

А. Б. Таширев, Э. В. Галинкер член-корреспондент НАН Украины
Е. И. Андреев

Термодинамическое прогнозирование редокс-взаимодействия микроорганизмов с металлами-окислителями (Hg^{2+} , CrO_4^{2-} и Cu^{2+})

The results of thermodynamic calculations providing a basic opportunity of growth of microorganisms at ultrahigh concentrations of toxic oxidative metals such as Hg^{2+} , CrO_4^{2-} , and Cu^{2+} are given. At a manifold increase in the concentration of metals (from $1 \cdot 10^{-8}$ up to 1.0 mole/l), their standard redox-potential (E_0) increases only by 200...400 mV and does not fall outside the limits of thermodynamic stability of water. In the presence of Hg (II), Cr (VI), and Cu (II), the growth of microorganisms is theoretically admissible even at their 1-mole concentration (accordingly, 10000, 51996, and 63540 ppm). Toxicity of Hg^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} for microorganisms is defined, first of all, by their high redox-potential (+920, +555, and +440 mV, accordingly). Metabolic activity of chemoorganotrophic microorganisms is accompanied by a decrease in the redox-potential of the environment up to $-200 \dots -400$ mV. Microorganisms serve as donors, and oxidative metals – as acceptors of electrons. The potential difference between the donor ($-200 \dots -400$ mV) and acceptor systems (+440...+920 mV) is equal to 660...1320 mV and predetermines the reduction of Hg^{2+} , CrO_4^{2-} , and Cu^{2+} by microorganisms.

Принято считать, что тяжелые металлы-окислители токсичны и подавляют рост микроорганизмов, так как образованные ими окислительно-восстановительные системы характеризуются высокими значениями редокс-потенциала Eh (символ “ Eh ” подчеркивает, что все потенциалы далее даны по водородной шкале). В их присутствии происходит переключение микробного метаболизма на побочный процесс восстановления металла вместо восстановления терминального акцептора электронов (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} и др.), что приводит обычно к энергетическому истощению клеток и их гибели. Например, молибдат (MoO_4^{2-}) конкурентно подавляет диссимиляторную сульфатредукцию [1]. Хромат (CrO_4^{2-}) переключает сбраживание глюкозы у факультативных и облигатных анаэробов на восстановление хромата, что приводит к резкому повышению редокс-потенциала (от -300 до $+100$ мВ), снижению скорости роста, а затем и к гибели клеток [2]. Однако это не исключает возможность существования микроорганизмов, использующих металлы-окислители в качестве акцепторов электронов. Окисленные соединения ртути, хрома и меди наиболее токсичны для микроорганизмов по сравнению с другими тяжелыми металлами [3, 4]. Тем не менее в период с 1998 по 2007 гг. нами выделены из антарктических почв микроорганизмы, устойчивые к высоким концентрациям Cu^{2+} , Hg^{2+} , CrO_4^{2-} и Cd^{2+} [5]. На примере техногенных ассоциаций микроорганизмов (активный ил аэротенка и сброженный осадок метантенка) показана возможность адаптации микроорганизмов к концентрации 10,0 г/л Cu^{2+} и 1,0 г/л Hg^{2+} .

В настоящей работе предпринята попытка количественно охарактеризовать особенности взаимодействия металлов-окислителей с микроорганизмами, руководствуясь следующими термодинамическими представлениями:

1. Все метаболические окислительно-восстановительные процессы, осуществляемые микроорганизмами в процессе жизнедеятельности, происходят внутри области значений ре-

докс-потенциала Eh , при которых вода является термодинамически устойчивым растворителем. Эта область ограничена двумя окислительно-восстановительными реакциями: восстановлением протона до молекулярного водорода и окислением кислорода воды (или иона гидроксидов) до молекулярного кислорода (табл. 1). Ширина интервала значений Eh , внутри которого вода термодинамически устойчива, не зависит от рН и составляет 1,228 В. На диаграмме Eh — рН она представляет наклонную полосу, поскольку стандартные редокс-потенциалы E_0 обеих реакций — линейные функции рН [6, 7]. При рН 7 область (зона) окислительно-восстановительной устойчивости воды заключена между потенциалами -414 и $+814$ мВ.

2. Токсическое действие металла зависит от величины редокс-потенциала раствора Eh , которая определяется присутствием окислительно-восстановительной системы, образованной окисленной и восстановленной формами металла, и положением этой величины относительно границ зоны термодинамической устойчивости воды.

В табл. 2 приведены данные, свидетельствующие о том, что микроорганизмы в действительности эффективно используют для получения энергии окислительно-восстановительные реакции, протекающие именно внутри термодинамически определенной зоны устойчивости воды [8]. Соответственно, катаболические окислительно-восстановительные ферментные системы, начиная от оксигеназ и цитохромов с высокими редокс-потенциалами и кончая ферредоксинами и гидрогеназами с низкими редокс-потенциалами, функционируют в пределах зоны термодинамической устойчивости воды [9, 10, 11]. Основываясь на полученных данных (см. табл. 2), мы предположили, что микроорганизмы могут взаимодействовать с внешними редокс-системами и осуществлять окислительно-восстановительные реакции с их участием, в том числе с металлами-окислителями, при условии, что эти реакции протекают в области потенциалов термодинамической устойчивости воды. Осно-

Таблица 1. Уравнения реакций зоны термодинамической устойчивости воды

Номер	Реакция	E'_0 , мВ*
1	$O_2 + 4H^+ + 4e = 2H_2O$, $Eh = 1,228 - 0,0591 \cdot pH - 0,0295 \cdot \lg PH_2^{**}$	+814
2	$2H^+ + 2e = H_2$, $Eh = 0,000 - 0,0591 \cdot pH - 0,0591 \cdot \lg PH_2$	-414

* E'_0 — стандартный редокс-потенциал реакции (Eh , мВ) при рН 7 и одномолярной концентрации как окисленной, так и восстановленной форм реагирующих соединений. ** PH_2 — парциальное давление молекулярного водорода (1 атм).

Таблица 2. Окислительно-восстановительные потенциалы основных реакций хемолитотрофного метаболизма (цит. по [8])

Номер реакции	Уравнение реакции	E'_0 , мВ
1	$O_2 + 4H^+ + 4e = 2H_2O$	+860
2	$NH_4^+ + 2H_2O = NO_2^- + 8H^+ + 6e$	+440
3	$NO_2^- + H_2O = NO_3^- + 2H^+ + 2e$	+350
4	$S^0 + 3H_2O = SO_3^{2-} + 6H^+ + 4e$	+50
5	$H_2S = S^0 + H^+ + 2e$	-250
6	$SO_3^{2-} + H_2O = SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e$	-280
7	$NAD \cdot H + H^+ = NAD^+ + 2e + 2H^+$	-320
8	$H_2 = 2H^+ + 2e$	-410

ванием для этого служит то обстоятельство, что в данной области такого рода процессы свободны от термодинамического запрета. За пределами области потенциалов устойчивости воды взаимодействие электронно-транспортных систем микроорганизмов с внешними редокс-системами сопряжено с преодолением термодинамического запрета.

Если редокс-потенциал системы, образованной металлом-окислителем и его восстановленной формой, принадлежит к области термодинамической устойчивости воды и его токсическое действие определено значением Eh , то вполне справедливыми будут следующие положения:

1) теоретически допустимо существование микроорганизмов, растущих в присутствии окисленной формы этого металла и использующих его в качестве акцептора электронов, наряду с акцептором терминальным. Электронно-транспортные (ферментные) системы микроорганизмов в качестве донора электронов могут восстанавливать металл лишь до той степени окисления, при которой значение редокс-потенциала Eh остается внутри зоны термодинамической устойчивости воды;

2) теоретически допустимо существование микроорганизмов, устойчивых к весьма высоким концентрациям металла-окислителя, в ряде случаев до величин порядка 1 моль/л, как это будет показано ниже.

Обоснуем эти положения, используя количественные термодинамические оценки, на примере трех тяжелых металлов-окислителей — Hg(II), Cr(VI) и Cu(II), принадлежащих к числу наиболее токсичных. Стандартные потенциалы различных редокс-систем, образованных Hg, Cr и Cu, рассчитанные по уравнениям Пурбе [7], приведены в табл. 3. Как видим, большинство окислительно-восстановительных реакций с участием соединений ртути (см. табл. 3, реакции 2, 3, 5–7) характеризуются высокими значениями стандартного редокс-потенциала E_0 (+620... +789... +854... +920 мВ). Эти значения близки к верхней границе зоны термодинамической устойчивости воды (+814 мВ при pH 7) или превышают ее. Поэтому при больших концентрациях ионов ртути раствор проявляет себя как сильный

Таблица 3. Редокс-потенциалы реакций восстановления металлов и термодинамической устойчивости воды

Номер реакции	Уравнение реакции	E_0 , мВ	pH
1	$\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 14\text{H}^+ + 6e = 2\text{Cr}^{3+} + 7\text{H}_2\text{O}$	+1330	$\leq 3,0$
2	$2\text{Hg}^{2+} + 2e = \text{Hg}_2^{2+}$	+920	7,0
3	$\text{Hg}^{2+} + 2e = \text{Hg}^0$	+854	7,0
4	$\text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4e = 2\text{H}_2\text{O}$	+814	7,0
5	$\text{Hg}_2^{2+} + 2e = 2\text{Hg}^0$	+789	4,0
6	$2\text{HgCl}_2 + 2e = \text{Hg}_2\text{Cl}_2 + 2\text{Cl}^-$	+630	7,0
7	$\text{Hg}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+ + 2e = 2\text{H}_2\text{O} + \text{Hg}^0$	+620	7,0
8	$\text{CrO}_4^{2-} + (n-1) \cdot \text{H}_2\text{O} + 5\text{H}^+ + 3e = \text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	+555	7,0
9	$2\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + 2e = \text{Cu}_2\text{O} + 2\text{H}^+$	+440	4,0
10	$\text{Cu}(\text{OH})_2 + 2\text{H}^+ + 2e = \text{Cu}^0 + 2\text{H}_2\text{O}$	+156	7,0
11	$2\text{CuO} + 2\text{H}^+ + 2e = \text{Cu}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$	+255	7,0
12	$\text{Cu}^{2+} + 2e = \text{Cu}^0$	+337	4,0
13	$2\text{H}^+ + 2e = \text{H}_2$	-414	7,0
14	$\text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O} + 3\text{H}^+ + 3e = \text{Cr}^0 + (3+n) \cdot \text{H}_2\text{O}$	-926	7,0
15	$\text{Cr}(\text{OH})_3 + \text{H}^+ + e = \text{CrO} + 2\text{H}_2\text{O}$	-1199	7,0

Примечание. № 4,13 — уравнения и редокс-потенциалы, соответствующие верхней (№ 4) и нижней (№ 13) границам термодинамической устойчивости воды.

окислитель, токсичный для микроорганизмов. Для редокс-систем, образованных Cu(II), Cu(I), характерны более низкие значения E_0 (+156... +440 мВ) (см. табл. 3, реакции 9–12).

Редокс-системы, образованные Cr(VI), а также более низкими степенями окисления хрома (Cr(III), Cr(II) и Cr(0)), характеризуются значениями E_0 , которые могут принадлежать зоне термодинамической устойчивости воды либо находиться за ее пределами. Например, Cr(VI) в форме бихромата (см. табл. 3, реакция 1) устойчив при $\text{pH} \leq 3,0$. В этой области значений pH стандартный потенциал реакции восстановления Cr(VI) — в форме $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ — до Cr^{3+} ($E_0 = +1330$ мВ) находится далеко за пределами верхней границы зоны устойчивости воды. Поэтому кислые растворы бихромата, являясь весьма сильными окислителями, — бактерицидны. Однако реакция восстановления Cr(VI) в виде хромата (CrO_4^{2-}) до $\text{Cr}(\text{OH})_3$ характеризуется величиной $E_0 = +555$ мВ при $\text{pH} 7$, и, таким образом, в растворах, близких к нейтральным, этот процесс протекает в зоне термодинамической устойчивости воды (см. табл. 3, реакция 8). Значения E_0 для реакций дальнейшего восстановления Cr(III) до Cr(II) и Cr(0) (см. табл. 3, реакции 14 и 15) находятся за пределами нижней границы устойчивости воды (–414 мВ, см. табл. 3, реакция 13) и составляют –926 и –1199 мВ соответственно. Поэтому указанные реакции не могут осуществляться микроорганизмами.

В том случае, когда токсическое действие металла определяется преимущественно окислительно-восстановительными свойствами образованной им редокс-системы, ряд токсичности металлов должен совпадать с последовательностью значений E_0 . Данные табл. 3 указывают на то, что значения стандартного потенциала E_0 для исследуемых редокс-систем убывают в следующем порядке:



Токсичность рассматриваемых металлов убывает в ряду $\text{Hg}(\text{II}) > \text{Cr}(\text{VI}) > \text{Cu}(\text{II})$, который совпадает с убывающей последовательностью значений E_0 . Эта корреляция может служить весомым аргументом в пользу представления о существенной роли электрохимического фактора токсического действия для указанных металлов, т. е. в пользу исходных положений настоящей работы.

Если восстановленная форма металла малорастворима, то табличные значения стандартного (формального) потенциала редокс-систем E_0 соответствуют концентрации окислителя в растворе, равной 1 моль/л. В данном случае это означает, что если значение E_0 для какой-либо пары (металл-окислитель и его восстановленная форма) находится в пределах зоны устойчивости воды, то возможно взаимодействие этой редокс-пары с электронно-транспортной системой микроорганизмов (термодинамический запрет отсутствует) при столь высокой концентрации окислителя. Это дает основание предполагать возможность существования видов микроорганизмов, способных адаптироваться к весьма значительным концентрациям металла-окислителя и использовать его как акцептор электронов.

С подобной ситуацией мы встречаемся, например, в случае восстановления Cu(II) до Cu(I) и Cu(0), а также Cr(VI) в форме CrO_4^{2-} до Cr(III) в растворах, близких к нейтральным. Соответствующие значения E_0 находятся внутри зоны термодинамической устойчивости воды (см. табл. 3) и, следовательно, концентрации этих металлов (их окисленной формы), порядка 1 моль/л, не выводят отвечающие им редокс-системы за пределы зоны термодинамической устойчивости воды. Это указывает на потенциальную возможность существования микроорганизмов, способных использовать указанные металлы-окислители в качестве акцепторов электронов даже при концентрациях, превышающих величину

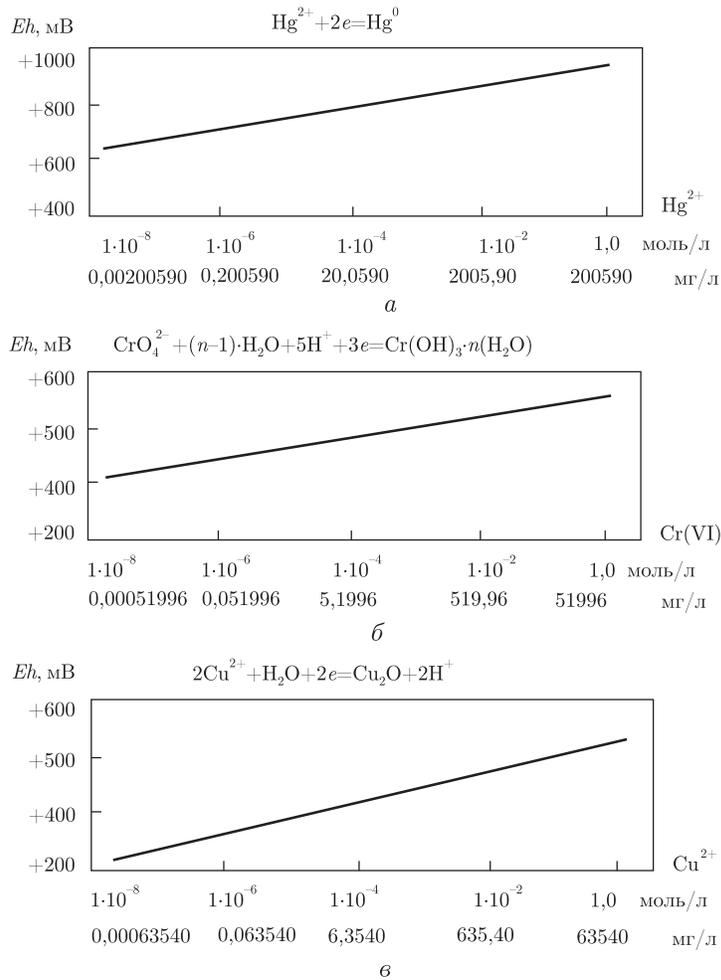


Рис. 1. Зависимость величины редокс-потенциала металла (Eh , мВ) от его концентрации в воде (моль/л и мг/л) в реакциях восстановления: а — Hg^{2+} , б — CrO_4^{2-} , в — Cu^{2+} .

$Eh = E_0 + \frac{0,0985}{n} \lg[\text{Me}]$, где E_0 — стандартный потенциал металла (В); n — количество электронов, принимающих участие в реакции; $[\text{Me}]$ — концентрация металла

1 моль/л. Иначе говоря, можно прогнозировать существование микроорганизмов, устойчивых к столь высоким концентрациям ионов CrO_4^{2-} и Cu^{2+} и использующих энергию окислительно-восстановительных превращений с их участием. Можно ожидать, что такого рода металлрезистентные микроорганизмы могут расти в присутствии этих металлов-окислителей и восстанавливать их в пределах области потенциалов термодинамической устойчивости воды.

Рассмотрим зависимость величины редокс-потенциала Eh от концентрации металла-окислителя. Значение Eh возрастает с повышением этой концентрации. При некоторой концентрации достигается критическое значение Eh , совпадающее с верхней границей зоны устойчивости воды (+814 мВ при рН 7). Для концентраций, при которых величина Eh остается в пределах этой зоны, термодинамический запрет на равновесное взаимодействие с ферментными системами микроорганизмов отсутствует. На рис. 1 показаны графики зависимости Eh от концентрации Hg^{2+} , CrO_4^{2-} и Cu^{2+} в растворе. Они рассчитаны для ди-

апазона концентрації металла від $1 \cdot 10^{-8}$ до 1,0 моль/л при умови термодинамічного рівноважя. Із графіків следує, наприклад, що для реакції $\text{Hg}^{2+} + 2e = \text{Hg}$ (см. рис. 1, а) редокс-потенціал візрастає при цьому лиш на $\Delta Eh = 236$ мВ (від +618 до +854 мВ). Для реакції $\text{CrO}_4^{2-} + (n - 1) \cdot \text{H}_2\text{O} + 5\text{H} + 3e = \text{Cr}(\text{OH})_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ при увеліченні концентрації Cr(VI) в тех же пределах редокс-потенціал візрастає лиш на 178 мВ (від +410 до +588 мВ) і не виходит за пределы зони термодинамічної устійності води (см. рис. 1, б). Для реакції $2\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O} + 2e = \text{Cu}_2\text{O} + 2\text{H}^+$ при том же увеліченні концентрації Cu^{2+} (на 8 порядків) потенціал візрастає на 442 мВ (від +48 до +490 мВ) і також остаєся в пределах указанной зони (см. рис. 1, в).

Приведенные данные свидетельствуют о том, что значение редокс-потенциала Eh и, следовательно, показатели токсичности металла-окислителя весьма слабо зависят от его концентрации (логарифмически). Изменение концентрации в 10 раз приводит к изменению значений Eh на величину, для всех редокс-систем не превышающую 59 мВ. Это позволяет с хорошей вероятностью прогнозировать существование микроорганизмов, устойчивых к высоким концентрациям металла-окислителя. Так, для Cu(II) и Cr(VI) в форме CrO_4^{2-} — вплоть до концентраций порядка 1 моль/л (что соответствует 52000 мг/л Cr(VI) и 64000 мг/л Cu(II)) отвечающие им редокс-системы остаются в пределах зоны устойчивости воды.

В случае реакции $\text{Hg}^{2+} + 2e = \text{Hg}$ значения Eh для ряда концентраций Hg(II), равных $1 \cdot 10^{-1}$ моль/л (20000 мг/л), $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л (10000 мг/л), $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л (2000 мг/л), составляют +824, +815 и +794 мВ соответственно. Первое значение Eh лежит за пределами зоны устойчивости воды, второе — почти совпадает с ее границей, третье — находится внутри этой зоны. Таким образом, критической в данном случае является концентрация Hg(II) около $5 \cdot 10^{-2}$ моль/л (10000 мг/л).

В целом, выполненные выше оценки указывают на возможность существования микроорганизмов, устойчивых к высоким концентрациям металлов-окислителей.

Полученные нами результаты по термодинамическому прогнозированию взаимодействия микроорганизмов с высокотоксичными металлами-окислителями могут быть эффективно использованы на практике. Прежде всего, на основании теоретических расчетов можно оценить принципиальную возможность роста микроорганизмов в присутствии какого-либо металла-окислителя и определить возможные метаболические пути взаимодействия микроорганизмов с металлами. Кроме того, расчеты позволяют теоретически обосновать предельно допустимые для микроорганизмов концентрации металлов, определить необходимые условия и создать селективную питательную среду для выделения металлрезистентных микроорганизмов. Наконец, металлрезистентные микроорганизмы, выделенные из природных или техногенных биотопов, могут быть использованы в природоохранных технологиях очистки промышленных сточных вод от токсичных металлов, содержащих соединения ртути, хрома, меди и других металлов.

Автори виражають признательность проф., д-ру биол. наук В. А. Романовской за научное редактирование сообщения.

1. Parker R. J., Gibson G. R., Muellor-Harvey J. Determination of substrates for sulfate-reducing bacteria within marine and estuarine sediments with different rates of sulfate reduction // J. Gen. Microbiol. — 1989. — **135**, No 1. — P. 175–187.
2. Андреев Е. И., Таширев А. Б., Смалько П. Я. Прогнозирование взаимодействия микроорганизмов с соединениями хрома на основе термодинамических расчетов // Доп. НАН України. — 2003. — № 1. — С. 149–156.

3. 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.
4. Vives-Rego J., Garcia-Lara J., Martinez J. Effect of heavy metals and urban wastes on electron transport system activity in seawater // Microbiol. Lett. – 1988. – **38**, No 151–152. – P. 117–121.
5. Таширеєв А. Б., Матвеева Н. А., Романовська В. А., Таширеєва А. А., Рокитко П. В. Полірезистентність і свєрхустойчивість к тяжєлым металлам антарктических мікроорганізмів // Доп. НАН України. – 2007. – № 11. – С. 170–175.
6. Pourbaix M. Atlas of electrochemical equilibria in aqueous solutions. – Oxford: Pergamon press, 1963. – 320 p.
7. Справочник химика / Под ред. Б. П. Никольского. – Москва; Ленинград: Химия, 1965. – 827 с.
8. Готтшальк Г. Метаболизм бактерий. – Москва: Мир, 1982. – 310 с.
9. Шлегель Г. Общая микробиология. – Москва: Мир, 1972. – 476 с.
10. Bacterial energy transduction / Ed. A. Christopper. – London; Toronto: Acad. Press, 1988. – 517 p.
11. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. – Москва: Мир, 1967. – 332 с.

Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев
Мюнхенский инновационный центр, Германия

Поступило в редакцию 01.11.2007

УДК 616.441.-006.6-092.9:615.252

© 2008

Член-корреспондент НАН України М. Д. Тронько, В. М. Пушкарьов,
Д. В. Старенький, В. В. Пушкарьов, О. І. Ковзун, І. Д. Попадюк

Вплив низьких та високих концентрацій протиракового препарату таксолу на клітини анапластичного раку щитовидної залози

We studied changes of the cell cycle and the mitochondrial membrane potential, as well as the caspase activation in response to antitumour drug Taxol on the ARO cell line of anaplastic thyroid cancer. Taxol activated the cleavage of the caspase substrate starting from a drug concentration of 5 nM. Maximum activation was observed at 25 nM, and the increase in the Taxol concentration to 100 nM resulted in the reduction of caspase activation. Concomitant to caspase activation, we observed the loss of the mitochondrial membrane potential in cells, which indicates the initiation of the mitochondrial apoptotic pathway. At a concentration of 100 nM of Taxol, most cells lost its mitochondrial membrane potential. Low Taxol concentrations (10 nM) caused changes of the cell cycle typical of apoptosis. Higher Taxol doses starting from 50 nM arrested the cell cycle at G2/M phase. Possible types of cell death induced by the treatment with low and high doses of Taxol on thyroid cancer cells are discussed.

Таксол є високоефективним протираковим препаратом, який використовується для лікування багатьох видів раку, у тому числі і злоякісних пухлин ендокринного походження [1]. Вивчаються можливості його застосування для терапії анапластичного раку щитовидної залози (ЩЗ) — найбільш агресивної форми раку людини [2, 3]. Результати досліджень свідчать про те, що низькі концентрації (5–25 нМ) таксолу ініціюють в ракових клітинах ЩЗ апоптичні процеси [3]. У той же час у клінічній практиці застосовуються набагато вищі