

*Г.О. Таширева, Г.О. Іутинська, О.Б. Таширев*

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д13680, Україна  
ДУ Національний антарктичний науковий центр МОН України  
б-р Т. Шевченка, Київ, 1601601, Україна

## ВПЛИВ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ АНТАРКТИЧНИХ ШТАМІВ *ENTEROBACTER HORMAECHEI* ТА *BREVIBACTERIUM ANTARCTICUM* НА СТІЙКІСТЬ ДО ІОНІВ МІДІ(II)

Досліджено вплив температури та концентрації джерел вуглецю й енергії на стійкість до міді штамів *Enterobacter hormaechei* та *Brevibacterium antarcticum*, виділених з орнітогенних ґрунто-субстратів о. Галіндез (Західна Антарктика), та їх здатність до вилучення катіонів  $\text{Cu}^{2+}$  з середовища. Штами є психротолерантними мезофілами, оптимальними умовами для росту є висока концентрація джерел вуглецю та температура, що дорівнює  $+28^\circ\text{C}$ . Показано, що штамів здатні рости у концентраційному діапазоні міді 100-1100 мг/л та вилучати з середовища 11-75 %  $\text{Cu}^{2+}$  залежно від умов культивування та вихідної концентрації міді у живильному середовищі.

*Ключові слова:* *Enterobacter hormaechei*, *Brevibacterium antarcticum*, стійкість до  $\text{Cu}^{2+}$ , вилучення іонів металів.

Мікроорганізми, що існують в екстремальних умовах Антарктики, є стійкими до численних стресових факторів, у тому числі, до іонів важких металів. Нами показано, що стійкість до найбільш токсичних металів, таких як  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ , є поширеним біологічним явищем принаймні на островах Аргентинського архіпелагу (західне узбережжя Антарктичного півострова) [5].

Характерним для о. Галіндез (Аргентинський архіпелаг), де розташований дослідницький біогеографічний полігон, є висока для Антарктики температура:  $+4 - +5^\circ\text{C}$  під час полярного літа. Також особливістю островів є наявність орнітогенних ґрунтів з дуже нерівномірним розподілом джерел вуглецю та енергії [1]. В той же час, в антарктичних біотопах визначено підвищений вміст важких металів. Фізіологічні особливості антарктичних мікроорганізмів, зокрема стійкість до іонів важких металів, вивчені недостатньо. З огляду на викладене, вивчення впливу температури і концентрації поживних речовин є доцільним і необхідним при дослідженні стійкості антарктичних мікроорганізмів до важких металів.

**Матеріали і методи.** Об'єктами досліджень були 2 колекційні ідентифіковані нами штамми *Brevibacterium antarcticum* B-3204 та *Enterobacter hormaechei* B-3208, виділені з ґрунто-субстратів о. Галіндез. Обидва штамми при рості на агаризованому середовищі резистентні до 1000 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  або  $\text{CrO}_4^{2-}$ , *Enterobacter hormaechei* також стійкий до 500 мг/л  $\text{Hg}^{2+}$  [4]. Взаємодію з іонами токсичних металів та визначення оптимальних умов росту штамів вивчали за дії  $\text{Cu}^{2+}$ .

У пробірки вносили 10 мл рідкого середовища для культивування гетеротрофних мікроорганізмів (Nutrient broth, Standart-1, виробник «Hansa»), 100 мкл 6-годинної культури (середина логарифмічної фази росту) та розчин солі  $\text{CuSO}_4$  до кінцевої концентрації 100-1200 мг/л по катіону  $\text{Cu}^{2+}$  з кроком 100 мг/л. Аерацію середовища забезпечували на качалках (180 об/хв). Культивували протягом 3 діб при температурах  $+4^\circ\text{C}$ ,  $+20^\circ\text{C}$  та  $+28^\circ\text{C}$  на нерозведеному середовищі для визначення впливу температури на ріст штамів та при температурі  $+28^\circ\text{C}$  на нерозведеному та розведеному 1:10 середовищі. Дослід тричі повторювали. Для обчислення інтервалу достовірності проводили статистичну обробку. [6].

Оцінку росту штамів проводили за накопиченням біомаси. Для цього для кожного штаму будували калібрувальну криву у координатах абсолютно суха маса – оптична

густина і виражали у мг абсолютно сухої маси (АСМ). Для визначення синтезу біомаси проводили вимірювання оптичної густини при  $\lambda = 490$  нм (кювета з довжиною оптичного шляху 5 мм). При взаємодії мікроорганізмів із  $\text{Cu}^{2+}$  у культуральній рідині накопичуються забарвлені сполуки міді, які суттєво змінюють колір середовища та заважають колориметричному визначенню біомаси. Тому перед визначенням біомаси забарвлену культуральну рідину та клітини мікроорганізмів розділяли. Для цього культуральну рідину об'ємом 10 мл центрифугували при 5000 об/хв протягом 10 хвилин. Супернатант відокремлювали від осаджених клітин декантуванням, а осаджену біомасу ресуспендували у фізіологічному розчині до початкового об'єму (10 мл) та вимірювали оптичну густину. Одночасно у супернатанті визначали концентрацію  $\text{Cu}^{2+}$ .

Ефективність вилучення іонів  $\text{Cu}^{2+}$  з розчину визначали шляхом визначення залишкової концентрації розчинних сполук міді у культуральній рідині після 3 діб культивування. Вимірювання проводили методом титрування комплексу  $\text{Cu}^{2+}$ - ПАР (параамінорезорцин) розчином ЕДТА [2]. До культурального середовища з  $\text{Cu}^{2+}$  додавали 0,1 мл 0,1 % розчину ПАР, який утворював із міддю комплексну сполуку вишнево-червоного кольору. При титруванні комплексу розчином ЕДТА (2,5 г/л) відбувається руйнування комплексу  $\text{Cu}^{2+}$ — ПАР, що викликає різку зміну забарвлення у точці переходу з червоного на лимонно-жовтий. Експериментально встановлено, що кількість розчину ЕДТА (2,5 г/л), витрачена на руйнування комплексу  $\text{Cu}^{2+}$ — ПАР, прямо пропорційна вмісту  $\text{Cu}^{2+}$  у концентраційному діапазоні 25-1500 мг/л. Розраховували коефіцієнт акумуляції металів (R), що характеризує ступінь вилучення з розчину  $\text{Cu}^{2+}$ :

$$R = (\Delta C : C_0) \times 100\%,$$

де  $\Delta C$  – різниця між вихідною ( $C_0$ ) та кінцевою або рівноважною ( $C_p$ ) концентрацією металів [3].

**Результати та їх обговорення.** Відомо, що роди *Brevibacterium* та *Enterobacter* є поширеними у більшості регіонів Антарктики [7, 9, 12, 13]. Виділені та ідентифіковані нами *Enterobacter hormaechei* та *Brevibacterium antarcticum* є надзвичайно стійкими до міді, тобто вони ростуть при таких концентраціях  $\text{Cu}^{2+}$ , що є бактерицидними для переважної більшості гетеротрофних мікроорганізмів. Так, для деяких колекційних культур мікроорганізмів та угруповань природних біотопів бактерицидна концентрація  $\text{Cu}^{2+}$  знаходиться в межах 0,1–50 мг/л (табл. 1). Досліджені антарктичні штами ростуть у надзвичайно широкому концентраційному діапазоні розчинної  $\text{Cu}^{2+}$ : ріст *B. antarcticum* виявлено навіть при 1000 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ , а для *E. hormaechei* – при 1100 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ .

Таблиця 1

Бактерицидні концентрації іонів  $\text{Cu}^{2+}$  для мікроорганізмів помірних кліматичних широт

N	Мікроорганізми	Концентрація $\text{Cu}^{2+}$ , мг/л	Посилання
1	<i>Anabaena</i> sp.	0,6	[11]
2	<i>Pseudomonas putida</i>	0,5	[10]
3	<i>Klebsiella</i> sp.	0,6	[8]
4	Угруповання бактерій прісних водоймищ	1,2	[14]

Проте, незважаючи на високу стійкість штамів до міді, її токсична дія проявляється у всьому концентраційному діапазоні, від 100 до 1100 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ . Так, вже при 100 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  біомаса *E. hormaechei* зменшується на 200 мг/л (рис. 1), а для *B. antarcticum* – на 250 мг/л (рис. 2) порівняно з контролем без міді. Пропорційне зменшення синтезу біомаси при підвищенні концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  на 100 мг/л спостерігається для *E. hormaechei* у діапазоні 100–600 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ . Так, при послідовному зростанні концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  на кожні 100 мг/л продукування біомаси зменшується на 150–300 мг/л АСМ. Аналогічна залежність характерна і для *B. antarcticum*: у діапазоні від 100 до 300 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  синтез біомаси зменшується на 180–250 мг/л АСМ при кожному послідовному збільшенні концентрації міді на 100 мг/л.

Але починаючи з концентрації 400–600 і до 800 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  обом штамам притаманна незвичайна властивість – відсутність пригнічення синтезу біомаси при підвищенні кон-

центрації  $\text{Cu}^{2+}$ . Так, для *E. hormaechei* при збільшенні концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  з 600 до 800 мг/л синтез біомаси є практично однаковим (270–300 мг/л АСМ). Для *B. antarcticum* такий концентраційний діапазон ще більший: при зростанні концентрації міді у 2 рази (з 400 до 800 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ ) синтез біомаси знаходиться в межах 410–570 мг/л АСМ. При подальшому збільшенні концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  знову спостерігається зниження рівня синтезу біомаси обох штамів.

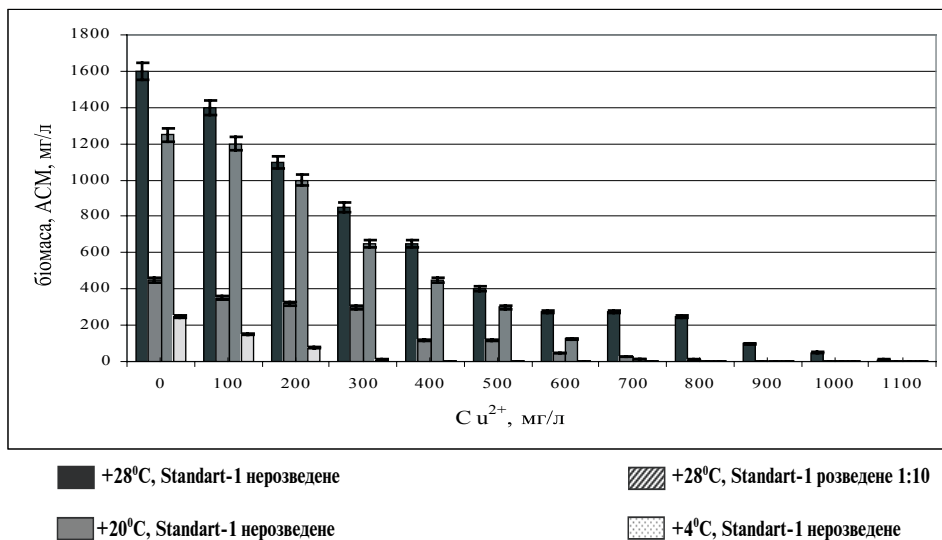


Рис. 1. Приріст біомаси (мг/л АСМ) *Enterobacter hormaechei* при градієнті концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  0-1200 мг/л

Обидва штами виділені з біогеографічного полігону антарктичного «термостатованого» оазису, найвища точка якого – 58 метрів над рівнем моря [1]. За таких умов вся поверхня орнітогенних ґрунто-субстратів рівномірно прогривається, але навіть у теплу сонячну погоду температура не перевищує  $+5^\circ\text{C}$ . Тому передбачалось, що ці мікроорганізми є психрофільними. Проте, при визначенні оптимальної температури росту штамів з'ясувалося, що вони є психротолерантними мезофілами. Так, при температурі  $+28^\circ\text{C}$  у контролі (без міді) біомаса *E. hormaechei* становила 1600 мг/л, при  $+20^\circ\text{C}$  – 1250 мг/л, при  $+4^\circ\text{C}$  – 250 мг/л АСМ (рис. 1), а для *B. antarcticum* – 1800, 1000 та 500 мг/л АСМ (рис. 2).

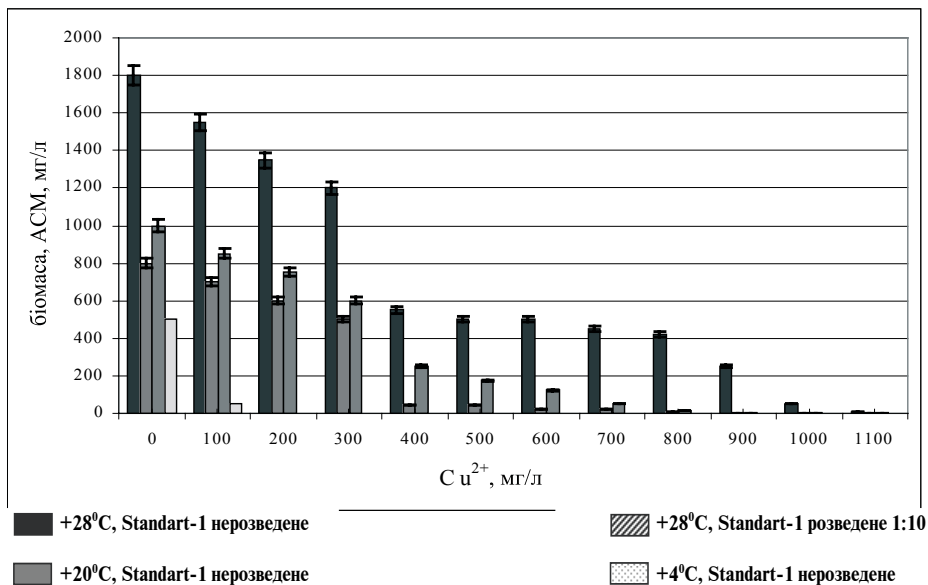


Рис. 2. Приріст біомаси (мг/л АСМ) штаму *Brevibacterium antarcticum* при градієнті концентрації  $\text{Cu}^{2+}$  0-1100 мг/л

Для полігону також характерний дуже нерівномірний розподіл органічних речовин в орнітогенних ґрунто-субстратах [1]. Саме тому ми дослідили вплив температури і концентрації джерел вуглецю та енергії на стійкість штамів до міді, а також на вилучення ними  $\text{Cu}^{2+}$  із поживного середовища.

Стійкість штамів до міді та їх здатність до акумуляції  $\text{Cu}^{2+}$  істотно залежить від температури культивування та розведення середовища. Для обох штамів температура культивування є впливовим фактором. Так, на нерозведеному середовищі при температурі  $+4^\circ\text{C}$  за наявності мінімальної концентрації міді (100 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ ) синтез біомаси штамом *E. hormaechei* становить 180 мг/л АСМ (рис. 1), а вилучення міді не виявлено (рис. 3). Навпаки, у таких самих умовах при температурах  $+20^\circ\text{C}$  та  $+28^\circ\text{C}$  продукування біомаси вище відповідно у 6,6 та 7,7 разів (1200 та 1400 мг/л АСМ), а ступінь вилучення  $\text{R}$  дорівнює 75 % для обох варіантів. Аналогічні закономірності одержані для *B. antarcticum* (рис. 2; 4). Зменшення температури культивування призводило до значного зниження величини бактеріостатичної концентрації міді. Так, при температурах  $+28^\circ\text{C}$ ,  $+20^\circ\text{C}$  та  $+4^\circ\text{C}$  бактеріостатичні концентрації міді для *E. hormaechei* дорівнювали 1100, 700 та 300 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ , а для *B. antarcticum* відповідно 1000, 600 та 100 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ . Таким чином, зменшення температури з  $+28^\circ\text{C}$  до  $+20^\circ\text{C}$  та  $+4^\circ\text{C}$  призводило до зменшення бактеріостатичної концентрації міді відповідно у 1,6 та 3,6 рази для *E. hormaechei* і 1,6 та 10 разів для *B. antarcticum*.

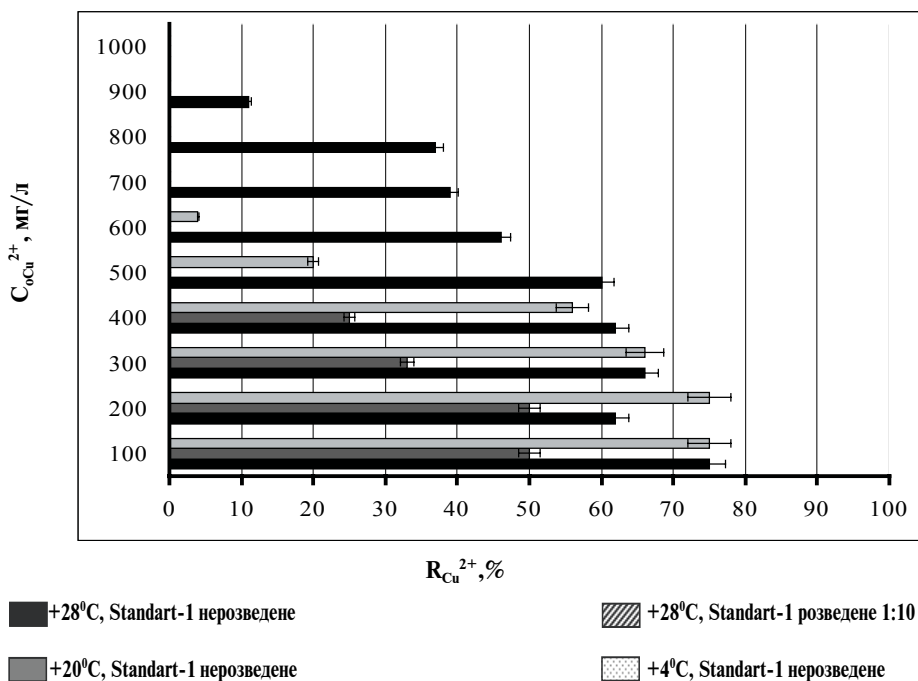


Рис. 3. Вилучення розчинних сполук міді штамом *Enterobacter hormaechei*

Розведення живильного середовища у 10 разів призводило до зменшення рівня накопичення біомаси обох штамів, зниження стійкості до міді та ефективності її вилучення.

Так, у контролі (без міді), а також при 200 та 400 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  біомаса *E. hormaechei* становила у нерозведеному середовищі 1600, 1100 та 640 мг/л АСМ. На середовищі, розведеному у 10 разів, за тих самих умов біомаса становила 450, 350 та 160 мг/л АСМ (рис. 1). Розведення живильного середовища негативно впливало на стійкість штамів до міді. «Критична» концентрація міді, за якої біомаса *E. hormaechei* дорівнювала 10 мг/л АСМ при температурі  $+28^\circ\text{C}$ , у нативному середовищі становила 1000 мг/л, а у середовищі, розведеному 1:10 – 600 мг/л АСМ. Для *B. antarcticum* критична концентрація  $\text{Cu}^{2+}$  складала 1000 мг/л при рості на нативному середовищі, в той час як на середовищі, розведеному 1:10, вона знаходилась у діапазоні 500–700 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  (рис. 2).

Зменшення вмісту поживних речовин у розведеному середовищі призводило до зниження ефективності вилучення  $\text{Cu}^{2+}$  *E. hormaechei* та *B. antarcticum*. При розведенні середовища у 10 разів для *E. hormaechei* ступінь вилучення міді ( $R$ ) зменшувався у 1,8 рази. Так, при рості на нерозведеному середовищі у концентраційному діапазоні 100–400 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$   $R = 60–75\%$ , а на розведеному  $R=25–50\%$  (рис. 3). Для *B. antarcticum* при 100 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$   $R = 75\%$  як на нативному, так і розведеному середовищі. При концентрації міді 200 мг/л на розведеному середовищі  $R$  становив 50 %, тоді як на нерозведеному  $R = 75\%$ . Вилучення міді при рості на нерозведеному середовищі відбувалось у діапазоні 100–800 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ , в той час як на розведеному середовищі лише при 100–200 мг/л (рис. 4).

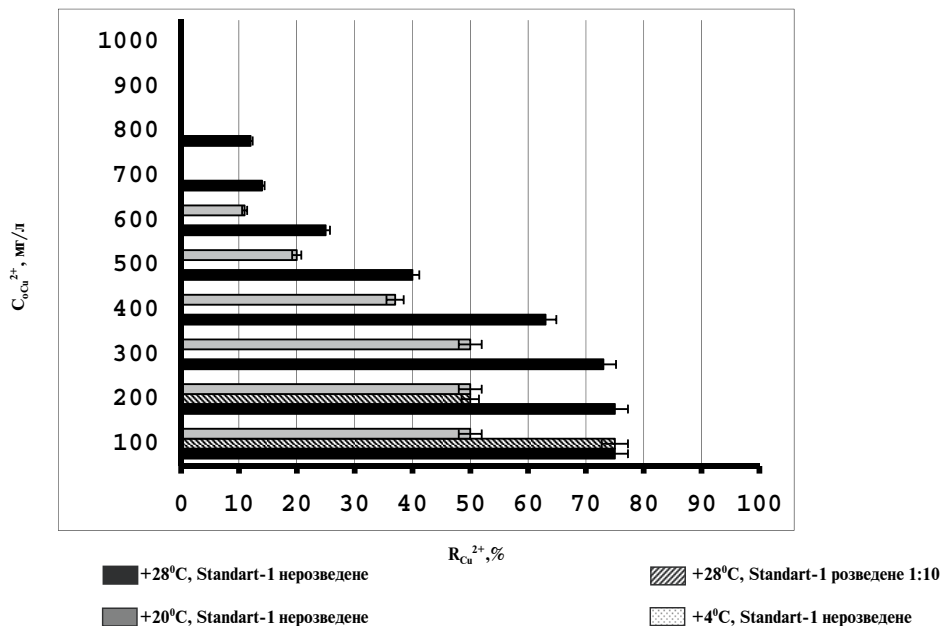


Рис. 4. Вилучення розчинних сполук міді штамом *Brevibacterium antarcticum*

Таким чином, одержані експериментальні дані свідчать про наступне.

Антарктичні штами *E. hormaechei* В-3208 та *B. antarcticum* В-3204 є психротолерантними мезофілами, стійкими до надвисоких концентрацій  $\text{Cu}^{2+}$  -1000–1100 мг/л. Вони не лише стійкі до міді, але й вилучають її з поживного середовища на 11–75 % у концентраційному діапазоні 100–700 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$ .

Стійкість культур до катіонів міді(II) залежить від ступеня розведення середовища та температури культивування, оптимальною є +28°C. Зменшення температури культивування призводить до пригнічення росту, ефективності вилучення міді та зменшення бактеріостатичної концентрації  $\text{Cu}^{2+}$ .

А.А. Таширева, Г.А.Иутинская, А.Б. Таширев

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины  
 ГУ Национальный антарктический научный центр МОН Украины  
**УСТОЙЧИВОСТЬ К ИОНАМ  $\text{Cu}^{2+}$  АНТАРКТИЧЕСКИХ ШТАММОВ  
 ENTEROBACTER NORMAECHAEI И ENTEROBACTER NORMAECHAEI ПРИ РАЗЛИЧНЫХ  
 УСЛОВИЯХ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ.**

#### Резюме

Исследована устойчивость к катионам  $\text{Cu}^{2+}$  штаммов *Enterobacter hormaechei* и *Brevibacterium antarcticum*, выделенных из образцов почво-субстрата о.Галиндез (Западная Антарктика), и их способность осаждать  $\text{Cu}^{2+}$ . Исследованные штаммы способны расти в концентрационном диапазоне меди 100-1100 мг/л и извлекать из раствора 11-75%  $\text{Cu}^{2+}$  в зависимости от условий культивирования и исходной концентрации меди в культуральной среде.

Ключевые слова: *Enterobacter hormaechei*, *Brevibacterium antarcticum*, устойчивость к  $\text{Cu}^{2+}$ , осаждение ионов металлов.

G. O. Tashyreva, G.O. Iutynska, O. B. Tashyrev

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv  
National Antarctic Scientific Centre, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv

**EFFECT OF CULTIVATION PARAMETERS  
OF ANTARCTIC STRAINS *ENTEROBACTER HORMAECHEI* AND *BREVIBACTERIUM  
ANTARCTICUM* ON RESISTANCE TO COPPER (II) IONS**

**S u m m a r y**

*Enterobacter hormaechei* and *Brevibacterium antarcticum* strains isolated from ornithogenic soils of Galindez Island (West Antarctica) were investigated for their resistance to  $\text{Cu}^{2+}$  cations and for their capacity to  $\text{Cu}^{2+}$  uptake from the environment. The studied strains are capable to grow in the concentration range of copper 100-1100 mg/l and to extract 11-75% of  $\text{Cu}^{2+}$  from the environment depending on cultivation parameters and copper output concentration in the culture medium.

The paper is presented in Ukrainian.

**К е у в о р д с:** *Enterobacter hormaechei*, *Brevibacterium antarcticum*, resistance to  $\text{Cu}^{2+}$ , extraction of metal ions.

**The a u t h o r ' s a d d r e s s:** G.O. Tashyreva, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Іутинська Г.О., Таширева Г.О. Мікробні угруповання ґрунто-субстратів антарктичного острову Галіндез // Мікробіол. журн. — 2008 — **70**, №5. — с. 3.
2. Справочник химика. Аналитическая химия. Спектральный анализ. Показатели преломления. — Москва: Изд-во Химия, 1965. — Т. 4 — 919 с.
3. Таширев А.Б., Смирнова Г.Ф. Аккумуляция металлов синтрофными ассоциациями микроорганизмов // Мікробіол. журн. — 1999. — **61**, № 6. — С. 58—65.
4. Таширев А.Б., Матвеева Н.А., Романовская В.А., Таширева А.А., Рокитко П.В. Полирезистентность и сверхустойчивость к тяжёлым металлам антарктических микроорганизмов // Доповіді Національної Академії наук України. — 2007. — № 11. — С. 70—75.
5. Таширев А.Б., Романовская В.А., Сиома И.А., Усенко В.П., Таширева А.А., Матвеева Н.А., Рокитко П.В., Копытов Ю.П., Серединин Е.С., Мизин Д.А., Подгорский В.С. Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{CrO}_4^{2-}$  // Доповіді Національної Академії наук України. — 2008. — № 1. — С. 169—176.
6. Третьяк Л.Н. Обработка результатов наблюдений: Учебное пособие. — Оренбург — ГОУ ОГУ, 2004 — 171 с.
7. Brinkmeyer R., Knittel K., Jurgens J., Weyland H., Amann R. Helmke E. Diversity and structure of bacterial communities in Arctic versus Antarctic pack ice // Appl. Environ. Microbiol. — 2003. — **69**, N 11. — P. 6610—6619.
8. Brhynhildsen 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**, N 7. — P. 1689—1693.
9. Cai, J. and Collins, M.D. Three new species of brevibacteria, *Brevibacterium antiquum* sp. nov., *Brevibacterium aurantiacum* sp. nov., and *Brevibacterium permense* sp. nov. // Microbiology (Reading, Engl.) — 2004. — N 73 — P. 176—183
10. Chao W.H., Chen Cheryl L.F. Role of exopolymer and acid-tolerance in the growth of bacteria in solutions with high copper ion concentration // L. Gen. Anot Appl. Microbiol. — 1991. — **37**, N 4. — P. 363—370.
11. Laube V.M., McKenzie C.N., Kushner D.J. Strategies of response to copper, cadmium, and lead by a blue-green and a green alga // Can. J. Microbiol. — 1980. — **26**, N 11. — P. 1300—1311.
12. Shivaji S, Reddy GS, Aduri RP, Kutty R, Ravensschlag K. Bacterial diversity of a soil sample from Schirmacher Oasis, Antarctica. // Cell Mol Biol — 2004. — **50**, N 5. — P. 525—36.
13. Siebert J, Hirsch P, Friedmann EI. Characterization of 15 selected coccal bacteria isolated from Antarctic rock and soil samples from the McMurdo-Dry Valleys (South-Victoria Land) // Polar Biol. — 1988. — N 9. — P. 37—44.
14. Towiner S.B. Copper sulfate helps control microorganisms in reservoirs // Water and Sewage Works. — 1976. — **123**, N 12 — P. 68—70.

Отримано 20.02.2008