинства наскальных микроорганизмов к хрому(VI), а также сверхустойчивость неадаптированного к этому металлу антарктического штамма 190n2.

Таким образом, наскальные антарктические микроорганизмы проявляют следующие «уровни» устойчивости к пяти металлам: к Hg^{2+} и Co^{2+} – малая устойчивость; к Ni^{2+} и Cu^{2+} – средняя, а к Cr(VI) – высокая устойчивость. Правомерность такой количественной оценки устойчивости микроорганизмов к металлам подтверждается графической зависимостью количества выросших штаммов от концентрации металлов (рис. 2).

Металлы «комбинированного действия» (Hg^{2+} и Cu^{2+}) являются наиболее токсичными вследствие высоких значений окислительно-восстановительного потенциала и способности к замещению катионов в активных центрах ферментов и клеточных структур. Катион Hg^{2+} относится к высокопотенциальным металлам-окислителям ($E'_0 = + 920$ мВ), который одновременно совмещает повреждающие механизмы и металла-окислителя, и металла-заместителя. Ртуть способна реагировать с SH-группами белков и таким образом инактивировать молекулы ферментов или откладываться в клетках в металлической форме [14]. По литературным данным, угнетение микробного метаболизма ртутью наблюдается уже при концентрации 0.0001–0.0004 г/л Hg^{2+} [14, 15].

Установлено, что выделенные антарктические хемоорганотрофные бактерии наименее устойчивы к ртути по сравнению со всеми другими исследованными нами металлами (рис. 2). Так, при ее минимальной концентрации (0.005 г/л Hg^{2+}) подавлялся рост двух штаммов (181n2 и 188n2). Однако восемь из десяти штаммов росли при 0.005 г/л Hg^{2+} , а при 0.01 г/л Hg^{2+} росли шесть штаммов. Считается, что рост микроорганизмов в концентрационном диапазоне 5.0–10.0 мкг/мл HgCl_2 (т.е. 0.005–0.01 г/л) свидетельствует об их высоком уровне устойчивости к ртути [6]. Таким образом, 8 из 10 штаммов наскальных ценозов проявили высокий уровень устойчивости к катиону Hg^{2+} – самому токсичному металлу. А наиболее устойчивый к ртути штамм 190n2 рос даже в присутствии 0.05 г/л Hg^{2+} . Такая концентрация ртути является летальной для большинства известных металлрезистентных штаммов [1].

Медь также относится к металлам «комбинированного действия». Катион Cu^{2+} является высокопотенциальным металло-окислителем ($E'_0 = + 440$ мВ), который также способен к замещению металлов в активных центрах ферментов. Соединения Cu(II) могут

восстанавливаться микроорганизмами до Cu(I) и Cu(0). Медь способна к образованию с микробными метаболитами нерастворимых соединений, таких как сульфиды, карбонаты, а также может поглощаться клеточными структурами [4].

Исследуемые антарктические бактерии оказались более устойчивыми к меди, чем к ртути и кобальту (рис. 2). При увеличении концентрации меди до 0.4 г/л количество выросших штаммов уменьшилось до 3, а при концентрации 1.25 г/л Cu^{2+} – рос только один штамм. Для большинства микроорганизмов повреждающая или бактерицидная концентрация Cu^{2+} находится в диапазоне 0.00002–0.005 г/л [21]. Следовательно, все 10 антарктических штаммов, выделенных с клифов, проявили высокий уровень устойчивости к катиону меди(II).

Максимальную устойчивость ко всем изученным металлам проявил штамм 190n2. Максимально допустимые концентрации металлов в среде, при которых наблюдался рост этого штамма, составляли (г/л): Cr(VI) – 20.0, Ni^{2+} – 2.0, Cu^{2+} – 1.25, Co^{2+} – 0.1, Hg^{2+} – 0.05. Особенно нужно отметить очень высокую устойчивость этого штамма к хрому. Высокой устойчивостью к меди и никелю характеризовались также штаммы 182n1 и 181n3. Они росли при концентрации 1.0 г/л Ni^{2+} и 1.0 г/л Cu^{2+} соответственно. В то же время штаммы 181n2 и 187n3 были наиболее чувствительными к действию хрома, а штаммы 181n2 и 188n2 – к действию ртути (отсутствие роста при 0.05 г/л Hg^{2+}). Необходимо еще раз подчеркнуть, что в работе мы использовали хемоорганотрофные бактерии, выделенные на неселективной среде (без токсичных металлов), и потому выяснение механизмов высокой устойчивости некоторых штаммов к этим металлам послужит предметом наших дальнейших исследований.

Несмотря на высокую устойчивость 10 штаммов к 5 токсичным металлам, влияние металлов на антарктические микроорганизмы подчиняется общебиологическим закономерностям. Повышение концентрации металлов закономерно приводит к уменьшению количества жизнеспособных штаммов. Однако, в отличие от большинства почвенных, водных и др. хемоорганотрофных микроорганизмов, для которых концентрации 0.01...0.1 г/л ион-металла являются бактерицидными, микроорганизмы антарктических клифов устойчивы к концентрациям металлов на один, а то и на два порядка выше указанных.

Коэффициент резистентности. Для количественной характеристики устойчивости исследуемых штаммов к токсичным металлам мы предлагаем использовать *коэффициент резистентности* K_R . Коэффициент K_R количественно характеризует устойчивость штаммов к возрастающим концентрациям токсичных металлов:

$$K_R = N_R : N_T,$$

где N_R – количество штаммов, устойчивых к данной концентрации металла, а N_T – общее количество тестируемых штаммов.

Рассмотрим значение K_R на примере меди и всех 10 штаммов. При концентрации меди 0.1 г/л Cu^{2+} $K_R = 1.0$. Это означает, что при указанной концентрации меди выросли все 10 штаммов (10:10 = 1). При 0.4 г/л Cu^{2+} из 10 штаммов выросли 3, поэтому $K_R = 0.3$ (3:10 = 0.3). Наконец, при 1.25 г/л Cu^{2+} вырос только один штамм из десяти. Следовательно, для этой концентрации $K_R = 0.1$ (1:10 = 0.1)

Коэффициент K_R особенно важен для понимания общих закономерностей, тенденций устойчивости микроорганизмов к металлам, если количество штаммов составляет несколько десятков, а то и сотен.

Кроме того, если устойчивость к металлам микроорганизмов нельзя оценить однозначно по значениям максимально допустимых концентраций, корректное решение можно получить только при помощи K_R . Например, максимально допустимые концентрации по Cu^{2+} и Ni^{2+} равны соответственно 1.25 и 2.0 г/л (рис. 2). Отсюда следует, что устойчивость микроорганизмов к никелю выше, чем к меди. Однако эти показатели характеризуют устойчивость к Cu^{2+} и Ni^{2+} только одного штамма 190n2, но не всех десяти изучаемых. Поэтому для оценки устойчивости 10 тест-культур мы применили сопоставление

максимально допустимых концентраций всех металлов с коэффициентом $K_R = 0.3$ (рис. 3). Иными словами, сопоставлялись концентрации изученных 5 металлов, при которых количество устойчивых (выросших) штаммов равно 3. При таком способе оценки градиент устойчивости микроорганизмов к металлам однозначен и очевиден. В частности, для 10 тестированных штаммов устойчивость к меди выше, чем к никелю.

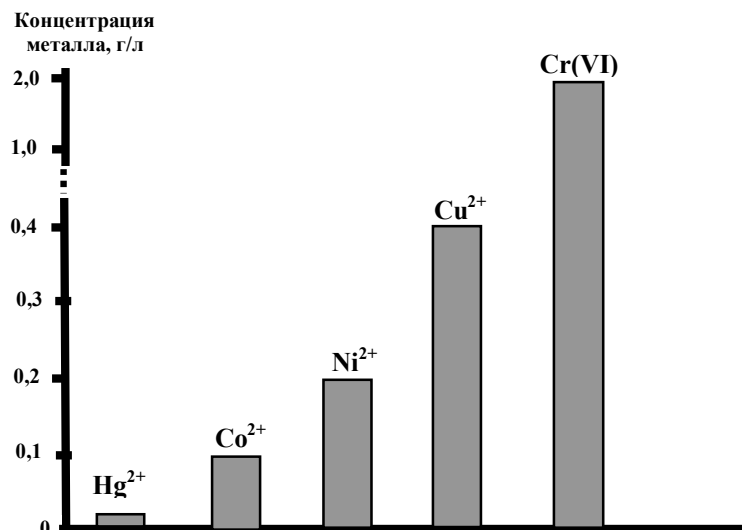


Рис. 3. Устойчивость микроорганизмов антарктических клифов к возрастающим концентрациям металлов при показателе $K_R = 0.3$ (пояснения см. в тексте на стр. 219).

Сопоставление концентраций металлов, при которых выросли 3 из 10 штаммов (т.е. при $K_R = 0.3$), позволило получить, по нашему мнению, следующий достоверный ряд устойчивости микроорганизмов антарктических клифов к 5 наиболее токсичным металлам:



На основании полученных данных вычислена разность концентраций металлов между максимально допустимой и минимально ингибирующей, т.е. величина концентрационного диапазона, в котором исследованные антарктические микроорганизмы устойчивы к металлу. Если эта величина мала, значит и устойчивость микроорганизмов к этому металлу низкая. Диапазоны концентраций от максимально допустимых до минимально ингибирующих концентраций для 5 металлов по отношению к 10 штаммам и соответствующие расчёты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Величина концентрационного диапазона, в котором антарктические микроорганизмы устойчивы к токсичным металлам

Металл	Концентрации металлов		
	Максимально допустимые, г/л	Минимально ингибирующие, г/л	Величина концентрационного диапазона, г/л
Hg ²	0.05	0.005	0.045
Co ²⁺	0.1	0.05	0.05
Cu ²⁺	1.25	0.2	1.05
Ni ²⁺	2.0	0.2	1.8
Cr(VI)	20.0	1.25	18.75

Как следует из приведенных данных, концентрационный диапазон токсичных металлов, в котором выживают исследованные антарктические микроорганизмы, наиболее высок для Cr(VI) и Ni²⁺.

Общеизвестно, что у металлрезистентных микроорганизмов существует множество видов взаимодействия с катионами и анионами токсичных металлов [8, 9, 10]. К ним относятся: восстановление металлов с образованием нерастворимых форм, осаждение металлов, аккумуляция клетками, образование металлорганических соединений (например, окрашенных металлтионеинов) и т.д. Эти виды взаимодействия приводят к отчетливым визуальным изменениям при росте микроорганизмов как в жидкой, так и на агаризованной среде. Мы неоднократно наблюдали, что при накоплении кобальта клетки и колонии окрашиваются в голубой или розовый цвет, при микробном восстановлении меди(II) до меди(I) образуются кристаллы коричневого цвета, а желтый хромат-анион восстанавливается до нерастворимого, серо-голубого гидроксида хрома(III), и т.д. В данных экспериментах визуальные признаки взаимодействия всех тест-штаммов с пятью металлами в испытанном концентрационном диапазоне отсутствуют. По-видимому, устойчивость микроорганизмов антарктических клифов к токсичным металлам не связана ни с одним из известных механизмов взаимодействия, такими как восстановление, осаждение, сорбция клеточными стенками и др. Остается предположить, что их устойчивость к сверхвысоким концентрациям пяти наиболее токсичных металлов связана со структурными изменениями мембран, исключающими проникновение металлов в микробные клетки. Механизмы устойчивости антарктических микроорганизмов к металлам будут предметом наших дальнейших исследований.

Таким образом, исследована устойчивость к наиболее токсичным металлам (Hg²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, CrO₄²⁻) бактерий, изолированных из образцов наскальных лишайников клифа (вертикальной скалы), расположенной на биогеографическом полигоне Украинской антарктической станции Академик Вернадский. Среди антарктических наскальных микроорганизмов, изолированных на неселективной среде (без токсичных металлов), обнаружены бактерии, способные расти при концентрациях токсичных металлов (Hg²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, Co²⁺, CrO₄²⁻), являющихся бактерицидными для подавляющего большинства хемоорганотрофных микроорганизмов. Были определены минимально ингибирующие и максимально допустимые концентрации токсичных металлов, при которых наблюдали рост антарктических бактерий. Очень высокой устойчивостью ко всем исследованным токсичным металлам характеризовался антарктический штамм 190n2. В целом наличие бактерий, устойчивых к токсичным металлам, среди выделенных без селективного давления является еще одним свидетельством широкого распространения металлрезистентных микроорганизмов в Антарктике. Кроме того, ранее нами было показано, что эти же штаммы проявили высокую устойчивость к УФ излучению [7]. Это позволяет нам предположить наличие высокого уровня адаптации микроорганизмов антарктических клифов к экстремальным факторам.

Список литературы

1. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Под ред. Д. Кашнера. – Москва: Мир, 1981. – 519 с.
2. Илялетдинов А.Н., Абдрашитова С.А., Айткельдиева С.А. и др. Полиредуктазная активность бактерий // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1989. – № 2. – С. 260–266.
3. Квасников Е.И., Клошников Т.М., Касаткина Т.П. и др. Резистентность бактерий рода *Pseudomonas* к соединениям шестивалентного хрома и способность к его восстановлению // Микробиол. журн. – 1988. – 50, № 6. – С. 24–27.
4. Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С. Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів / Вісник Львівсько університету // Серія біологічна. – 2007. – Вип. 45. – С. 3–28.

5. **Методы общей бактериологии** / Под ред. Герхардта Ф. – М: Мир. – 1984. Т.3. – 263 с.
6. **Петрова М.А., Минделин С.З., Горленко Ж.М. и др.** Резистентные к соединениям ртути бактерии из многолетнемерзлых отложений и перспективы их использования в сравнительных исследованиях детерминант ртути-устойчивости // Генетика. – 2002. – **38**, № 11. – С. 1–6.
7. **Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О. и др.** Устойчивость к УФ радиации антарктических микроорганизмов // Микробиол. журнал. – 2011. – **73**.
8. **Таширев А.Б.** Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Восстановительная трансформация металлов. // Микробиол. журн. – 1994а. – **56**, № 6. – С. 76–88.
9. **Таширев А.Б.** Взаимодействие микроорганизмов с металлами. // Микробиол. журн. – 1994б. – **56**, № 6. – С. 89–100.
10. **Таширев А.Б.** Теоретические аспекты взаимодействия микроорганизмов с металлами. Микробная аккумуляция металлов, обусловленная их стереохимической аналогией с макроэлементами. // Микробиол. журн. – 1995. – **57**, № 2. – С. 95–104.
11. **Таширев А.Б., Матвеева Н.А., Романовская В.А. и др.** Полирезистентность и сверхустойчивость к тяжёлым металлам антарктических микроорганизмов // Доповіді Національної Академії наук України. – 2007. – № 11. – С. 170–175.
12. **Таширев А.Б., Романовская В.А., Сиома И.А. и др.** Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} // Доповіді Національної Академії наук України. – 2008. – № 1. – С. 169–176.
13. **Babich H., Stotzky R.** Compounds of water hardness which reduce the toxicity of nickel to fungi // Microbiol. Lett. – 1981. – **18**, N 69. – P. 17–24.
14. **Bowman J.P., Sly L.I., Hayward A.C.** Patterns of tolerance to heavy metals among methane-utilizing bacteria // Lett. Appl. Microbiol. – 1990. – **10**, N 2. – P. 85–87.
15. **Langenbach T., Nascimento A., Sarga M.** Influence of heavy metals on nitrogen fixation and growth of *Azospirillum strains* // Rev. Latinoamer. Microbiol. – 1988. – **30**, N 2. – P. 139–142
16. **Naidu., Ramachandra R.T.K.** Protection of cadmium, toxicity to *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* and *Aspergillus Niger* // Zbl. Mikrobiol. – 1988. – **143**, N 5. – P. 383–387.
17. **Pourbaix M.** Atlas of electrochemical equilibrium in aqueous solutions. – Oxford: Pergamon press, 1963. – P. 320.
18. **Silver S., Phung L.T.** A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions / J. Ind. Microbiol. Biotechnol. – 2005. – **32**. – P. 587–605.
19. **Tashyrev O.B.** The Complex Researches of Structure and Functions of Antarctic Terrestrial Microbial Communities/ Український антарктичний журнал. – 2009. – N 8. – P. 228–242.
20. **Tashyrev A.B., Rokitko P.V., Matvieieva N.A. et al.** Occurrence of Metalresistant Microorganisms on Islands of the Internal Shelf of the Antarctic Peninsula / Український антарктичний журнал. – 2009. – N 8. – P. 198–205.
21. **Towiner S.B.** Copper sulfate helps control microorganisms in reservoirs / Water and Sewage Works – 1976. – **123**, N 12. – P. 68–70.