

УДК 579.26

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

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, Киев, 03143, Украина*

УСТОЙЧИВОСТЬ К ТОКСИЧНЫМ МЕТАЛЛАМ ХЕМООРГАНОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ АНТАРКТИЧЕСКИХ КЛИФОВ

Исследована устойчивость к токсичным металлам (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , $Cr(VI)$) у бактерий, которые были изолированы из образцов наскальных лишайников вертикальной скалы (клиф), расположенной на биогеографическом полигоне Украинской антарктической станции Академик Вернадский (о. Галиндез). Среди антарктических наскальных микроорганизмов, изолированных на неселективной среде (без токсичных металлов), обнаружены бактерии, способные расти при концентрациях токсичных металлов (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , $Cr(VI)$), которые являются бактерицидными для других микроорганизмов. Исследованные бактерии наиболее устойчивы к металлу-окислителю $Cr(VI)$ в диапазоне 1.25-20.0 г/л, в зависимости от штамма. Максимальные концентрации металлов-заместителей, при которых наблюдался рост бактерий, составляли: для Ni^{2+} – 2.0 г/л, для Co^{2+} – 0.1 г/л. В присутствии металлов комбинированного действия они росли в концентрационном диапазоне: Hg^{2+} – 0.005-0.05 г/л, Cu^{2+} – 0.1-1.25 г/л. Наиболее выраженный токсичный эффект имела ртуть. Изолирован суперустойчивый антарктический штамм, который рос при высоких концентрациях токсичных металлов в среде (г/л): $Cr(VI)$ – 20.0, Ni^{2+} – 2.0, Cu^{2+} – 1.25, Co^{2+} – 0.1, Hg^{2+} – 0.05. Таким образом, для антарктических наскальных бактерий повреждающая или бактерицидная концентрация токсичных металлов на 2-3 порядка выше, чем для большинства микроорганизмов.

Ключевые слова: Антарктика, микроорганизмы клифов, устойчивость, токсичные металлы.

В Антарктике микробные ценозы клифов (т.е. вертикальных скал, часто с отрицательным углом наклона) испытывают интенсивное воздействие комплекса экстремальных факторов. К таковым относятся резкие суточные перепады температуры, сопровождающиеся циклами «замораживания – оттаивания»; сильный ветер (до 20-25 м/сек), усиливающий негативное действие низких температур, высокий уровень УФ радиации, токсичные металлы, входящие в состав изверженных пород. Ранее нами было показано, что микроорганизмы антарктических клифов устойчивы к УФ радиации [5, 10]. Также наши данные свидетельствуют о широком распространении металлрезистентных микроорганизмов в почвах и фитоценозах Антарктики [6, 7, 12]. Целью данной работы было изучение устойчивости к наиболее токсичным металлам: Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , $Cr(VI)$ у неадаптированных к ним бактерий антарктических клифов.

Материалы и методы. *Объектами исследований* были штаммы аэробных хемоорганотрофных бактерий, изолированные из наскальных лишайников, отобранных в различных стационарных точках мониторинга на скалах о. Галиндез. Изучаемая экосистема – это клиф (скала) на биогеографическом полигоне Украинской антарктической станции Академик Вернадский (о. Галиндез). Клиф никогда не покрывается снегом, и, таким образом, его биоценозы подвергаются в течение всего года действию экстремальных факторов.

Микроорганизмы выделяли методом посева последовательных десятикратных разведений образцов на агаризованную питательную среду Nutrient Agar (NA) фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Ltd. Среда не содержала токсичные металлы, то есть не была селективной. Чистые культуры выделяли стандартными методами [4]. Изолированные штаммы хранили в пробирках на скошенной агаризованной среде NA при 5°C. Морфологические свойства клеток выделенных штаммов (окрашивание по Грамму, Пешкову и др.) определяли по руководству [4].

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

© А.Б. Таширев, П.В. Рокитко, А.С. Левишко, В.А. Романовская, А.А. Таширева, 2012

бане 10 минут. Раствор ртути готовили из металлической ртути, как описано ранее [13]. Микроорганизмы культивировали в пробирках (10 мл среды NB, 10 сут., 28-30°C) на качалке (220 об./мин). К среде добавляли один из токсичных металлов в концентрационном диапазоне (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. В среду с металлами вносили инокулом (микробную суспензию). Все варианты эксперимента ставили в 3 повторностях.

Результаты и их обсуждение. Из 7-ми образцов наскальных лишайников на среде NA (без токсичных металлов) были изолированы азробные хемоорганотрофные бактерии, среди них десять штаммов отобраны для изучения их устойчивости к металлам. Эти штаммы были выделены из предельных разведений образцов, где количество колоний не превышало 10-30 на чашку. Следовательно, они являлись доминирующими формами в данных биотопах. При микроскопии клеток было установлено, что изолированные штаммы являлись грамположительными, большинство из них представлены палочками; исключение – штамм 190n2, клетки которого оказались кокками.

Чтобы определить влияние токсичных металлов на антарктические наскальные бактерии, мы использовали металлы с разным типом действия, а именно металлы-заместители (Co^{2+} и Ni^{2+}), металлы-окислители (Cr(VI) в виде аниона CrO_4^{2-}) и металлы «комбинированного» действия (Hg^{2+} и Cu^{2+}), которые сочетают одновременно свойства как металлов-окислителей, так и металлов-заместителей.

Известно, что повреждающее действие металлов-заместителей заключается в необратимом замещении двухвалентных катионов в активных центрах ферментов и клеточных структурах микроорганизмов, что приводит к существенному ингибированию роста или гибели клеток [7, 11]. В результате проведенных нами исследований установлено, что минимальная концентрация кобальта (металл-заместитель), при которой росли все исследованные штаммы, составляла – 0.05 г/л. Бактерицидная концентрация кобальта для всех исследованных штаммов составляла 0.2 г/л (рис. 1а). Минимальная концентрация никеля (металл-заместитель), при которой росли все штаммы, составляла 0.1 мг/л. При концентрации никеля в среде 2.0 г/л наблюдался рост только одного штамма 190n2. В целом, как показано на рисунках 1а и 1б, среди металлов-заместителей кобальт оказался более токсичным для наскальных антарктических штаммов, чем никель. Проникновение в клетку никеля и кобальта может происходить с помощью системы NiCoT, которая есть у бактерий, археобактерий, грибов. И хотя кобальт и никель необходимы для метаболизма микроорганизмов, в избытке они токсичны. В наших экспериментах выявлены бактерии, резистентные к высоким концентрациям этих металлов.

Как и другие кислородсодержащие анионы VI группы элементов, хромат вследствие его стереохимической аналогии с сульфатом конкурирует за ферменты и транспортные системы микроорганизмов [2, 11]. Различные формы хрома (VI), в том числе и хромат-анион CrO_4^{2-} , являясь высокопотенциальными соединениями, оказывают повреждающее действие на микроорганизмы за счет необратимого окисления ферментов и структурных компонентов микробных клеток. Нами установлено, что изолированные антарктические штаммы резистентны к хрому (металл-окислитель). Лишь 20 % из них не росли при минимальных (1.25 г/л) испытанных концентрациях хрома (рис. 1в). У одного из штаммов (190n2) выявлена суперрезистентность к хрому (таблица). Максимальная концентрация Cr(VI) в среде, при которой наблюдался рост этого штамма, составляла 20.0 г/л. Считается, что в присутствии токсичного хромата, являющегося сильным металлом-окислителем, могут расти только высокоспециализированные, искусственно адаптированные к этому металлу микроорганизмы [1]. Поэтому особый интерес представляет высокая устойчивость большинства наскальных микроорганизмов к Cr(VI) , а также сверхустойчивость неадаптированного к этому металлу антарктического штамма 190n2.

Металлы «комбинированного» действия считаются наиболее токсичными вследствие высокого 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 сочетает повреждающие механизмы как металла-окислителя, так и металла-заместителя. Установлено, что выделенные антарктические бактерии наименее устойчивы к ртути по сравнению со всеми другими исследованными нами металлами (рис. 2, а).

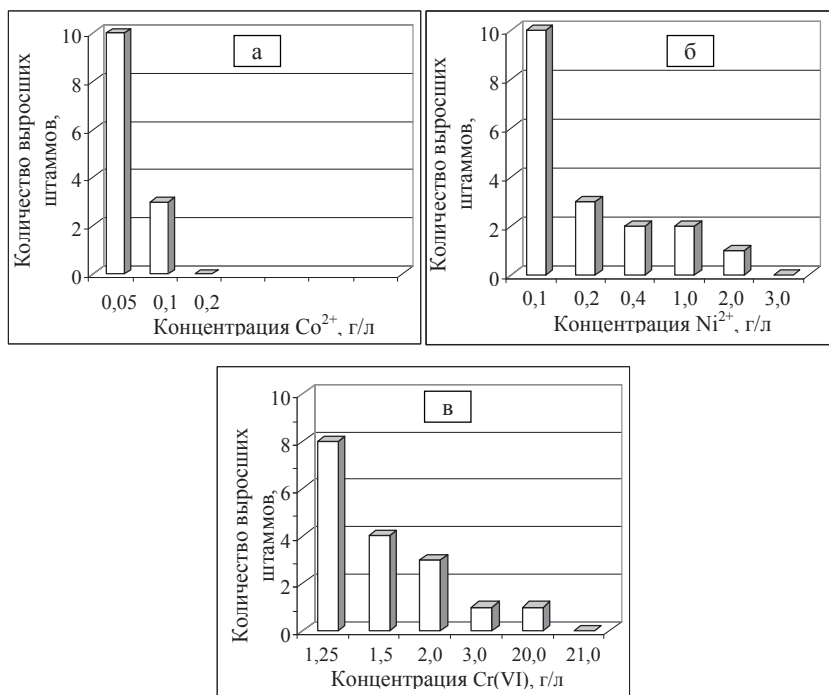


Рис. 1. Устойчивость антарктических наскальных микроорганизмов к возрастающим концентрациям токсичных металлов-заместителей (Co^{2+} и Ni^{2+}) и металла-окислителя (Cr(VI) в виде аниона CrO_4^{2-}).

Таблица
Максимальные концентрации металлов, при которых росли исследованные антарктические наскальные бактерии

Штамм	Максимальная концентрация металла (г/л), при которой выявлено рост				
	Hg^{2+}	Cu^{2+}	Cr(VI)	Ni^{2+}	Co^{2+}
180n1	0.005	0.1	1.25	0.1	0.1
180n2	0.01	0.1	1.25	0.1	0.05
181n2	-	0.1	-	0.1	0.05
181n3	0.01	1.0	2.5	0.2	0.05
182n1	0.01	0.2	2.5	1.0	0.1
185n1	0.01	0.1	1.25	0.1	0.05
187n3	0.025	0.1	-	0.1	0.05
188n2	-	0.1	1.25	0.1	0.05
190n1	0.005	0.1	1.5	0.1	0.05
190n2	0.05	1.25	20.0	2.0	0.1

Примечание. «-» – рост отсутствует при минимальных испытанных концентрациях металлов.

Некоторые из них (штаммы 181n2 и 188n2) не способны были расти при концентрации ртути 0.005 г/л (таблица). Наиболее резистентным к ртути оказался штамм 190n2 (таблица), максимальная концентрация, при которой наблюдался его рост, составляла 0.05 г/л. Такая концентрация ртути является летальной для большинства известных металлрезистентных штаммов. Так, по литературным данным, угнетение микробного метаболизма ртутью наблюдается уже при концентрации 0.001–0.004 г/л Hg^{2+} [8, 9].

Медь также относится к металлам «комбинированного» действия. Катион Cu^{2+} является высокопотенциальным ($E'_0 = +440$ мВ) металлом-окислителем, который способен к замещению металлов активных центров ферментов. Исследуемые антарктические бактерии оказались более резистентными к меди, чем к ртути (рис. 2). При увеличении концентрации меди до 0.4 г/л уменьшалось количество выросших штаммов, а при концентрации 1.25 г/л меди – рос только

один штамм (рис. 2, б). Известно, что положительные значения окислительно-восстановительного потенциала приводят к активному включению меди в окислительно-восстановительные биохимические процессы. Медь способна к образованию с микробными метаболитами нерастворимых соединений, таких как сульфиды, карбонаты, а также может поглощаться клеточными структурами [3]. Для большинства микроорганизмов повреждающая или бактерицидная концентрация Cu^{2+} находится в диапазоне 0.00002 – 0.005 г/л [14]. Согласно представленным результатам, исследованные антарктические штаммы характеризуются высоким уровнем устойчивости к меди (Cu^{2+}).

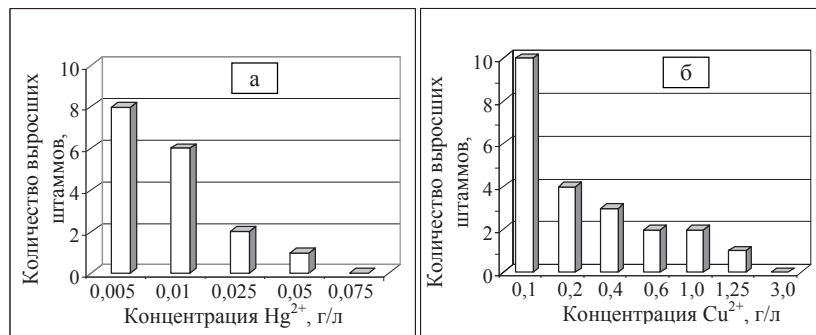


Рис. 2. Устойчивость антарктических наскальных микроорганизмов к возрастающим концентрациям токсичных металлов «комбинированного» действия (Hg^{2+} и Cu^{2+}).

Как показано в таблице, высокой устойчивостью ко всем изученным металлам характеризовался штамм 190п2. Максимальные 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. Необходимо еще раз подчеркнуть, что в работе мы использовали антарктические бактерии, выделенные на неселективной среде без токсичных металлов, и потому выяснение механизмов высокой устойчивости некоторых штаммов к этим факторам нуждается в последующем исследовании.

Таким образом, определены максимальные и минимальные концентрации токсичных металлов, при которых растут антарктические бактерии, изолированные из образцов наскальных лишайников вертикальной скалы, расположенной на биогеографическом полигоне Украинской антарктической станции Академик Вернадский. Показано, что для антарктических наскальных бактерий повреждающая или бактерицидная концентрация токсичных металлов (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr(VI)) на 2-3 порядка выше, чем для большинства микроорганизмов.

О.Б. Таширев, П.В. Рокитко, А.С. Левішко, В.О. Романовська, Г.О. Таширева

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

СТІЙКІСТЬ ДО ТОКСИЧНИХ МЕТАЛІВ ХЕМООРГАНОТРОФНИХ БАКТЕРІЙ, ІЗОЛОВАНИХ З АНТАРКТИЧНИХ КЛІФІВ

Резюме

Досліджено стійкість до токсичних металів (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr(VI)) у бактерій, які були ізолювані із зразків наскальних лишайників вертикальної скелі (кліф), розташованої на біогеографічному полігоні Української антарктичної станції Академік Вернадський (о. Галіндез). Серед антарктичних наскальних мікроорганізмів, ізолюваних на неселективному середовищі (без токсичних металів), виявлено бактерії, здатні рости при концентраціях токсичних металів (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr(VI)), які є бактерицидними для інших мікроорганізмів. Досліджені бактерії найбільш стійкі до металу-окислювача Cr(VI) в діапазоні 1.25-20.0 г/л, залежно від штаму. Максимальні концентрації металів-замінників, за яких спостерігався ріст бактерій, становили: Ni^{2+} – 2.0 г/л, Co^{2+} – 0.1 г/л. У присутності металів комбінованої дії вони росли в концентраційному діапазоні: Hg^{2+} – 0.005-0.05 г/л, Cu^{2+} – 0.1-1.25 г/л. Найбільш виражений токсичний ефект мала ртуть. Ізольовано суперстійкий антарктичний штам, який ріс при високих концентраціях токсичних металів в середовищі (г/л): Cr(VI) – 20.0, Ni^{2+} – 2.0, Cu^{2+} – 1.25, Co^{2+} – 0.1, Hg^{2+} – 0.05. Таким чином, для антарктичних наскальних бактерій ушкоджувальна або бактерицидна концентрація токсичних металів на 2-3 порядки вища, ніж для більшості мікроорганізмів.

Ключові слова: Антарктика, мікроорганізми кліфів, стійкість, токсичні метали.

RESISTANCE OF CHEMOORGANOTROPHIC BACTERIA ISOLATED FROM ANTARCTIC CLIFFS TO TOXIC METALS

S u m m a r y

Resistance to toxic metals (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr(VI)) of bacteria isolated from rock lichen samples of vertical cliffs located on the biogeographic polygon of Ukrainian Antarctic Station *Akademik Vernadsky* (island Galindez) is studied. Among the Antarctic rock microorganisms isolated on nonselective medium (without toxic metals), bacteria able to grow at toxic metal concentrations lethal for the majority of microorganisms (Hg^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr(VI)) are found out. The studied bacteria are most resistant to Cr(VI) possessing oxidative properties in concentration range 1.25-20.0 g/l depending on the strain. Maximal metal concentrations, at which the growth of bacteria was possible, was: Ni^{2+} to toxic metals – 2.0 g/l, Co^{2+} – 0.1 g/l. In the presence of metal ions possessing both replacing and oxidative properties the strains grew in a concentration range: Hg^{2+} – 0.005-0.05 g/l, Cu^{2+} – 0.1-1.25 g/l. The highest toxic effect was shown for mercury ions. One of the isolated Antarctic strains which was superresistant to high toxic metal concentrations (g/l): Cr(VI) – 20.0, Ni^{2+} – 2.0, Cu^{2+} – 1.25, Co^{2+} – 0.1, Hg^{2+} – 0.05. Thus, for the Antarctic bacteria isolated from rock damaging or bactericidal toxic metal concentrations are by 2-3 orders higher than for the majority of microorganisms.

The paper is presented in Russian

К е y w o r d s: Antarctica, microorganisms, cliffs, resistance, toxic metals.

T h e a u t h o r ' s a d d r e s s: *Tashyrev A.V.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Science of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. *Квасников Е.И., Ключникова Т.М., Касаткина Т.П., Киприанова Е.А., Бойко О.И.* Резистентность бактерий рода *Pseudomonas* к соединениям шестивалентного хрома и способность к его восстановлению // Микробиол. журн. – 1988. – **50**, № 6. – С. 24-27.
2. *Кушкевич І., Гнатуш С., Гудзь С.* Вплив важких металів на клітини мікроорганізмів// Вісник Львівського університету. Сер. біол. – 2007. – Вип. 45. – С. 3-28.
3. *Методы общей бактериологии / Под ред. Герхардта Ф.* – М: Мир, 1984. – Т. 3. – 263 с.
4. *Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А., Рокитко П.В., Левешко А.С.* Устойчивость к УФ радиации антарктических микроорганизмов // Микробиол. журнал. – 2011. – **73**, № 3. – С. 3 – 8.
5. *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. 170–175.
6. *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 Hg^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} и CrO_4^{2-} // Доповіді Національної Академії наук України. – 2008. – № 1. – С. 169–176.
7. *Жизнь микробов в экстремальных условиях / Под ред. Д. Кашнера.* – Москва: Мир, 1981. – 519 с.
8. *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.
9. *Langenbach T., Nascimento A., Sarpa M.* Influence of heavy metals on nitrogen fixation and growth of *Azospirillum* strains // Rev. Latinoamer. Microbiol. – 1988. – **30**, N 2. – P. 139-142
10. *Romanovskaya V.A., Tashyrev O.B., Rokitko P.V., Shilin S.O., Chernaya N.A., Tashyreva A.O.* Microbial Diversity in Terrestrial Antarctic Biotopes// Ukrainian Antarctic Journal. – 2009. – N 8. – P. 243-248.
11. *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.
12. *Tashyrev O.B.* The Complex Researches of Structure and Functions of Antarctic Terrestrial Microbial Communities// Ukrainian Antarctic Journal. – 2009. – N 8. – P. 228-242.
13. *Tashyrev A.B., Rokitko P.V., Matvieieva N.A., Tashyreva A.A., Romanovskaya V.A.* Occurrence of Metalresistant Microorganisms on Islands of the Internal Shelf of the Antarctic Peninsula // Ukrainian Antarctic Journal. – 2009. – N 8. – P. 198-205.
14. *Towiner S.B.* Copper sulfate helps control microorganisms in reservoirs// Water and Sewage Works – 1976. – **123**, N 12. – P. 68-70.

Отримано 28.03.2011