

7. Загороднюк І. В. Закономірності прояву географічної мінливості у двійникових комплексах ссавців (на прикладі роду *Sylvaemus*) // Доп. НАН України. – 2005. – № 9. – С. 171–180.
8. Баскевич М. И., Ожюлова Н. М., Балакирев Е. А. и др. К вопросу о генетической маркировке и распространении видов-двойников обыкновенной полевки *Microtus arvalis* s. l. (Rodentia, Arvicolidae) в Центральном Черноземье и Предкавказье // Изучение и сохранение природных экосистем заповедников лесостепной зоны: Материалы междунар. науч.-практич. конф., посвященной 70-летию Центрально-черноземного заповедника. – Курск, 2005. – С. 281–284.
9. Быстракова Н. В., Ермаков О. А., Титов С. В. Хромосомный маршрут на Среднем Дону // Вестн. ВОГиС. – 2005. – 9, № 1. – С. 67–69.
10. Тихонов И. А., Тихонова Г. Н., Полякова Л. В. Виды-двойники *Microtus arvalis* и *Microtus rossiaemerdionalis* на северо-востоке Московской области // Зоол. журн. – 1998. – 77, № 1. – С. 95–100.
11. Тихонова Г. Н., Тихонов И. А., Богомолов П. Л., Полякова Л. В. К экологии видов-двойников *Microtus arvalis* Pallas, 1779 и *Microtus rossiaemerdionalis* Ognev, 1924 (Rodentia, Cricetidae) в Цимлянских песках // Изв. АН. Сер. биол. – 1999. – № 3. – С. 309–318.
12. Kratochvíl J. Ein morphologisches Unterscheidungskriterium der arten *Microtus epiroticus* und *M. arvalis* (Arvicolidae, Rodentia) // Folia zool. (Brno). – 1982. – 31, No 2. – S. 97–111.
13. Zagorodnyuk I., Masing M., Peskov V. Sibling-species of common voles in Estonia // Eesti loodus (Tartu). – 1991. – No 11. – P. 674–678.
14. Песков В. Н. Сравнительное изучение морфофункциональной конституции черепа в систематике млекопитающих // Вестн. зоологии. – 1990. – № 4. – С. 58–64.
15. Hutchinson G. E. Homage to Santa Rosalia or Why are there so many kinds of animals? // Amer. Natur. – 1954. – 93, No 870. – P. 372–377.

Інститут зоології ім. І. І. Шмальгаузена
НАН України, Київ

Надійшло до редакції 30.08.2006

УДК 579.841.1:615.015.8+546.3

© 2007

О. Д. Янева, Г. Ф. Смирнова,
академік НАН України В. С. Підгорський

Індукція стійкості до іонів міді і кадмію мультирезистентних штамів роду *Pseudomonas*

Induction of the resistance to copper and cadmium ions in three multiresistant Pseudomonas strains has been studied. Pre-treatment of the strains with low concentrations of cadmium and copper resulted in the increased metal tolerance in strains A03 and C25a, i. e. a shorter mean generation time compared to the control. No cross-induction was observed for any strain. The protein synthesis de novo is essential for the copper resistance in the studied strains, while the cadmium resistance is determined by other factors.

Швидка індустріалізація в ХХ ст. призвела до підвищеного надходження в навколишнє середовище різноманітних хімічних речовин. Важкі метали належать до класу одних з найбільш небезпечних та розповсюджених в природі полутантів [1]. Відомо, що мікроорганізми здатні пристосовуватися до наявності іонів важких металів. В останні роки інтерес дослідників до взаємодії між мікроорганізмами та іонами металів значно підвищився. Більшість важких металів високотоксичні для живих організмів навіть у невисоких концентраціях.

Такі метали, як мідь, цинк, кобальт та деякі інші, виконують каталітичні функції в клітині, але за високих концентрацій стають токсичні [2].

Металостійкі мікроорганізми характеризуються декількома відмінними механізмами пристосування до токсичних металів. Деякі бактерії мають специфічні насоси-канали, що “виштовхують” двовалентні катіони крізь мембрану [3]. Інші шляхи детоксикації важких металів мікроорганізмами включають зв’язування іонів до різних сайтів на поверхні клітини, секвестрацію шляхом внутрішньоклітинного “захоплення” білками або іншими полімерами, преципітацію іонів металів у вигляді фосфатів, сульфідів та карбонатів [4]. Нарешті, деякі бактерії мають специфічні ферменти, що змінюють валентність іонів металів [5].

Під впливом низьких концентрацій токсикантів може підвищитись стійкість мікроорганізму до того ж самого (індукція) чи іншого (крос-індукція) токсиканту [6–8]. У деяких випадках індуктивна адаптивна відповідь на стресові фактори у мікроорганізмів потребує синтезу білків *de novo* [9]. Так, іони кадмію індукували захисну адаптивну відповідь не тільки проти дії іонів важких металів [8], а й проти пероксиду водню [10].

У даному повідомленні наведено результати дослідження індукції резистентності до іонів кадмію та міді і ролі синтезу білків *de novo* в механізмі стійкості до важких металів мультирезистентних штамів роду *Pseudomonas*.

Об’єктом дослідження були три мультирезистентних штами роду *Pseudomonas*, ізольовані з різних природних джерел [11] (табл. 1). Штами вирощували на мінеральному середовищі (МС), що містило, г/л: NaH_2PO_4 – 0,5; NH_4NO_3 – 0,5; CaCl_2 – 0,1; дріжджовий екстракт – 0,5; цитрат натрію – 10; агар – 15.

Щоб визначити, чи можлива індукція резистентності до іонів важких металів у мультирезистентних штамів роду *Pseudomonas* при дії низьких концентрацій міді і кадмію, штами А17, А03 та С25а вирощували протягом 12 год у рідкому МС з додаванням 0,1 г/л Cu^{2+} чи 0,05 г/л Cd^{2+} (індуковані клітини) або в тому ж самому середовищі без металу (неіндуковані клітини). 1 мл інокуляту з індукованих та неіндукованих культур переносили в середовище МС з 1 г/л Cu^{2+} (Cu-індуковані культури) чи 0,5 г/л Cd^{2+} (Cd-індуковані культури). Для визначення крос-індукції штами, що піддавали дії низьких концентрацій міді, переносили в середовище з 0,5 г/л Cd^{2+} , а культури, індуковані кадмієм, вирощували в середовищі з 1 г/л Cu^{2+} . Ріст культур визначали турбідиметрично при 540 нм кожні 2 год.

Для визначення ролі синтезу білків *de novo* в резистентності досліджуваних штамів бактерії до важких металів їх вирощували в рідкому МС, що містило 1 г/л Cu^{2+} чи 0,5 г/л Cd^{2+} , куди додавали 100 мг/л хлорамфеніколу (інгібітор синтезу білка у бактерій) безпосередньо на початку експерименту або на 6-й год культивування. За ростом культур спостерігали протягом доби.

Індукцію стійкості до іонів міді та кадмію мультирезистентних штамів *Pseudomonas* досліджували шляхом попередньої інкубації штамів у середовищі з низькими концентраціями відповідних металів. За контроль вважали ріст неіндукованих культур у присутності іонів міді чи кадмію. Характер відповіді росту штамів А17, А03 та С25а на індукцію низьки-

Таблиця 1. Мультирезистентні штами роду *Pseudomonas*

Штам	Місце виділення	Систематичне положення
A17	Гній	<i>Pseudomonas</i> sp.
A03	Польовий ґрунт	<i>Pseudomonas</i> sp.
C25a	Ґрунт з території машинобудівного заводу	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

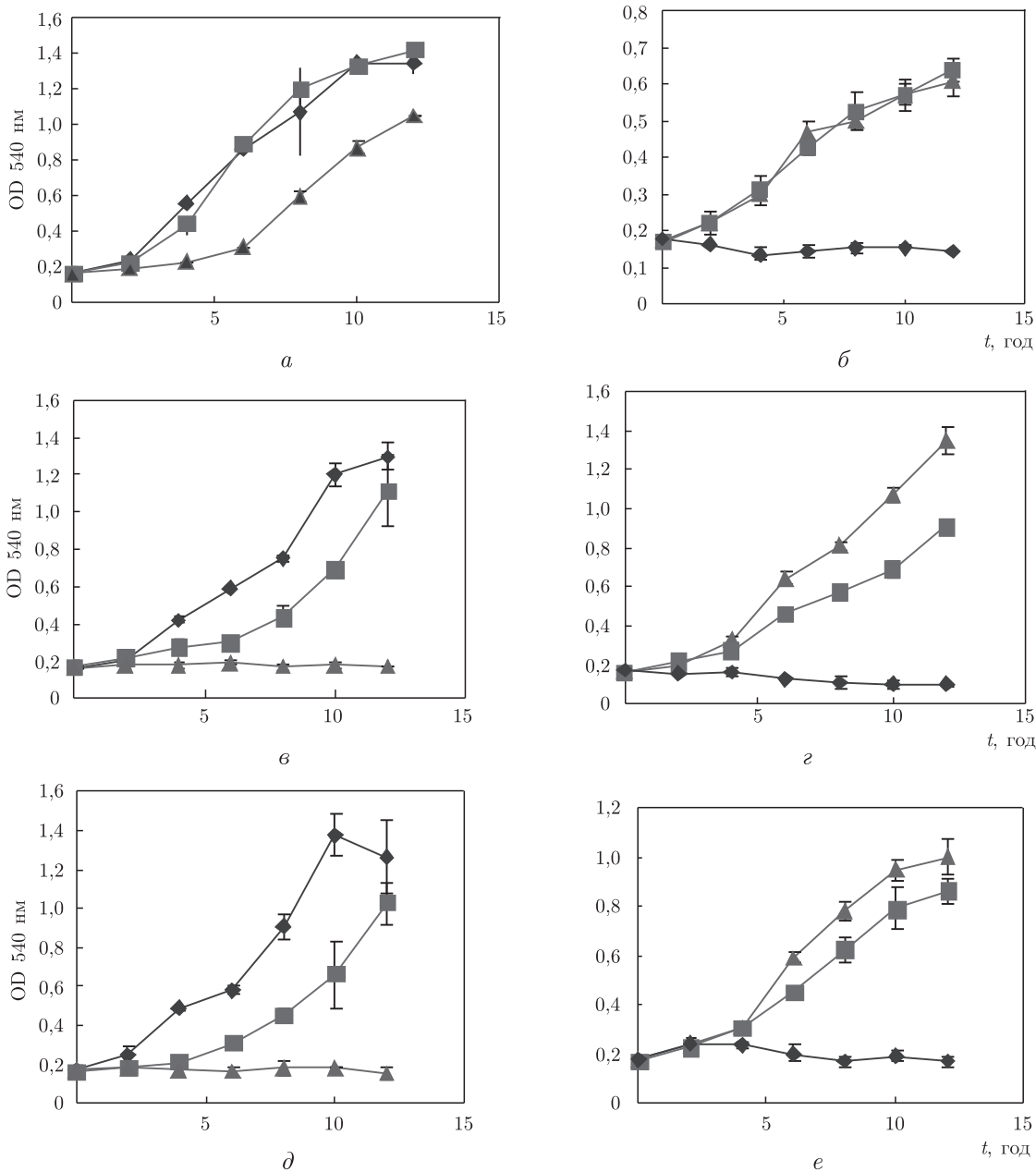


Рис. 1. Вплив іонів міді та кадмію на ріст мультирезистентних штамів роду *Pseudomonas* A17 (а, б), A03 (в, г) і C25а (д, е) за індукованих та неіндукованих умов. Штами вирощували в присутності 0,1 г/л Cu²⁺ (◆), 0,05 г/л Cd²⁺ (▲) та в середовищі без металу (■) з подальшим пересівом у середовище, що містило 1 г/л Cu²⁺ або 0,5 г/л Cd²⁺

ми концентраціями міді та кадмію був специфічним для кожного штаму (рис. 1). Індукція іонами міді чи кадмію не впливала істотно на швидкість росту A17 у середовищі з тим самим металом. При рості індукованих міддю клітин штаму A03 спостерігали лаг-фазу в 2 год порівняно з 6 год у контролі; при цьому тривалість генерації становила 4,05 год для Cu-індукованої культури та 4,348 год для неіндукованих клітин (див. рис. 1, в). В інших випадках помітної різниці між тривалістю лаг-фази за індукованих та неіндукованих

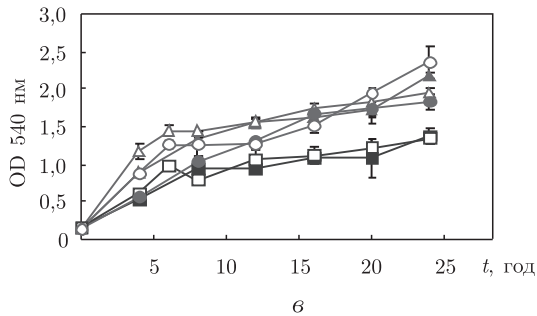
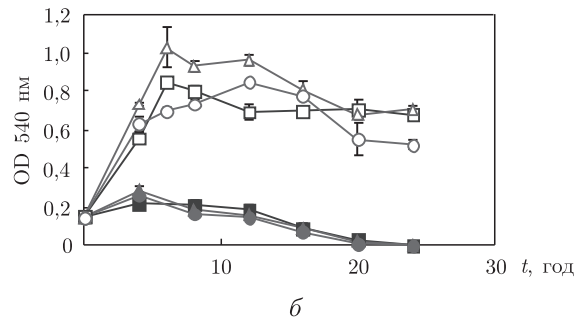
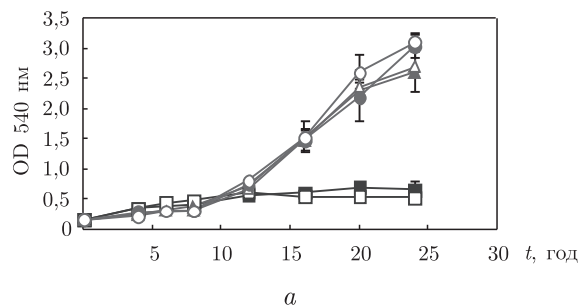


Рис. 2. Вплив хлорамфеніколу на ріст штамів A17 (□), A03 (△) та C25a (○): у середовищі з кадмієм (а), міддю (б) та без металу (в). Хлорамфенікол додавали безпосередньо на початку експерименту (■, ▲, ●) та на 6-й год культивування (□, △, ○)

умов не виявлено. Скорочення тривалості генерації спостерігалось для металоіндукованих клітин штаму C25a: тривалість генерації Cu-індукованих клітин становила 4,132 год порівняно з 4,56 год в контролі, а Cd-індукованих клітин — 4,85 год порівняно з 5,12 год в контролі (див. рис. 1, з). Ріст штаму C25a при індукції іонами міді та кадмію характеризувався скороченою тривалістю генерації: 4,15 год у Cd-індукованих клітинах порівняно з 4,6 год у контролі та 4,84 год у Cu-індукованих клітинах порівняно з 5,1 год у контролі (див. рис. 1, д, е). Крос-індукції (індукція стійкості до іонів міді шляхом попередньої дії низьких концентрацій кадмію чи навпаки) не виявлено для жодного штаму; навпаки, повне пригнічення росту спостерігалось в усіх випадках, за винятком одного, коли ріст Cd-індукованих клітин штаму A17 у присутності іонів міді характеризувався подовженою тривалістю генерації (4,545 год) у порівнянні з контролем (3,8 год).

Індукція стійкості до іонів важких металів була показана для деяких мікроорганізмів, включаючи *Pseudomonas putida* [12], *Bacillus* sp. [13], *E. coli* [7] та *Xanthomonas campestris* [8]. Попереднє культивування штамів A03 та C25a у присутності низьких концентрацій іонів міді та кадмію сприяло росту індукованих клітин у середовищі з 1 г/л Cu^{2+} чи 0,5 г/л Cd^{2+} , такі ж результати отримані для *Bacillus thuriangiensis* [14] та *Bacillus* sp. [13]. У той самий час ріст індукованих клітин штаму A17 не відрізнявся значно від контролю. Крос-індукції не виявлено для жодного з штамів, подібну картину спостерігали у Zn-індукованих клітин *Xanthomonas campestris* [8], що не характеризувався підвищеною стійкістю до кадмію; інші дані свідчать про індукцію стійкості до кадмію іонами марганцю у *B. thuriangiensis* [14] та до цинку іонами кадмію у *X. campestris* [8]. Ці результати можуть свідчити про різні фізіологічні механізми, що зумовлюють індукцію стійкості до іонів кадмію та міді у мультирезистентних штамів роду *Pseudomonas*.

У деяких випадках індукована відповідь мікроорганізмів на стресові фактори потребує синтезу білків de novo. При вирощуванні мультирезистентних штамів A17, A03 та C25a в середовищі з кадмієм додавання 100 мг/л хлорамфеніколу на початку культивування або на 6-й год від початку експерименту ніяким чином не впливало на ріст зазначених

штамів (рис. 2, а). У той самий час додавання хлорамфеніколу в середовище, що містило 1 г/л Cu^{2+} , на початку культивування призводило до пригнічення росту штамів А17, А03 та С25а, а додавання антибіотику на 6-й год культивування спричиняло сповільнення та зупинку росту цих штамів (див. рис. 2, б). Ріст штамів А17, А03 та С25а у рідкому середовищі без металу, що містило 100 мг/л хлорамфеніколу, значно не відрізнявся від росту штамів у тому ж середовищі без хлорамфеніколу (див. рис. 2, в).

Наші дані свідчать про необхідність синтезу білків *de novo* для росту досліджуваних штамів у присутності іонів міді, у той час як у механізмі стійкості штамів А17, А03 та С25а до іонів кадмію синтез білків *de novo* значної ролі не відіграє. Ванjerdkij із співавторами спостерігали подібне явище, тобто повне пригнічення індукованої іонами кадмію стійкості до кадмію та цинку у *Xanthomonas campestris* при попередній дії на клітини хлорамфеніколу [8]. Вірогідно, стійкість досліджених штамів до іонів міді та кадмію визначається іншими механізмами.

1. *Heavy metals in waste* // Final report European Commission DG ENV. E3 Project ENV. E3/ETU/2000/058. – 2002. – 86 p.
2. Ehrlich H. L. Microbes and metals // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1997. – **48**. – P. 687–692.
3. Mergeay M., Monchy S., Vallaeys T. et al. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes // FEMS Microbiol. Rev. – 2003. – **27**. – P. 385–410.
4. Bruins M. R., Kapil S., Oehme F. W. Microbial resistance to metals in the environment // Ecotoxicol. Environ. Safety. – 2000. – **45**. – P. 198–207.
5. Pattanapipitapaisal P., Brown N. L., Macaskie L. E. Chromate reduction and 16S rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2001. – **57**. – P. 257–261.
6. Jaysankar D., Ramaiah N., Mesquita A., Verlekar X. N. Tolerance to various toxicants by marine bacteria highly resistant to mercury // Mar. Biotechnol. – 2003. – **5**. – P. 185–193.
7. Brocklehurst K. R., Morby A. P. Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology // Microbiology. – 2000. – **146**. – P. 2277–2282.
8. Banjerdkij P., Vattanaviboon P., Mongkolsuk S. Cadmium-induced adaptive resistance and cross-resistance to zinc in *Xanthomonas campestris* // Curr. Microbiol. – 2003. – **47**. – P. 260–262.
9. Mongkolsuk S., Vattanaviboon P., Praituan W. Induced adaptive and cross-protection responses against oxidative stress killing in a bacterial phytopathogen, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* // FEMS Microbiol. Lett. – 1997. – **146**. – P. 217–221.
10. Banjerdkij P., Vattanaviboon P., Mongkolsuk S. Exposure to cadmium elevates expression of genes in the OxyR and OhrR regulons and induces cross-resistance to peroxide killing treatment in *Xanthomonas campestris* // Appl. Environ. Microbiol. – 2005. – **71**, No 4. – P. 1843–1849.
11. Янева О. Д., Смирнова Г. Ф., Підгорський В. С. Резистентність до антибіотиків і важких металів деяких грамнегативних бактерій // Вісн. Одес. нац. ун-ту. Сер. біол. – 2005. – **10**, № 7. – С. 96–105.
12. Sharma P. K., Balkwill D. L., Frenkel A., Vairavamurthy M. A. A new *Klebsiella planticola* strain (Cd – 1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide // Appl. Environ. Microbiol. – 2000. – **66**, No 7. – P. 3083–3087.
13. Llanos J., Capasso C., Parisi E. et al. Susceptibility to heavy metals and cadmium accumulation in aerobic and anaerobic thermophilic microorganisms isolated from deep-sea hydrothermal vents // Curr. Microbiol. – 2000. – **41**. – P. 201–205.
14. El-Helow E. R., Sabry S. A., Amer R. M. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuriangiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations // Biometals. – 2000. – **13**. – P. 273–280.