

А. Б. Таширев, В. А. Романовская, И. Б. Сиома,  
В. П. Усенко, А. А. Таширева, Н. А. Матвеева, П. В. Рокитко,  
Ю. П. Копытов, Е. С. Серединин, Д. А. Мизин,  
академик НАН Украины В. С. Подгорский

## Антарктические микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям $\text{Hg}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$ , $\text{Cd}^{2+}$ и $\text{CrO}_4^{2-}$

*The microbiological analysis of various biotopes which have been selected on the islands Galindez, Skua, Barchans, Irizar, Uruguay, Jalour, Petermann, Berthelot, Cruls, and King-Georg located in the western Antarctic Region and at the western coast of the Antarctic peninsula, cape Rasmussen and cape Tuxen, was carried out. In the majority of ground biotopes (the soil, mosses, lichens, lake silt, water, humus) of the investigated Antarctic Region, the microorganisms resistant to heavy metals (100... 500 ppm of ions Cr, Cu, Cd, or Hg) are revealed. Thus, for the first time, the wide occurrence of microorganisms resistant to a bactericidal concentration of heavy metals in the Antarctic Region is shown. Uniqueness of a phenomenon consists in a combination: (1) ability of microorganisms to grow at superhigh concentration of heavy metals, (2) it is non-comparable by low concentration of heavy metals in the Antarctic samples (from 0.02 up to 40 ppm), (3) presence of metal-resistant microorganisms in all ground biotopes of the Antarctic Region, (4) high number of metal-resistant microorganisms in these biotopes ( $10^4 \dots 10^5$  cells/g of a substrate).*

Первые работы по микробиологии Антарктики и Антарктиды относятся к концу XIX — началу XX века [1]. Уже более 100 лет ведется поиск новых микроорганизмов, обитающих в этих экстремальных регионах [2]. В Антарктике выявлены представители различных филогенетических линий: актинобактерии, эндоспоровые микроорганизмы, протеобактерии и т. д. [3, 4]. В последние годы из озер Антарктики выделены новые виды хемоорганотрофных [5, 6] и хемолитоавтотрофных микроорганизмов [7]. В 2002 г. Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины при поддержке Национального антарктического научного центра МОН Украины приступил к системному изучению структуры и функций антарктических микробных ценозов на о. Галиндез, где был основан биогеографический исследовательский полигон. Полигон, расположенный на крутом холме, представляет собой уникальный термостатированный антарктический оазис (рис. 1), в котором присутствуют все типы наземных антарктических биотопов, таких как озера, ручьи, почва, водорослево-бактериальные пленки, лишайники и мхи, высшие растения (*Deshampcia antarctica*), гнездовья птиц. Высшая точка полигона находится на небольшой высоте (59,8 м), что обуславливает на протяжении всего полярного лета (5–10 °С) постоянное таяние льда и снега и в результате этого происходит непрерывный сток воды по всем биотомам полигона. Поэтому на полигоне формируется режим, обеспечивающий биогеохимическую активность микроорганизмов. Одной из характеристик гомеостаза микробных ценозов является их устойчивость к токсичным тяжелым металлам. Известно, что  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{CrO}_4^{2-}$  в концентрациях 1,0–10,0 мг/л подавляют рост большинства микроорганизмов [8–10]. Однако полученные нами данные показали, что микроорганизмы, выделенные из образцов полигона на о. Галиндез, устойчивы к этим металлам [11]. В связи с этим целью нашего исследования

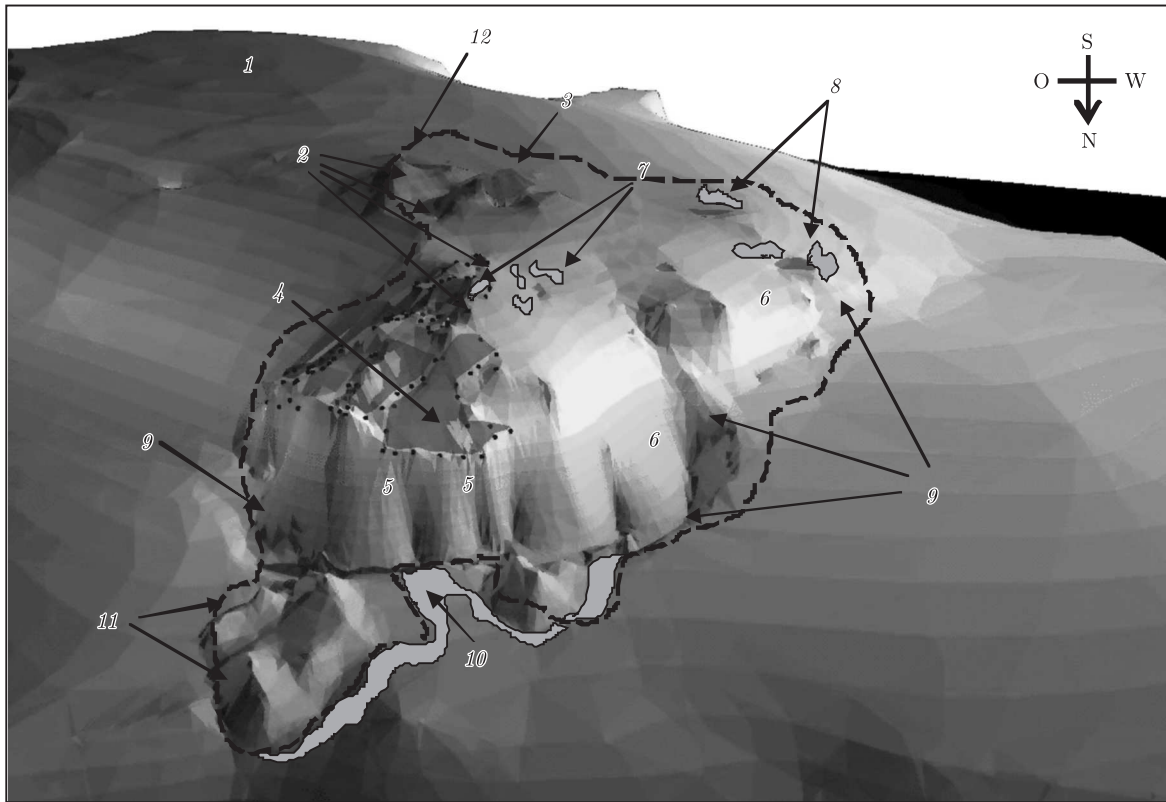


Рис. 1. 3D (трехмерная) модель морфоструктуры биогеографического полигона (о. Галиндез), увал северного склона, биогеохимическое картирование.

Пунктирной линией обозначена граница полигона. Компоненты полигона: 1 — платообразный купол ледника (поле развития ледовых водорослей); 2 — водораздел увала по его простиранию, гряда отдельных скал; 3 — ледниковое поле лишайников; 4 — перегиб к обрыву с моховыми полями; 5 — субвертикальная скала; 6 — боковой, пологий склон; 7 — бессточные микроозера в скалах; 8 — каскадные проточные микроозера; 9 — транзитные каналы стока с площади водосбора; 10 — озеро — водосбор полигона; 11 — транзитный канал локализованного стока в океан (в пролив Мик); 12 — высшая точка о. Галиндез (58,9 м), скала на вершине полигона на границе ледового купола острова (высочайшая точка острова, топографический знак)

являлось системное изучение распространения металлрезистентных микроорганизмов на островах Аргентинского архипелага и прилегающей к архипелагу прибрежной зоны Антарктического полуострова.

Сто образцов для микробиологических исследований были отобраны на островах Галиндез (Galindez), Барханы (Barchans), Иризар (Irizar), Уругвай (Uruguay), Ялур (Jalour), Питерман (Petermann), Берселот (Berthelot), Крулс (Cruls), Кинг-Джордж (King-Georg), а также на западном побережье Антарктиды, примыкающем к Аргентинскому архипелагу: мыс Расмуссен (Rasmussen) и мыс Туксен (Tuxen) (рис. 2). Исследовали следующие биотопы: почва, трава, мхи, лишайники и озерные илы. Подготовку образцов для посева проводили стандартными методами. Микроорганизмы выделяли из нативных (хранение при 5 °C), замороженных (-20 °C) а также воздушно-сухих (высушенных при 20 °C) образцов. Количество хемоорганотрофных микроорганизмов в исследуемых образцах определяли путем посева последовательных десятикратных разведений образцов (0,1 мл) на агаризованные питательные среды: "Nutrient Agar" (фирма HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.) и мясопептон-

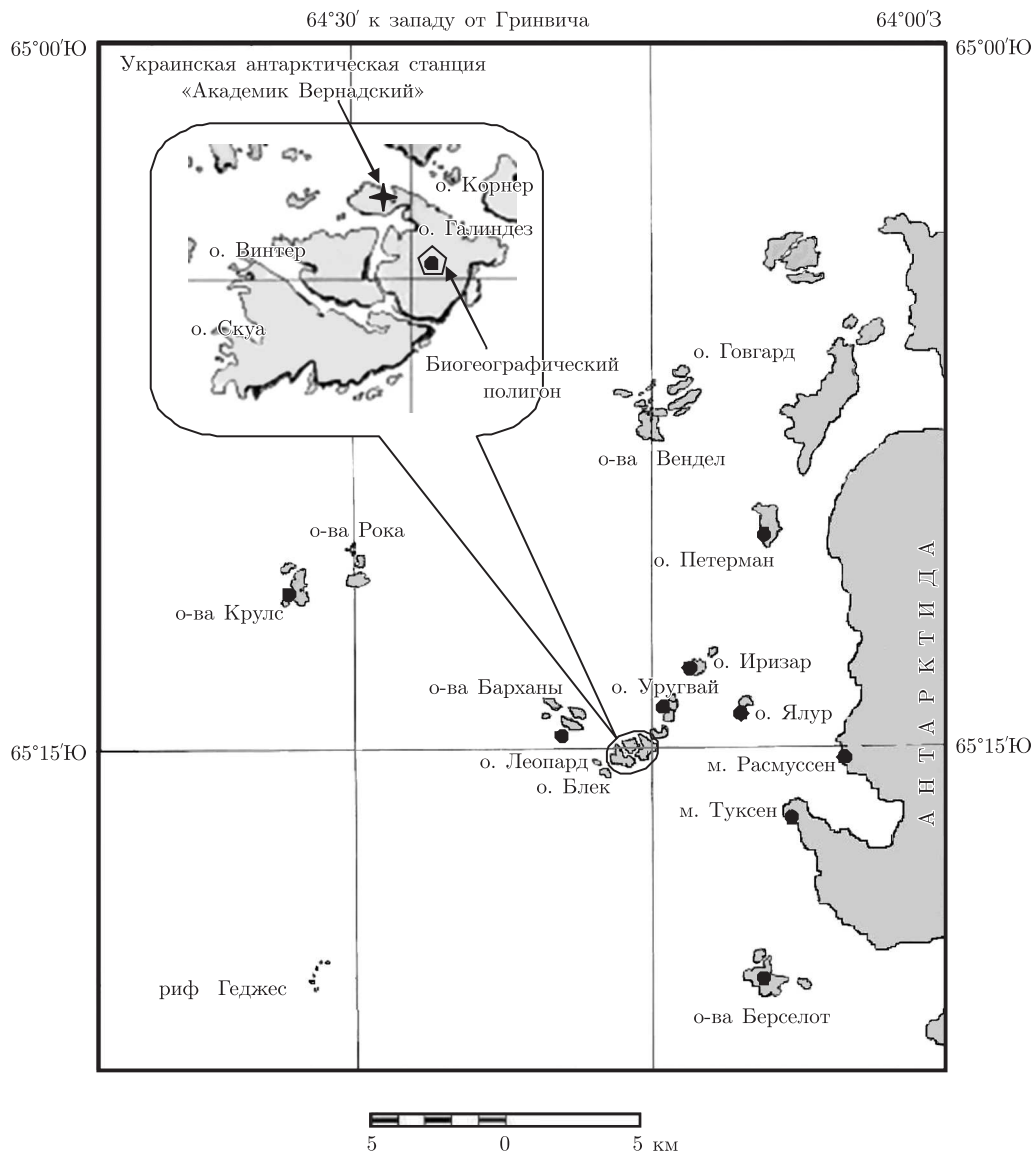


Рис. 2. Карта-схема западного побережья Антарктиды с прилегающими к нему островами. На выноске в левом верхнем углу карты показана часть обследованных островов Аргентинского архипелага, увеличенных в несколько раз, в том числе о. Галиндез, на котором расположен биогеографический полигон

ный агар, а также на те же среды, содержащие 10, 20, 100, 300, 500, 1000 и 1500 мг-иона металла/л среды ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{CrO}_4^{2-}$ ). Микроорганизмы культивировали 5–10 сут при 15–20 °С. Концентрацию металлов в образцах определяли методом атомно-адсорбционной спектроскопии.

Наши эколого-биологические исследования в Антарктике были направлены на выполнение нескольких задач.

**1. Распространение металлрезистентных микроорганизмов в различных регионах Антарктики.** Согласно полученным результатам, на всех исследованных островах Аргентинского архипелага, а также в прибрежной полосе Антарктического полуострова (пролив Пенола (Penola)) имеются микроорганизмы, устойчивые к токсичным тяжелым ме-

таллам: Cr(VI), Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> и Hg<sup>2+</sup> (100–500 мг/л). Более того, из образцов полигона (о. Галиндез) изолировано пять суперрезистентных к меди микроорганизмов, растущих при концентрациях Cu<sup>2+</sup> 800–1500 мг/л. Чтобы подтвердить устойчивость выделенных микроорганизмов к тяжелым металлам, выросшие колонии реизолировали, трижды пересевая на среды с металлами. Вместе с тем нами показано, что некоторые физиологические группы антарктических микроорганизмов чувствительны к действию металлов. Так, например, для облигатных и факультативных метилотрофных бактерий предельно допустимыми оказались концентрации 3–5 мг/л Cr(VI), Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, а при концентрации 10 мг/л этих металлов рост бактерий полностью подавлялся.

Необходимо отметить, что устойчивость антарктических микроорганизмов к токсичным тяжелым металлам является одним из наименее изученных аспектов антарктической микробиологии. Лишь в одной из доступных нам публикаций [12] показано, что в морской воде Антарктической зоны (по меридиану от Индийского полуострова до Антарктиды) к солям кадмия и хрома в концентрации 100 мг/л устойчивы 29 и 16% бактериальных изолятов соответственно. Устойчивость к ртути в концентрации 10 мг/л обнаружена у 68% изолятов. Известно, что предельно допустимые концентрации (ПДК) Cr(VI), Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> для микроорганизмов составляют соответственно 100, 55 и 3 мг/кг почвы [13]. В наших экспериментах доказано, что в Антарктике широко распространены бактерии, устойчивые к концентрациям тяжелых металлов (300–500 мг/л), которые на 1–2 порядка превышают ПДК.

**2. Распространение металлрезистентных микроорганизмов в различных биотопах Антарктики.** В большинстве образцов наземных биотопов (почва, мхи, лишайники, озерный ил, вода, гумус) выявлены микроорганизмы, устойчивые к тяжелым металлам (50–500 мг ионов Cr, Cu, Cd или Hg). Сравнительный анализ показал, что частота встречаемости металлрезистентных микроорганизмов наиболее высокая во мхах и лишайниках (табл. 1). Такая закономерность является необычной. По данным почвенной и геологической микробиологии, металлрезистентные микроорганизмы, как правило, доминируют в почвах, озерных илах и других аналогичных биотопах [13]. Возможно, доминирование металлрезистентных микроорганизмов в лишайниках и мхах определяется их метаболическими особенностями (в частности, способностью аккумулировать экзогенные соединения, в том числе и тяжелые металлы).

**3. Концентрационный диапазон устойчивости антарктических микроорганизмов к металлам.** Для подавляющего большинства коллекционных культур или природных ассоциаций микроорганизмов ингибирующее, бактериостатическое или бактерицидное

Таблица 1. Распределение металлрезистентных микроорганизмов в биотопах островов Аргентинского архипелага и побережья Антарктического полуострова

Биотоп	Количество образцов, в которых обнаружены металлрезистентные микроорганизмы, % по отношению к количеству исследованных биотопов определенного типа								
	Hg <sup>2+*</sup>			Cr(VI)		Cd <sup>2+</sup>			
	10	50	500	10	500	10	50	500	
Почво-субстраты	71	29	0	86	86	80	60	40	
Мхи, лишайники	86	24	10	100	71	71	48	48	
Озера (ил, вода)	70	40	0	100	20	80	60	40	
Гумус	50	0	0	100	50	25	0	0	

\* Концентрация металлов в питательной среде (мг/л).

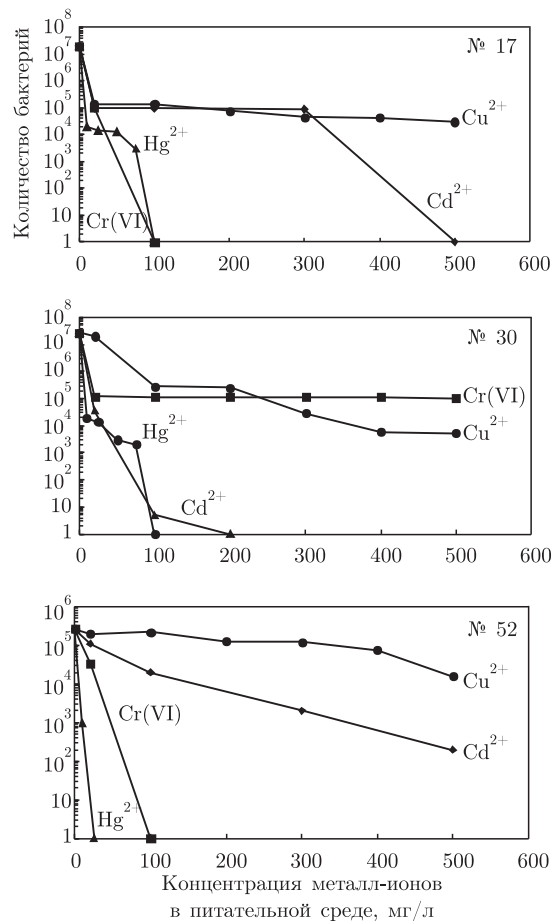


Рис. 3. Количество металлрезистентных микроорганизмов в образцах из Антарктики, выявленное при возрастающих концентрациях ионов тяжелых металлов в используемой питательной среде (2007 г.). Образцы: № 17 — м. Расмуссен (Rasmussen) на западном побережье материка Антарктида; № 30 — о. Питерман (Petermann); № 52 — о. Скуа (Skua)

действие металлов проявляется в концентрационном диапазоне 0,02–2,0 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  [9], 1–10,0 мг/л  $\text{Cd}^{2+}$  [9, 10], 0,1–25,0 мг/л  $\text{Hg}^{2+}$  [8–10]. Имеются только отдельные сообщения о микроорганизмах, устойчивых к более высоким концентрациям токсичных металлов (например, рост *Thiobacillus ferrooxidans* при 40–50 мг/л  $\text{Hg}^{2+}$  [14] и *Chlamydomonas reihardii* при 150 мг/л  $\text{Cd}^{2+}$  [15]). Эти данные значительно отличаются от полученных нами результатов. Так, на рис. 3 представлено содержание металлрезистентных микроорганизмов в нескольких типичных антарктических биотопах. Аналогичные результаты получены при исследовании других островов Аргентинского архипелага и Антарктического полуострова. Как следует из приведенных данных (см. рис. 3), антарктические микроорганизмы проявили устойчивость к концентрациям токсичных металлов ( $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr(VI)}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  и  $\text{Cu}^{2+}$ ), превышающим бактерицидные на несколько порядков. Например, количество микроорганизмов, устойчивых к 500 мг/л  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Cr(VI)}$ , составляло  $2 \cdot 10^5$  клеток/г образца; к 500 мг/л  $\text{Cd}^{2+}$  —  $6 \cdot 10^2$  клеток/г образца. В нескольких образцах (о. Галиндез) обнаружены бактерии, устойчивые к 500 мг/л  $\text{Hg}^{2+}$ , что свидетельствует о высокой устойчивости к ртути некоторых антарктических микроорганизмов. Так, при увеличении концентрации ртути в 50 раз

(от 10 до 500 мг/л) количество жизнеспособных микроорганизмов снижалось на два порядка и составляло  $2 \cdot 10^2$  клеток/г образца.

Таким образом, одним из наиболее значимых результатов является выявление в антарктических биотопах микроорганизмов, которые растут при концентрациях металлов, превышающих на два — три порядка бактерицидные дозы для микроорганизмов. Более того, в ряде случаев отсутствует зависимость между повышением концентрации металла в среде и количеством жизнеспособных клеток. Так, при увеличении концентрации  $Cd^{2+}$  от 20 до 300 мг/л количество жизнеспособных клеток составляет  $2 \cdot 10^5$  клеток/г образца (см. рис. 3, № 17);  $Cu^{2+}$  от 20 до 500 мг/л —  $3 \cdot 10^5$  клеток/г образца (см. рис. 3, № 17 и № 30);  $Cr(VI)$  от 20 до 500 мг/л —  $2 \cdot 10^5$  клеток/г образца (рис. 3, № 30). По-видимому, это обусловлено высокой устойчивостью антарктических микроорганизмов по отношению, по крайней мере, к таким металлам, как  $Cu^{2+}$  и  $Cr(VI)$ . Вместе с тем следует отметить, что общее количество микроорганизмов в образце, снижалось на два порядка в присутствии тяжелых металлов даже при их концентрации 20 мг/л (см. рис. 3). Иными словами, не все антарктические гетеротрофные микроорганизмы устойчивы к металлам.

**4. Существует ли зависимость между количеством металлрезистентных микроорганизмов и содержанием металлов в антарктических биотопах.** Установлено, что в антарктических образцах металлы содержатся в малых концентрациях (табл. 2). Так, например, определены следующие концентрации кадмия, меди и ртути, мг/кг: на о. Галиндез 0,65, 37,17 и 0,024 соответственно; на о. Питерманн — 0,38, 258,9 и 0,021; на мысе Расмунсен — 0,89, 37,17 и 0,011. Аналогичные результаты получены ранее и по содержанию хрома (0,02–2,08 мг/кг). Исключение составляет только медь, концентрация которой в некоторых образцах достигает нескольких десятков, а иногда и сотен мг/кг образца (см. табл. 2). Указанные концентрации металлов несопоставимы с уровнем устойчивости микроорганизмов к тяжелым металлам (500 мг металл-ионов/л) (см. рис. 3). Следовательно, устойчивость

Таблица 2. Содержание металлов в антарктических образцах

Объект исследований	Содержание металла в пробе, мг/кг				
	Cd	Cu	Hg	Pb	Zn
о. Кинг-Джордж	0,45	38,45	0,04	0,30	90,70
о. Барханы	3,61	261,40	0,07	10,20	87,12
о. Иризар	10,43	425,50	0,01	2,11	1572,80
о. Крулс	5,21	558,11	0,01	2,02	228,03
о. Галиндез, полигон	0,65	39,76	0,02	2,81	79,43
о. Галиндез, полигон	0,65	122,21	0,01	0,49	77,50
о. Галиндез, полигон	0,48	16,92	0,01	0,92	110,93
о. Ялур	5,44	290,91	0,03	1,34	213,33
о. Питерманн	0,38	258,92	0,02	0,05	225,80
о. Барханы	3,18	160,41	0,20	0,52	491,86
м. Расмунсен	0,89	37,17	0,01	1,05	87,32
м. Туксен	0,17	16,29	0,01	0,39	122,22
о. Уругвай	3,78	95,23	0,01	1,10	140,98
о. Берселот	18,8	228,70	0,06	1,35	551,18

Примечание. Содержание тяжелых металлов в образцах определяли методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии с использованием электротермической атомизации (атомно-абсорбционный спектрофотометр С-115 М1 с комплексом “Графит-5М”). Разложение образцов для анализа на этом комплексе проводилось в соответствии с нормативными документами. Содержание ртути определяли методом “холодного пара” на приборе “Юлия-5ПК”, хрома — на приборе SpectrAA 220 G (фирма “Varian”, Австралия).

антарктических микроорганизмов к сверхвысоким концентрациям токсичных тяжелых металлов не связана с их содержанием в биотопах в исследованной зоне Антарктики. Можно предположить, что устойчивость микроорганизмов к металлам в исследованном регионе сформировалась еще в период неотектонической активности при поступлении в биосферу металлов с магматическими и гидротермальными выбросами и сохранилась до настоящего времени.

Таким образом, нами впервые показано, что устойчивость хемоорганотрофных микроорганизмов к высоким концентрациям токсичных тяжелых металлов является распространенным явлением в западной Антарктике. Уникальность феномена заключается в одновременном сочетании трех показателей:

способность роста при бактерицидных концентрациях токсичных тяжелых металлов (100–500 мг/л  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cr(VI)}$  и  $\text{Cd}^{2+}$ );

высокое количество металлрезистентных микроорганизмов ( $10^4$ – $10^5$  клеток/г образца);

широкое распространение металлрезистентных микроорганизмов во всех наземных биотопах Антарктиды (почва, мхи, лишайники, гумус, озерный ил и вода).

*Авторы выражают признательность акад. НАН Украины П. Ф. Гожику и директору Национального антарктического научного центра, канд. техн. наук В. А. Литвинову за консультативную помощь и экспертную оценку работы, В. Куренкову (ЗАО ЕСОММ) за подготовку стереометрической 3D-модели полигона на о. Галиндез, а также проф., д-ру биол. наук Э. З. Самышеву (Институт биологии южных морей НАН Украины) за организацию и выполнение геохимических анализов образцов из Антарктики.*

1. McLean A. L. Bacteriological and other researches Australian Antarctic Expedition, 1911–1914 // Sci. Rep. – 1919. – No 4. – P. 13–19.
2. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Под ред. Д. Кашнера. – Москва: Мир, 1981. – 519 с.
3. Sjolting S., Cowan D. A. High 16S rDNA bacterial diversity in glacial meltwater lake sediment, Bratina Island, Antarctica // Extremophiles. – 2003. – 7, No 4. – P. 275–282.
4. Mosier A. C., Murray A. E., Fritsen C. H. Microbiota within the perennial ice cover of Lake Vida, Antarctica // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – 59, No 2. – P. 274–288.
5. Van Trappen S., Vandecandelaere I., Mergaert J., Swings J. Algoriphagus antarcticus sp. nov., a novel psychrophile from microbial mats in Antarctic lakes // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2004. – 54, No 6. – P. 1969–1973.
6. Shivaji S., Reddy G. S., Suresh K. et al. Psychrobacter vallis sp. nov. and Psychrobacter aquaticus sp. nov., from Antarctica // Ibid. – 2005. – 55, No 2. – P. 757–762.
7. Sattley W. M., Madigan M. T. Isolation, characterization, and ecology of cold-active, chemolithotrophic, sulfur-oxidizing bacteria from perennially ice-covered Lake Fryxell, Antarctica // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – 72, No 8. – P. 5562–5568.
8. 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.
9. 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.
10. Langenbach T., Nascimento A., Sarpa M. Influence of heavy metals on nitrogen fixation and growth of *Azospirillum* strains // Rev. latinoamer. microbiol. – 1988. – 30, No 2. – P. 139–142.
11. Таширеві О. Б., Таширеві Г. О., Войничський В. М. Характеристика мікробних ценозів антарктичних ґрунтосубстратів // Вісн. КНУ ім. Тараса Шевченка. – 2004. – № 43. – С. 107–109.
12. 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.
13. Андреев К. І., Іутинська Г. О., Антупчук А. Ф. та ін. Функціонування мікробних ценозів ґрунту в умовах антропогенного навантаження. – Київ: Обереги, 2001. – 238 с.

14. Siegel R. J., Buckingham N. J., Tames G. M. et al. Zinc accumulation in soil bacteria // Abstr. 99th Gen. Meet. Amer. Soc. Microbiol., Chicago III, May 30 – June 3, 1999. – Washington, D. C., 1999. – P. 474.
15. Frenay J., Remacle J., Crine M. et al. Microbial recovery of metals from low grade materials // Recycle and Secondary Recovery Metals: Proc. Intern. Symp. and Fall Extr. and Process Met. Meet., Fort Lauderdale, Fla, Dec. 1–4, 1985. – Warrendale, Pa, 1985. – P. 275–288.

*Институт микробиологии и вирусологии  
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев  
Национальный антарктический научный  
центр МОН Украины, Киев  
Институт геологических наук НАН Украины, Киев  
Институт биологии южных морей  
им. А. О. Ковалевского НАН Украины, Севастополь  
ЗАО ЕСОММ, Киев*

*Поступило в редакцию 06.07.2007*