

УДК [582.282.23:57.017.3]:504.054

ВЫЯВЛЕНИЕ АДАПТИВНОСТИ ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ К СОЛЯМ ТЯЖЁЛЫХ МЕТАЛЛОВ И РАДИОНУКЛИДОВ*

© 2020 г. **В. П. Степанова**, А. В. Суслов, И. Н. Сулова,
Е. А. Суханова, Б. Ф. Яровой, В. Н. Вербенко

Петербургский институт ядерной физики имени Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Гатчина, Российская Федерация
E-mail: verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

Поступила в редакцию 28.11.2019; после доработки 28.12.2019;
принята к публикации 21.09.2020; опубликована онлайн 30.09.2020.

Изучена способность природных штаммов дрожжей расти в условиях высоких концентраций солей тяжёлых металлов и радионуклидов. Свыше 500 штаммов проверены на устойчивость к солям тяжёлых металлов (U, Cs, Sr, Ni, Ag, Cu, Cd, Co) и к повышенной температуре (t) (+37...+52 °C). Бóльшая часть изученных штаммов оказалась устойчива к одному или нескольким селективным факторам. С максимальной частотой — 36 и 26 % — возникают комбинации (t , Cd, Cu, Co) и (Cd, Cu, Co) соответственно. Установлена способность отобранных штаммов расти в условиях высокой концентрации радиоактивных изотопов Cs и Ni и связывать их с высокой эффективностью. Полученные результаты показали потенциальную возможность использования библиотеки природных микроорганизмов для осаждения как радионуклидов, так и тяжёлых металлов (основных загрязнителей природных и техногенных объектов), а также возможность применения выделенных и изученных штаммов микроорганизмов для концентрирования металлов из малообогатённых руд или из отходов добывающей промышленности. Обнаруженное разнообразие фенотипов свидетельствует о том, что существует, скорее всего, несколько механизмов устойчивости к высоким концентрациям тяжёлых металлов.

Ключевые слова: природные штаммы дрожжей, адаптация, тяжёлые металлы, радиоизотопы ^{137}Cs и ^{63}Ni , биоремедиация

Функционирование промышленных предприятий, особенно металлургических, горнорудных и ядерных, неизбежно приводит к сбросу загрязнителей в окружающую среду и к ухудшению состояния экосистем при накоплении в них тяжёлых металлов [24]. По этой причине следует уделять всё большее внимание потенциальной опасности для здоровья людей, связанной с наличием в окружающей среде этого типа загрязнителей. Для их удаления необходимо использовать экономичные и эффективные методы, и это стимулирует развитие новых технологий [24]. Широкое применение в обработке промышленных стоков нашли осаждение, ионообмен и электрохимические и/или мембранные процессы. Между тем их использование в некоторых случаях невозможно по техническим или экономическим причинам [12]. Поиск новых технологий удаления токсичных металлов из жидких отходов приводит к методам биосорбции, основой которой является наличие у различных биосорбентов, включая микроорганизмы, способности связывать металлы. Микроорганизмы в окружающей среде играют основную роль как в обороте элементов

* Материалы статьи были представлены на Чтениях памяти академика Г. Г. Поликарпова «Радиоэкология: успехи и перспективы» (Севастополь, ИнБИОМ, 2019 г.).

в природе, так и в формировании осадочных пород. Кроме того, они влияют на геохимические свойства грунтовой воды за счёт модификации и транспорта органических и неорганических загрязнителей [11]. При этом если органические загрязнители могут быть разложены до CO_2 и воды [17 ; 25], то радионуклиды — только иммобилизованы. При разработке методов биоремедиации следует учитывать, что при низких концентрациях многие металлы могут играть значительную роль в метаболических процессах, однако при высоком содержании они часто становятся токсичными.

Биосорбция считается способом, с помощью которого можно как удалять ядовитые металлы из растворов, так и получать драгоценные металлы. Таким образом, для связывания тяжёлых металлов, включая радионуклиды, необходим поиск микроорганизмов, не только селективно извлекающих металлы, но и остающихся жизнеспособными при наличии радиоактивного загрязнения с уровнем объёмной активности до $370 \text{ кБк}\cdot\text{мл}^{-1}$, как в технологических отходах [8]. Можно предположить, что микроорганизмы, имеющие подобные свойства, обитают в первую очередь в природной и техногенной средах с экстремальными для своего существования условиями, таких как полуостров Камчатка и острова Курильской гряды, а также в технологических водах реакторов, в системах водоочистки различных промышленных производств и в озёрах-накопителях жидких технологических отходов радиационно-химических производств.

Цель работы — изучить возможность использования коллекции микроорганизмов, собранных сотрудниками Петербургского института ядерной физики имени Б. П. Константинова (далее — ПИЯФ) на Камчатке и Курильских островах, для сорбции различных тяжёлых металлов и радионуклидов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены с использованием коллекции микроорганизмов (свыше 2000 штаммов дрожжей и дрожжеподобных грибов), собранной сотрудниками ПИЯФ в ходе экспедиций в районы с геотермальной активностью (п-ов Камчатка и о-ва Кунашир и Итуруп Курильской гряды). Исходным субстратом для выделения микроорганизмов служили живые растения (цветы, плоды, кора, листья, корни) и их опавшие части, а также почва и насекомые. Образцы собирали на склонах вулканов, в долинах вдоль рек и ручьёв, рядом с гидротермальными выбросами и внутри активных зон.

Для выявления природных штаммов из законсервированного материала фильтры переносили на чашки Петри с плотной обогащённой средой Д (YPD; 2%-ная глюкоза; 1%-ный пептон; 0,5%-ный дрожжевой экстракт), откуда, по мере роста колоний при комнатной температуре, клетки пересеивали опять на плотную Д-среду истощающим штрихом. Чашки с колониями дрожжеподобных грибов просматривали под бинокулярной лупой; их идентифицировали по морфологическим признакам: цвету, форме, размеру, характеру поверхности. Таксономическая идентификация проведена по методике, изложенной в определителях [7 ; 13]. Кроме видового названия, указаны номера по каталогу коллекции (приведены в скобках). Основу коллекции составляют простейшие одноклеточные грибы, которые способны существовать в среде, содержащей достаточно высокие уровни ионов практически всех металлов.

Чувствительность штаммов грибов к высоким концентрациям урана определяли с помощью метода реплик [2] на чашках с агаром и питательной Д-средой, содержащей 10, 120 и $150 \text{ ммоль}\cdot\text{л}^{-1} \text{ }^{238}\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2$.

Отбор штаммов, устойчивых к высоким концентрациям Ni, проводили на чашках с градиентом концентрации хлористого никеля. В стерильные чашки Петри наливали питательный агар и оставляли остывать под наклоном. После остывания наливали агар с исследуемым металлом

(в данном случае — Ni с концентрацией 10 ммоль·л⁻¹). Для оценки эффективности связывания никеля отобранными штаммами в дальнейшем использовали радиоактивный изотоп ⁶³Ni.

Селекцию штаммов грибов, способных расти в присутствии ионов Cs⁺, проводили при различном содержании стабильного цезия в форме хлорида (CsCl). Для этого готовили раствор 1 моль·л⁻¹ CsCl и добавляли его в питательную Д-среду с агаром таким образом, чтобы конечная концентрация цезия составляла 10, 50 или 100 ммоль·л⁻¹. Культуры клеток наносили на поверхность агара истощающим штрихом, чашки помещали в термостат при +30 °С. Из посеянных штаммов отбирали лишь наиболее хорошо растущие при максимальном содержании ионов Cs⁺. Кроме того, из отобранных штаммов в работе использовали только те, которые могут расти на чашках, содержащих CsCl и SrCl₂ в концентрациях 100 ммоль·л⁻¹, т. е. обладают толерантностью к нескольким металлам. Определение устойчивости проводили с помощью метода реплик.

Для определения чувствительности отобранных штаммов к инактивирующему действию гамма-излучения их облучали на установке «Исследователь» (⁶⁰Co) при мощности дозы 100 Гр·мин.⁻¹.

Для исследования способности свободных клеток связывать радиоактивный ¹³⁷Cs или ⁶³Ni клетки из культуры, выращенные до стационарной фазы в Д-среде, инокулировали в свежую Д-среду в соотношении 1:100 и добавляли ¹³⁷Cs до 110 кБк·мл⁻¹ или ⁶³Ni до 111 кБк·мл⁻¹. По мере роста из каждой культуры отбирали параллельно две равные по объёму (0,5 мл) пробы, переносили их в пробирки Эппендорфа объёмом 1,5 мл и осаждали при 10 000 об·мин.⁻¹ в течение 10 минут.

Количество ¹³⁷Cs или ⁶³Ni в осадке и надосадочной жидкости определяли на счётчике Beckman LS 6500 (США).

Эффективность связывания радиоактивных изотопов цезия или никеля клетками определяли в процентах по отношению активности, содержащейся в осадке, к полной активности пробы.

Оптимизацию эффективности связывания никеля клетками проводили, меняя концентрацию глюкозы в ростовой среде.

Для каждого штамма сделали не менее трёх независимых экспериментов, по которым определили среднее значение (см. рис. 3, рис. 4, рис. 5 и табл. 1) и среднюю стандартную ошибку малой выборки (табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Из собранного материала выделено и микробиологически очищено 2107 штаммов. Около 100 штаммов прошли идентификацию. Среди них оказались представители 21 вида: *Candida haemulonii*, *Candida sake*, *Candida sorbosivorans*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus hungaricus*, *Cryptococcus laurentii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pichia farinosa*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Phaffia rhodozyma*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii*, *Tremella foliacea*, *Sporobolomyces roseus*, *Metschnikowia reukaufii*, *Sporidiobolus salmonicolor* и по одному из родов *Bullera* и *Trichosporon*. Идентифицированы представители трёх классов: аскомицеты, базидиомицеты и несовершенные дрожжи. Наиболее часто встречаются виды *Cryptococcus albidus* (20 штаммов) и *Debaryomyces hansenii* (7 штаммов). Есть кандидаты на новые виды. Около 100 линий дрожжей выделены из обычных условий обитания на Сахалине. Выявленное разнообразие видов в основном соответствует данным, которые получены при изучении видового состава дрожжей, обитающих в северных широтах Западной Сибири и Аляски [21].

Более 500 штаммов проверены на устойчивость к солям тяжёлых металлов, таких как U, Cs, Sr, Ni, Ar, Cu, Cd, Co, и к повышенной температуре (t) (+37...+52 °С). Тестирование чувствительности штаммов к солям урана показано на рис. 1. Чувствительные к низким концентрациям урана

штаммы в дальнейшем не использовали и не идентифицировали. Наибольшую устойчивость продемонстрировали представители рода *Rhodotorula*. Клоны *Rhodotorula minuta* (KI-20-1a) оказались также устойчивы к никелю. Из проверенных штаммов 72 % оказались устойчивы к одному или более селективным факторам. С наибольшей частотой — 36 и 26 % — возникали комбинации (t, Cd, Cu, Co) и (Cd, Cu, Co) соответственно.



Рис. 1. Тестирование чувствительности штаммов дрожжей к солям урана ($10 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$):

- 1 — неидентифицированный штамм;
- 2 — штамм *Rhodotorula mucilaginosa* (KI-20-4);
- 3–5 — неидентифицированные штаммы;
- 6 — штамм *Phaffia rhodozyma* (KI-54-1);
- 7–11 — неидентифицированные штаммы;
- 12 — штамм *Candida sake* (KI-38-2);
- 13–17 — неидентифицированные штаммы;
- 18–19 — отдельные клоны штамма *Candida haemulonii* (KII-29-2a);
- 20–24 — штаммы *Rhodotorula minuta* (KI-20-1a);
- 25 — клон штамма *Candida haemulonii* (KII-29-2a)

Fig. 1. Testing yeast strains sensitivity to uranium salts ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$):

- 1 – unidentified strain;
- 2 – *Rhodotorula mucilaginosa* (KI-20-4) strain;
- 3–5 – unidentified strains;
- 6 – *Phaffia rhodozyma* (KI-54-1) strain;
- 7–11 – unidentified strains;
- 12 – *Candida sake* (KI-38-2) strain;
- 13–17 – unidentified strains;
- 18–19 – separate clones of *Candida haemulonii* (KII-29-2a) strain;
- 20–24 – *Rhodotorula minuta* (KI-20-1a) strains;
- 25 – clone of *Candida haemulonii* (KII-29-2a) strain

Суммарно 30 штаммов с различными признаками устойчивости исследованы на их способность расти в присутствии нерадиоактивных ^{87}Sr (в виде окиси) и ^{133}Cs (в виде хлористого цезия). Выделены штаммы, способные расти при высоких концентрациях цезия (до $100 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$). Наиболее устойчивыми оказались представители видов *Rhodotorula minuta* (KI-17-5-1) и *Rhodotorula mucilaginosa* (KI-215-4).

Среди штаммов с устойчивостью к нескольким металлам провели отбор устойчивых к никелю (рис. 2). Высокую устойчивость к никелю (до $5 \text{ ммоль} \cdot \text{л}^{-1}$) продемонстрировали клоны вида *Sporobolomyces roseus* (C26-2-1) и *Candida haemulonii* (KII-29-2a), которые были к тому же устойчивы к солям урана.

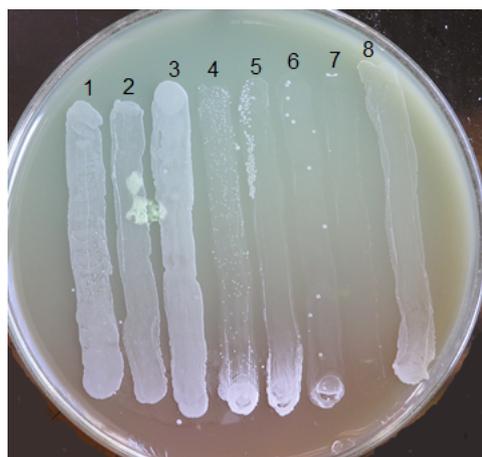


Рис. 2. Тестирование чувствительности штаммов дрожжей к солям никеля:

- 1–3 — клоны штамма *Sporobolomyces roseus* (C26-2-1);
- 4 — штамм *Pichia farinosa* (KI-174-4a);
- 5 — штамм *Pichia farinosa* (KI-6-7a);
- 6 — штамм *Debaryomyces hansenii* (KI-126-1a);
- 7 — штамм *Saccharomyces cerevisiae* XII₇, диплоид;
- 8 — штамм *Candida haemulonii* (КП-29-2a)

Fig. 2. Testing yeast strains sensitivity to nickel salts:

- 1–3 – clones of *Sporobolomyces roseus* (C26-2-1) strain;
- 4 – *Pichia farinosa* (KI-174-4a) strain;
- 5 – *Pichia farinosa* (KI-6-7a) strain;
- 6 – *Debaryomyces hansenii* (KI-126-1a) strain;
- 7 – *Saccharomyces cerevisiae* XII₇ strain, diploid;
- 8 – *Candida haemulonii* (КП-29-2a) strain

Чувствительность отобранных штаммов к «острому» γ -облучению ^{60}Co представлена на рис. 3 в сравнении с таковой штамма *Saccharomyces cerevisiae* XII₇. Среди них есть как более, так и менее чувствительные к γ -облучению штаммы с ФИД (фактор изменения дозы на уровне D_{37}) от 0,7 до 1,15. Наиболее радиорезистентным оказался изолят *Rhodotorula minuta* (KI-17-2).

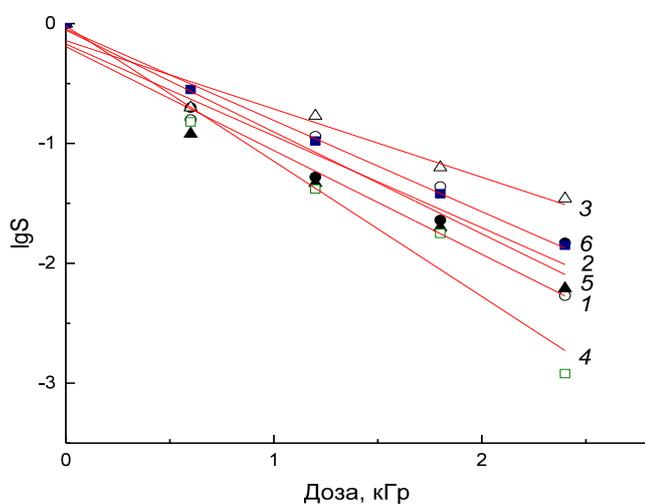


Рис. 3. Выживаемость (lgS) при «остром» γ -облучении ^{60}Co штаммов, отобранных для определения эффективности связывания ^{137}Cs :

- 1 — штамм *Rhodotorula minuta* (КП-110-3);
- 2 — штамм *Rhodotorula minuta* (KI-20-1a);
- 3 — штамм *Rhodotorula minuta* (KI-17-2);
- 4 — штамм *Rhodotorula minuta* (KI-17-5-1);
- 5 — штамм *Rhodotorula mucilaginosa* (KI-215-4);
- 6 — штамм *Saccharomyces cerevisiae* XII₇

Fig. 3. Survival (lgS) of strains, selected for testing ^{137}Cs binding effectiveness, after “acute” ^{60}Co γ -irradiation:

- 1 – *Rhodotorula minuta* (КП-110-3) strain;
- 2 – *Rhodotorula minuta* (KI-20-1a) strain;
- 3 – *Rhodotorula minuta* (KI-17-2) strain;
- 4 – *Rhodotorula minuta* (KI-17-5-1) strain;
- 5 – *Rhodotorula mucilaginosa* (KI-215-4) strain;
- 6 – *Saccharomyces cerevisiae* XII₇ strain

Полученные штаммы исследованы на способность расти в среде с радиоактивными изотопами, в частности ^{137}Cs при концентрации до $110 \text{ кБк}\cdot\text{мл}^{-1}$, при различных значениях температуры и pH и при выращивании в разных ростовых средах. Несколько штаммов рода *Rhodotorula* продемонстрировали способность связывать ^{137}Cs с эффективностью 80–90 % (рис. 4).

Из полученных результатов, представленных на рис. 4, следует, что при росте в течение 400 ч дрожжеподобные грибы *Rhodotorula minuta* и *Rhodotorula mucilaginosa* связывают ^{137}Cs намного эффективнее, чем бактерии *Escherichia coli*.

Эффективность связывания радиоактивного ^{63}Ni , как и радиоактивного ^{137}Cs ранее, определяли в процентах по отношению активности осаждённых центрифугированием клеток к суммарной активности осадка и надосадочной жидкости (рис. 5).

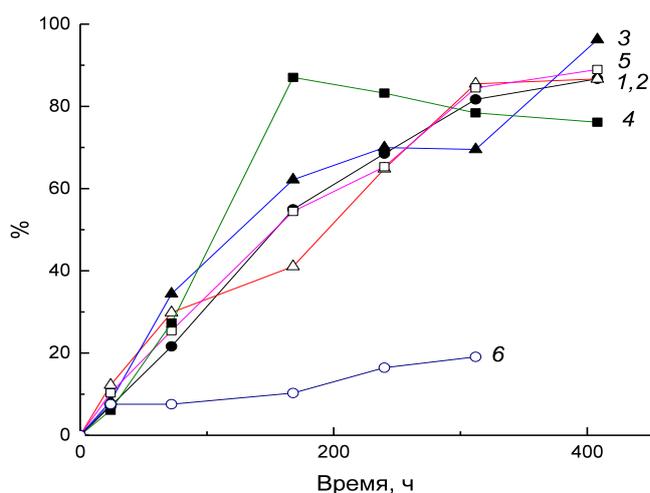


Рис. 4. Эффективность связывания (%) свободными клетками ^{137}Cs из ростовой среды при pH ~ 6 в процессе роста:

- 1 — штамм *Rhodotorula minuta* (КП-110-3);
- 2 — штамм *Rhodotorula minuta* (КП-20-1а);
- 3 — штамм *Rhodotorula minuta* (КП-17-2);
- 4 — штамм *Rhodotorula minuta* (КП-17-5-1);
- 5 — штамм *Rhodotorula mucilaginosa* (КП-215-4);
- 6 — штамм *Escherichia coli* AB1157

Fig. 4. Efficiency of ^{137}Cs binding by free cells from growth medium at pH ~ 6 during growth:

- 1 – *Rhodotorula minuta* (КП-110-3) strain;
- 2 – *Rhodotorula minuta* (КП-20-1а) strain;
- 3 – *Rhodotorula minuta* (КП-17-2) strain;
- 4 – *Rhodotorula minuta* (КП-17-5-1) strain;
- 5 – *Rhodotorula mucilaginosa* (КП-215-4) strain;
- 6 – *Escherichia coli* AB1157 strain

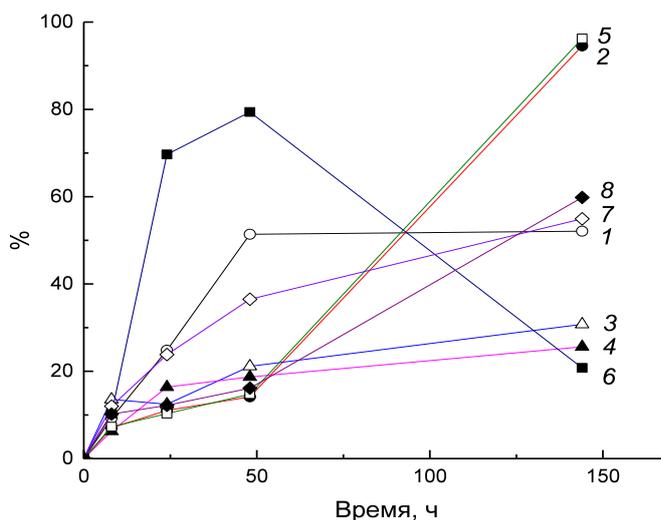


Рис. 5. Эффективность связывания (%) свободными клетками ^{63}Ni из ростовой среды при pH ~ 6 в процессе их роста:

- 1 — штамм *Rhodotorula glutinis* (КП-216-4);
- 2 — штамм *Rhodotorula mucilaginosa* (КП-20-4);
- 3 — штамм *Cryptococcus albidus* (КП-III-24);
- 4 — штамм *Cryptococcus albidus* (КП-III-19);
- 5 — штамм *Rhodotorula minuta* (КП-110-3);
- 6 — штамм *Sporobolomyces roseus* (С-26-2-1);
- 7 — штамм *Saccharomyces cerevisiae* (С-20-2);
- 8 — штамм *Candida haemulonii* (КП-29-2а)

Fig. 5. Efficiency of ^{63}Ni binding (%) by free cells from growth medium at pH ~ 6 during growth:

- 1 – *Rhodotorula glutinis* (КП-216-4) strain;
- 2 – *Rhodotorula mucilaginosa* (КП-20-4) strain;
- 3 – *Cryptococcus albidus* (КП-III-24) strain;
- 4 – *Cryptococcus albidus* (КП-III-19) strain;
- 5 – *Rhodotorula minuta* (КП-110-3) strain;
- 6 – *Sporobolomyces roseus* (С-26-2-1) strain;
- 7 – *Saccharomyces cerevisiae* (С-20-2) strain;
- 8 – *Candida haemulonii* (КП-29-2а) strain

Обнаружено, что штаммы *Rhodotorula glutinis* и *Sporobolomyces roseus* демонстрируют быструю кинетику накопления ^{63}Ni , а *Rhodotorula mucilaginosa* и *Rhodotorula minuta* после длительного роста характеризуются максимальным процентом связывания (~ 95 %), значительно превосходя по этому показателю *Saccharomyces cerevisiae*. Для повышения эффективности связывания никеля исследованными штаммами мы добавляли в ростовую среду глюкозу, изменяя концентрацию от 2 до 10 % (табл. 1). Положительно среагировали на дополнительный источник энергии *Rhodotorula glutinis* и *Rhodotorula mucilaginosa*, связав до 96–99 % металла.

ОБСУЖДЕНИЕ

Уникальность коллекции штаммов дрожжей, собранных в ПИЯФ, определяется особенностью географии мест проведения работ. На практически изолированном от материка п-ве Камчатка находится около 60 вулканов. Действующих из них — половина, однако и на склонах уже потухших вулканов продолжают функционировать гидротермы и грязевые выбросы разной температуры, содержащие различные природные неорганические соединения. Курилы также изобилуют районами, характеризующимися наличием проявлений различных выбросов. Именно поэтому

Таблица 1. Эффективность связывания (%) свободными клетками ^{63}Ni из ростовой среды при различной концентрации глюкозы**Table 1.** Efficiency of ^{63}Ni binding (%) by free cells from growth medium at different glucose concentration

Штамм	Время, ч	Концентрация глюкозы, %		
		2	5	10
<i>Rhodotorula glutinis</i> (KI-216-4)	0	0	0	0
	8	5,1 ± 0,5	9,6 ± 0,9	13,9 ± 0,5
	24	22,4 ± 0,2	28,2 ± 0,8	36,4 ± 0,4
	48	28,7 ± 0,4	40,6 ± 0,4	92,2 ± 0,6
	72	24,9 ± 0,2	50,6 ± 0,2	96,4 ± 0,7
	144	17,9 ± 0,2	86,5 ± 0,4	96,2 ± 0,3
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> (KI-20-4)	0	0	0	0
	8	6,8 ± 0,4	4,6 ± 0,9	14,8 ± 0,6
	24	8,7 ± 0,5	17,6 ± 0,2	16,2 ± 0,5
	48	36,1 ± 0,7	25,5 ± 0,1	23,0 ± 0,5
	72	24,4 ± 0,5	84,5 ± 1,0	45,7 ± 0,5
	144	83,8 ± 0,3	97,7 ± 0,5	99,3 ± 1,6
<i>Rhodotorula minuta</i> (KI-110-3)	0	0	0	0
	8	3,6 ± 0,7	7,4 ± 0,5	9,7 ± 0,4
	24	10,8 ± 0,4	19,8 ± 0,3	26,8 ± 0,4
	48	21,7 ± 0,2	27,9 ± 0,6	24,5 ± 0,3
	72	20,7 ± 0,6	30,1 ± 0,5	37,9 ± 0,6
	144	76,1 ± 0,5	65,8 ± 0,2	48,2 ± 0,3
<i>Sporobolomyces roseus</i> (C-26-2-1)	0	0	0	0
	8	10,0 ± 0,7	10,2 ± 0,3	13,5 ± 0,5
	24	67,6 ± 0,7	77,9 ± 0,6	63,9 ± 0,6
	48	26,4 ± 0,3	45,4 ± 0,4	31,7 ± 0,2
	72	28,5 ± 0,7	29,2 ± 0,3	40,6 ± 0,1
	144	32,0 ± 0,8	31,9 ± 0,3	32,0 ± 0,6

дрожжи и дрожжеподобные грибы, собранные в этих местах, т. е. в условиях постоянного жёсткого давления окружающей среды, должны обладать повышенной устойчивостью как к физическим факторам (повышенные температура, радиоактивный фон или интенсивность УФ-облучения), так и к химическим (повышенная концентрация солей тяжёлых металлов, крайние значения pH). Среди этих микроорганизмов могут быть и имеются те, что способны эффективно накапливать ионы тяжёлых высокотоксичных металлов и радионуклиды. Выделенные нами штаммы рода *Rhodotorula* растут при высоких концентрациях тяжёлых металлов и высоком радиоактивном фоне. Кроме того, они, как оказалось, связывают эти металлы, в частности цезий и никель.

К настоящему времени основными загрязнителями жидких низкоактивных отходов являются долгоживущие радионуклиды ^{137}Cs ($T_{1/2} = 30,2$ года) и ^{90}Sr ($T_{1/2} = 28,8$ года). Только сейчас в сфере производства делящихся материалов проблема охраны окружающей среды стала основной. Очевидно, что решение задачи ликвидации отходов по уровню затрат может оказаться почти таким же, как основное производство. Между тем для обеспечения экологической безопасности радиохимических производств весьма важно предотвратить риск попадания радионуклидов в грунтовые воды и выхода их на поверхность почвы. Разрабатываемые в настоящее время подходы в сфере биоремедиации предусматривают методы как *ex situ*, так и *in situ* [6 ; 22 ; 23 ; 25], что позволяет находить комплексные решения и для открытых водоёмов-накопителей, и для бассейнов для хранения ядерного топлива.

Любые методы очистки жидких низкоактивных отходов от ^{137}Cs являются затратными; всё определяется лишь требованиями к качеству воды и воздуха. Эти отходы накоплены в больших объёмах, что стимулирует поиск дешёвых способов очистки от радионуклидов и металлов. Методы биоремедиации, т. е. использование микроорганизмов, на сегодняшний день считают наиболее перспективными. Выделенные нами штаммы природных дрожжей рода *Rhodotorula* показали высокую эффективность связывания ^{137}Cs при его активности до $110 \text{ кБк}\cdot\text{мл}^{-1}$.

Кроме радионуклидов, большую опасность для окружающей среды представляют тяжёлые металлы, в частности никель. Это самый распространённый индустриальный поллютант. Уровень Ni в почве составляет $3\text{--}100 \text{ мг}\cdot\text{кг}^{-1}$, в хвостах золотодобычи — $580 \text{ мг}\cdot\text{кг}^{-1}$ и $11\,200 \text{ мг}\cdot\text{кг}^{-1}$ в Танзании. В речных незагрязнённых и слабозагрязнённых водах концентрация никеля колеблется обычно от $0,8$ до $10 \text{ мкг}\cdot\text{дм}^{-3}$; в загрязнённых она составляет несколько десятков микрограммов в 1 дм^3 . Средние значения Ni в морской воде — $2 \text{ мкг}\cdot\text{дм}^{-3}$, в подземных водах — $\sim 10^3 \text{ мкг}\cdot\text{дм}^{-3}$. В подземных водах, омывающих никельсодержащие горные породы, концентрация Ni иногда возрастает до $20 \text{ мг}\cdot\text{дм}^{-3}$ [1; 3; 5].

Наиболее токсично и канцерогенно состояние никеля +4. Соединения Ni играют важную роль в кроветворных процессах, являясь катализаторами. Повышенное его содержание оказывает специфическое действие на сердечно-сосудистую систему. Никель — канцерогенный элемент, способный вызывать респираторные заболевания. Считается, что свободные ионы никеля (Ni^{2+}) примерно в 2 раза более токсичны, чем его комплексные соединения [4]. Избыток Ni вызывает гипогликемию, астму, тошноту, головную боль, рак носовой полости и лёгких. Механизмы токсичности никеля разнообразны; их действие в итоге приводит к разрушению клеточных мембран [9; 10; 14; 15; 16]. Опять же, выделенные из экологической ниши экстремофилов штаммы природных дрожжей рода *Rhodotorula*, связывающие Ni, кажутся перспективными для биоремедиации и производственных процессов.

На повестке дня у биотехнологов стоит применение не только нативных, но и генно-модифицированных организмов. Результаты данной работы показывают возможность использовать природные штаммы, но выделенные из экстремальных условий обитания (они уже привлекают внимание [20]). Дальнейшее изучение экстремофильных микроорганизмов с применением omics-технологий [18] поможет оптимизировать механизмы связывания [19] и сделать шаг к эффективным бесклеточным системам.

Выводы:

1. Полученные результаты показали потенциальную возможность использования библиотеки природных микроорганизмов для осаждения как радионуклидов, так и тяжёлых металлов (основных загрязнителей природных и техногенных объектов), а также возможность применения выделенных и изученных штаммов микроорганизмов для концентрирования ряда металлов из малообогатённых руд или отходов добывающей промышленности.
2. Выявленное разнообразие фенотипов, а именно множественная устойчивость, свидетельствует о том, что существует, скорее всего, несколько механизмов толерантности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. *Вредные химические вещества. Неорганические соединения V–VIII групп* : справочник / под ред. В. А. Филова. Ленинград : Химия, 1989. 592 с. [*Vrednye khimicheskie veshchestva. Neorganicheskie soedineniya V–VIII grupp* : spravochnik / V. A. Filov (Ed.). Leningrad : Khimiya, 1989, 552 p. (in Russ.)]
2. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. Н., Федорова И. В. *Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов*. Ленинград : Наука, 1984. 144 с. [Zakharov I. A., Kozhin S. A., Kozhina T. N., Fedorova I. V. *Sbornik metodik po genetike drozhzhei-sakharomitsetov*. Leningrad : Nauka, 1984, 144 p. (in Russ.)]

3. Зенин А. А., Белоусова Н. В. *Гидрохимический словарь*. Ленинград : Гидрометеоздат, 1988. 240 с. [Zenin A. A., Belousova N. V. *Gidrokhimicheskii slovar'*. Leningrad : Gidrometeoizdat, 1988, 240 p. (in Russ.)]
4. Никаноров А. М. *Гидрохимия*. Санкт-Петербург : Гидрометеоздат, 2001. 444 с. [Nikanorov A. M. *Gidrokhiimiya*. Saint Petersburg : Gidrometeoizdat, 2001, 444 p. (in Russ.)]
5. *Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши* / под ред. А. Д. Семенова. Ленинград : Гидрометеоздат, 1977. 541 с. [*Rukovodstvo po khimicheskomu analizu poverkhnostnykh vod sushi* / A. D. Semenov (Ed.). Leningrad : Gidrometeoizdat, 1977, 541 p. (in Russ.)]
6. Azubuike C. C., Chikere C. B., Okpokwasili G. C. Bioremediation techniques – classification based on site of application: Principles, advantages, limitations, and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, vol. 32, iss. 11, art. 180 (18 p.). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>
7. Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D. *Yeasts: Characteristics and Identification*. Cambridge : Cambridge University Press, 1983, 811 p.
8. Brim H., McFarlan S. C., Fredrickson J. K., Minton K. W., Zhai M., Wackett L. P., Daly M. J. Engineering *Deinococcus radiodurans* for metal remediation in radioactive mixed waste environments. *Nature Biotechnology*, 2000, vol. 18, iss. 1, pp. 85–90. <https://doi.org/10.1038/71986>
9. Chen C. Y., Lin T. H. Nickel toxicity to human term placenta: *in vitro* study on lipid peroxidation. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 1998, vol. 54, iss. 1, pp. 37–47. <https://doi.org/10.1080/009841098159015>
10. Fulkerson J. F. Jr., Garner R. M., Mobley H. L. T. Conserved residues and motifs in the NixA protein of *Helicobacter pylori* are critical for the high affinity transport of nickel ions. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, iss. 1, pp. 235–241. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.235>
11. Gadd G. M., White C. Microbial treatment of metal pollution – A working biotechnology? *Trends in Biotechnology*, 1993, vol. 11, iss. 8, pp. 353–359. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(93\)90158-6](https://doi.org/10.1016/0167-7799(93)90158-6)
12. Jansson-Charrier M., Guibal E., Surjous R., Le Cloirec P. Continuous removal of uranium by biosorption onto chitosan: Application to an industrial effluent. In: *Biohydrometallurgical Processing* : proc. of the Intern. Biohydrometallurgy Symp. IBS-95, Viña del Mar, Chile, Nov. 19–22, 1995 / C. A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo, J. V. Wiertz (Eds). Santiago, Chile : University of Chile, 1995, pp. 257–266.
13. Kreger-van Rij N. J. W. *The Yeasts. A Taxonomic Study*. Amsterdam : Elsevier Science Publishers, 1984, 1082 p.
14. Krishnaswamy R., Wilson D. B. Construction and characterization of an *Escherichia coli* strain genetically engineered for Ni(II) bioaccumulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, no. 12, pp. 5383–5386. <https://doi.org/10.1128/aem.66.12.5383-5386.2000>
15. Kuippers G., Boothman C., Bagshaw H., Ward M., Beard R., Bryan N., Lloyd J. R. The biogeochemical fate of nickel during microbial ISA degradation; implications for nuclear waste disposal. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, art. 8753 (11 p.). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26963-8>
16. Lin K. C., Chou I. N. Studies on the mechanisms of nickel ion-induced cell injury: Effects of nickel ion on microtubules. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1990, vol. 106, iss. 2, pp. 209–221. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(90\)90241-1](https://doi.org/10.1016/0041-008x(90)90241-1)
17. Lloyd J. R., Macaskie L. E. Bioremediation of radionuclide-containing wastewaters. In: *Environmental Microbe-Metal Interactions* / D. R. Lovley (Ed.). Washington, DC : ASM Press, 2000, chap. 13, pp. 277–327. <https://doi.org/10.1128/9781555818098.ch13>
18. Malla M., Dubey A., Yadav S., Kumar A., Hashem A., Add_Allah E. F. Understanding and designing the strategies for the microbe-mediated remediation of environmental contaminants using omics approaches. *Frontiers in Microbiology*, 2018, vol. 9, art. 1132 (18 p.). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01132>
19. McGraw V. E., Brown A. R., Boothman C., Goodacre R., Morris K., Sigee D., Anderson L., Lloyd J. R. A novel adaptation mechanism underpinning algal colonization of a nuclear fuel storage pond. *mBio*, 2018, vol. 9, iss. 3, art. e02395-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02395-17>
20. Orellana R., Macaya C., Bravo G., Dorochesi F., Cumsille A., Valencia R., Rojas C., Seeger M. Living at the frontier of life: Extremophiles in Chile and their potential for bioremediation. *Frontiers*

- in *Microbiology*, 2018, vol. 9, art. 2309 (25 p.). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02309>
21. Polyakova A. V., Panikov N. S., Chernov I. Yu. Yeast diversity in hydromorphic soils with reference to a grass-sphagnum wetland in Western Siberia and a hummocky tundra region at Cane Barrow (Alaska). *Microbiology*, 2001, vol. 70, iss. 5, pp. 617–622. <https://doi.org/10.1023/A:1012328710111>
 22. Prakash D., Gabani P., Chandel A. K., Ronen Z., Singh O. V. Bioremediation: A genuine technology to remediate radionuclides from the environment. *Microbial Biotechnology*, 2013, vol. 6, no. 4, pp. 349–360. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12059>
 23. Schneider I. A. H., Rubio J. New trends in biosorption of heavy metals by freshwater macrophytes. In: *Biohydrometallurgical Processing* : proc. of the Intern. Biohydrometallurgy Symp. IBS-95, Viña del Mar, Chile, Nov. 19–22, 1995 / C. A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo, J. V. Wiertz (Eds). Santiago, Chile : University of Chile, 1995, pp. 247–256.
 24. Velea I., Voicu A., Lazar I. Biosorption of some metallic ions from industrial effluents using fungal strains and bacterial exopolysaccharides. In: *Biohydrometallurgical Processing* : proc. of the Intern. Biohydrometallurgy Symp. IBS-95, Viña del Mar, Chile, Nov. 19–22, 1995 / C. A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo, J. V. Wiertz (Eds). Santiago, Chile : University of Chile, 1995, pp. 267–276.
 25. White C., Sayer J. A., Gadd G. M. Microbial solubilization and immobilization of toxic metals: Key biogeochemical processes for treatment of contamination. *FEMS Microbiology Review*, 1997, vol. 20, iss. 3–4, pp. 503–516. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00333.x>

ADAPTATION OF NATURAL YEAST STRAINS TO HEAVY METAL AND RADIONUCLIDES SALTS*

V. P. Stepanova, **A. V. Suslov**, **I. N. Suslova**,
E. A. Sukhanova, **B. F. Yarovoy**, and **V. N. Verbenko**

Petersburg Nuclear Physics Institute named by B. P. Konstantinov
of National Research Centre “Kurchatov Institute”, Gatchina, Russian Federation

E-mail: verbenko_vn@pnpi.nrcki.ru

Ability of natural yeast strains to grow in conditions of high concentrations of heavy metal and radionuclides salts was studied. More than 500 strains were tested for resistance to salts of heavy metals (U, Cs, Sr, Ni, Ar, Cu, Cd, and Co) and to elevated temperature (t) (+37...+52 °C). Most of the strains tested were resistant to one or more selective factors. Combinations of (t, Cd, Cu, Co) and (Cd, Cu, Co) occurred with the highest frequencies: 36 and 26 %, respectively. Ability of isolated strains to grow in the presence of high concentrations of radioactive isotopes Cs and Ni and to bind them with high efficiency was established. The results showed the possibility of potential using of libraries of natural microorganisms for disposal of both radionuclides and heavy metals, which are the main pollutants of natural and anthropogenic objects, as well as the possibility of using of isolated and tested strains of microorganisms for concentrating metals from low-grade ores or mining industry waste. Phenotypes diversity revealed indicates probable existence of several mechanisms of resistance to high heavy metals concentrations.

Keywords: natural yeast strains, adaptation, heavy metals, radioisotopes ¹³⁷Cs and ⁶³Ni, bioremediation

*The materials of the article were presented at the Readings in memory of Academician G. G. Polikarpov “Radiochemoecology: Progress and Prospects” (Sevastopol, IBSS, 2019).