

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОАККУМУЛЯЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ БАКТЕРИЯМИ РОДА *BACILLUS* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕНТГЕНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА И АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Пешков С.А., Сизенцов А.Н., Никиян А.Н., Кобзев Г.И.

ФБГОУ ВПО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, Россия (410018, Оренбург, пр. Победы 13), e-mail: Darwin156@mail.ru

Методами рентгенофлуоресцентного анализа и атомно-силовой микроскопии изучена способность бактерий рода *Bacillus* аккумулировать металлы Co, Pb, Cd, Zn. Установлены минимально подавляющие концентрации поглощаемых металлов Co, Pb, Cd, Zn, Mn, Fe для каждого штамма микроорганизмов. Определены фазы роста бактерий рода *Bacillus* без металлов и в присутствии их солей. При культивировании с металлами в некоторых случаях происходило увеличение времени выхода бактерий на стационарную фазу роста. Динамика накопления металлов клетками микроорганизмов изучена методом рентгенофлуоресцентного анализа. Для изучения изменения морфологии бактерий при накоплении тяжелых металлов использовался метод атомно-силовой микроскопии. Измерены основные морфометрические показатели клеток в присутствии солей металлов и их отсутствии. Показано, что действие солей металлов на микроорганизмы приводит к уменьшению размеров клеток, замедлению их роста и образованию спор.

Ключевые слова: биоаккумуляция, соли тяжелых металлов, бактерии *Bacillus*, рентгенофлуоресцентный анализ, атомно-силовая микроскопия

ESTIMATION OF BIOACCUMULATIVE ABILITY OF HEAVY METALS BY *BACILLUS* BACTERIA WITH THE USE OF ROENTGEN-FLUORESCENT ANALYSIS AND ATOMIC FORCE MICROSCOPY

Peshkov S.A., Sizencov A.N., Nikiyan H.N., Kobzev G.I.

Orenburg State University, Orenburg, Russia (410018, Orenburg, Pobedy Avenue 13), e-mail: Darwin156@mail.ru

An ability of the *Bacillus* bacteria to accumulate heavy metals (Co, Pb, Cd, Zn) were studied by X-ray fluorescence analysis (XRF) and atomic force microscopy (AFM) methods. Minimal inhibitory concentrations of absorbed metals (Co, Pb, Cd, Zn, Mn, Fe) for each strain of microorganisms were established. Growth phases of *Bacillus* bacteria without metals and in the presence of their salts were defined. At cultivation with metals in certain cases there was an increase of time of bacteria outcome on a stationary growth phase. Dynamics of metals accumulation by microorganisms was studied by a method of the X-ray fluorescence analysis. Atomic force microscopy was used for study of bacteria morphology during heavy metals accumulation. The main morphometric parameters of cells in the presence of salts of metals and their absence were measured. It is shown that effect of salts of metals on microorganisms leads to reduction of cell sizes, deceleration of their growth and spores formation.

Keywords: bioaccumulation, salts of heavy metals, *Bacillus* bacteria, X-ray fluorescence analysis, atomic force microscopy

В настоящее время достаточно остро стоит проблема загрязнения почв металлами. Растения и микроорганизмы обладают способностью накапливать и удалять металлы [5, 7, 2]. Наибольший интерес представляют микроорганизмы, в частности бактерии, входящие в состав пробиотиков, поскольку они являются рекордсменами по аккумуляции металлов [6] и обладают рядом полезных свойств, что делает возможным их применение для коррекции функциональных состояний у животных и человека после интоксикации металлами [3]. Влияние металлов на морфологию клетки изучено недостаточно полно [1]. Одним из методов, используемых при исследовании воздействий металлов на клетку, является метод атомно-силовой микроскопии (АСМ). С помощью этого метода и электронной микроскопии можно

определить, накапливаются ли металлы на поверхности клетки или поглощаются ею. Использование метода рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) позволяет изучить динамику изменения концентрации металлов в среде и клетке.

Цель работы

Установить способность микроорганизмов рода *Bacillus* накапливать тяжелые металлы и проанализировать их влияние на клетки бактерий.

Материалы и методы

В работе использовались три пробиотических штамма бактерий рода *Bacillus*: *B. licheniformis* ВКПМ В 7038; *B. clausii*; *B. subtilis* УКМ В – 5020. В качестве регулирующих факторов использовались водорастворимые соли металлов $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – сульфат цинка, $Pb(NO_3)_2$ – нитрат свинца, $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ – сульфат кобальта, $CdSO_4 \cdot 8H_2O$ – сульфат кадмия, $MnSO_4 \cdot H_2O$ – сульфат марганца и $FeSO_4 \cdot H_2O$ – сульфат железа. Выбор таких элементов, как свинец и кадмий, определялся их большой токсичностью для клетки. Металлы цинк и кобальт выбраны как наиболее распространенные биогенные элементы.

Для определения минимально-подавляющей концентрации (МПК) использовался метод последовательных разведений. Влияние солей тяжелых металлов на рост микроорганизмов определялось по оптической плотности суспензии с помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК-КФК-2). Методики выполнения подробно описаны в статье [4].

Динамику накопления металлов клетками исследовали методом рентгенофлуоресцентного анализа (РФА). Микроорганизмы культивировали в жидкой питательной среде в течение 36 ч при 37°C. Каждые 3 ч, начиная с нулевого часа, отбирали суспензию микроорганизмов объемом 3 мл и центрифугировали. Определение проводили в супернатанте. Для анализа выбраны два наиболее токсичных металла (Co, Pb) и один биогенный (Zn). Динамику накопления кадмия измерить не удалось, так как низкие концентрации кадмия в растворе находятся вне диапазона точности измерений прибора. Марганец и железо исключены из исследования, так как слабо накапливаются микроорганизмами рода *Bacillus* и их влияние на рост незначительно. Анализ динамики накопления металлов произведен на приборе «Spectroscan-LF».

Влияние металлов на морфологию клеток микроорганизмов исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ). Бактерии культивировались в жидкой питательной среде с металлами в течение 36 ч при 37°C, после чего микроорганизмы отмывали. Суспензию микроорганизмов объемом 1 мл центрифугировали в течение 5 мин при 10 000 оборотов. После отбора супернатанта в него добавляли дистиллированную воду до первоначального объема, полученную суспензию тщательно перемешивали. Данную процедуру повторяли 3–4 раза. Это позволило отделить бактерии от среды и металлов, оставшихся в растворе.

С целью определения точной концентрации бактерий, необходимой для нанесения на подложку, предварительно проводили разведения микроорганизмов. Бактерии выращивались без металлов в жидкой питательной среде, затем отмывались. Процедуру проводили 3–4 раза вышеописанным способом. После последнего центрифугирования к осадку в пробирке добавляли 100 мкл дистиллированной воды, увеличивая ее количество на 100 мкл в следующих пробирках, добиваясь разведения 1:1, 1:2, 1:3 и т.д. Наилучшей концентрацией после анализа на АСМ оказалась 1:3. В дальнейшем эта концентрация использовалась для приготовления всех препаратов для проведения экспериментов методом АСМ. Каплю полученной суспензии (30 мкл) наносили на свежий скол слюды и давали высохнуть. В качестве регулирующих факторов выбраны соли свинца как наиболее токсичного и сравнительно сильно аккумулируемого металла.

Полученные образцы сканировались в контактном режиме на атомно-силовом микроскопе СММ-2000 (ОАО «Завод ПРОТОН-МИЭТ», Россия). В работе использовались кантилеверы MSCT-AUNM («Veeco Instruments Inc.», США) микроскопа с жесткостью балки 0,03 Н/м и радиусом кривизны иглы порядка 10 нм. Количественный морфометрический анализ полученных изображений проводили с использованием штатного программного обеспечения микроскопа.

Обсуждение результатов

Ранее установлены МПК и влияние металлов на рост микроорганизмов для двух штаммов *Bacillus*: *B. licheniformis* 7048 и *B. subtilis* 7092 [4].

Из результатов, представленных в таблице 1, видно, что металлом, оказывающим наименьшее влияние на рост микроорганизмов, является свинец. Так, *B. subtilis* УКМ В-5020 растут при концентрации от 0,02 М/л, а *B. licheniformis* 7038 и *B. clausii* начинают рост при 0,005 М/л. Наиболее токсичным металлом оказался кадмий. Так, микроорганизмы *B. licheniformis* 7038 растут при концентрации $3,9 \cdot 10^{-5}$ М/л, микроорганизмы *B. subtilis* УКМ В-5020 растут при концентрации $1,5 \cdot 10^{-4}$ М/л, а *Bacillus clausii* – при $7,8 \cdot 10^{-5}$ М/л.

Анализ полученных данных позволяет сделать вывод, что из всех исследуемых микроорганизмов рода *Bacillus* самым чувствительным штаммом к используемым металлам является *B. clausii*.

Таблица 1

Минимально-подавляющие концентрации металлов

Исследуемые штаммы	МПК солей тяжелых металлов, М/л					
	Mn	Pb	Zn	Co	Cd	Fe
<i>B. clausii</i>	0.0025	0.005	0.000156	0.00125	3.91E-05	0.00125
<i>B.licheniformis</i> 7038	0.000625	0.005	0.0025	0.00125	3.91E-05	0.005

<i>B. subtilis</i> 5020	0.000313	0.02	0.000625	0.00125	0.000156	0.005
-------------------------	----------	------	----------	---------	----------	-------

С помощью фотоэлектроколориметра (ФЭК) установлено время наступления стационарной фазы при культивировании бактерий без солей металлов. Оно составляет для *B. licheniformis* 7038 и *B. clausii* 27 ч, а для *B. subtilis* УКМ В-5020 – 24 ч. Наступление стационарной фазы в присутствии солей металлов наблюдается через 27–36 ч культивирования. Для каждого штамма бактерий влияние солей металлов на рост различно. В частности, для *B. licheniformis* 7038 наступление стационарной фазы в отношении кадмия и цинка происходит через 33 ч культивирования, для кобальта, марганца и железа – через 30 ч, свинец влияния не оказывает. Наступление стационарной фазы для *B. clausii* в присутствии солей кадмия, кобальта, марганца, железа происходит через 33 ч, цинка – 30 ч, а свинца – 36 ч культивирования. Для *B. subtilis* УКМ В-5020 стационарная фаза наступает: в отношении кобальта, цинка и свинца через 33 ч культивирования, а в отношении кадмия, марганца и железа – 30 ч.

Анализ данных показывает, что в целом ионы металлов оказывают отрицательное воздействие на микроорганизмы и тормозят наступление стационарной фазы.

Для исследования методом РФА использовался штамм бактерий *B. licheniformis* 7038. Этот штамм обладает высокой устойчивостью к повышенным концентрациям металлов, в то время как другие штаммы бактерий при аналогичных значениях погибают. Рабочая концентрация металлов выбрана исходя из данных МПК.

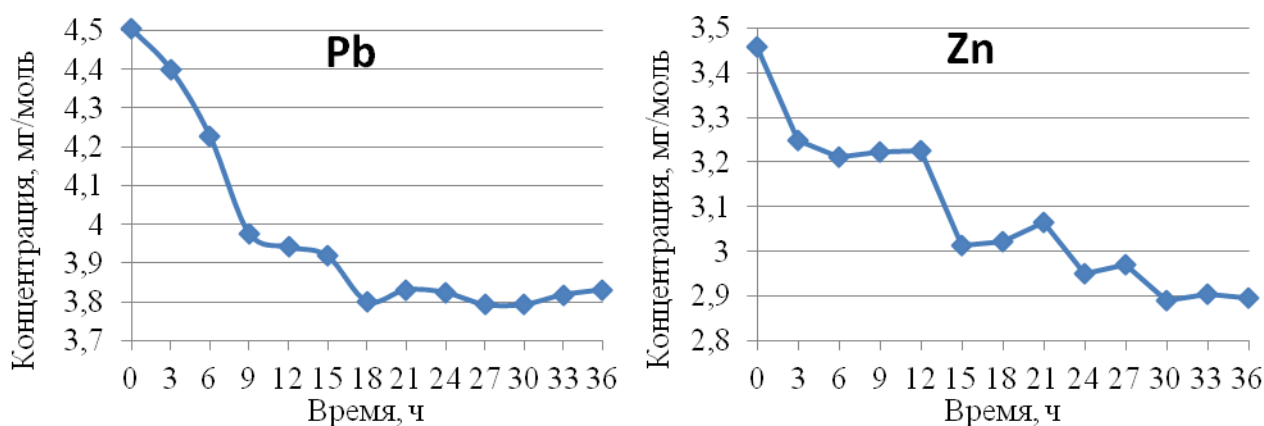


Рис. 1. Изменение концентрации металла в супернатанте от времени. Анализ проведен методом РФА. Слева культивирование проводилось с солями свинца, справа — с солями цинка.

По полученным данным РФА (рис. 1) можно сделать вывод, что концентрация металлов в растворе уменьшается с ростом биомассы бактерий. Изменение концентрации кобальта в среде со временем происходит незначительно. Так как данные значения лежат за пределами погрешности прибора, то зафиксировать уменьшение концентрации кобальта не удалось.

Для анализа на АСМ выбран штамм *B. licheniformis* 7038. На основании ранее полученных данных МПК, РФА, а также с помощью ФЭК выбран только один металл, наиболее аккумулируемый и оказывающий наибольшее влияние на клетки микроорганизмов, – свинец. Концентрация свинца выбрана исходя из полученных данных МПК. Были получены серии изображений опытных и контрольных образцов так, чтобы общее число анализируемых микроорганизмов в каждой группе составляло не менее 30 штук. Далее была изучена морфология клеток, количественные характеристики которой представлены в таблице 2.

Таблица 2

Морфологические характеристики *B. licheniformis* 7038

	Длина, мкм	Ширина, мкм	Высота, нм
Контроль (без Me)	3,9445±0,2728	2,1592±0,0631	512,66±21,1274
Опыт (с солями Pb)	3,3005±0,3544	1,5596±0,1026	538,13±92,5570

Результаты, представленные в таблице, указывают на изменение размеров микроорганизмов опытной группы. Так, в присутствии солей свинца происходит уменьшение размеров клеток. Расчет t-критерия Стьюдента показал, что полученное эмпирическое значение находится в зоне значимости ($p \leq 0,01$).

Кроме количественных, обращают на себя внимание качественные изменения в опытной группе. Как видно из рисунка 2а₂, на бактериях накапливаются частицы, по структуре которых их можно отнести к комплексам металла с органическими молекулами – молекулами среды либо веществами, выделяемыми клеткой в среду. Также на рисунке 2а₂ видны структуры, по форме похожие на споры. Они встречаются с частотой 1 структура на 20 обычных клеток микроорганизмов и имеют более округлые формы.

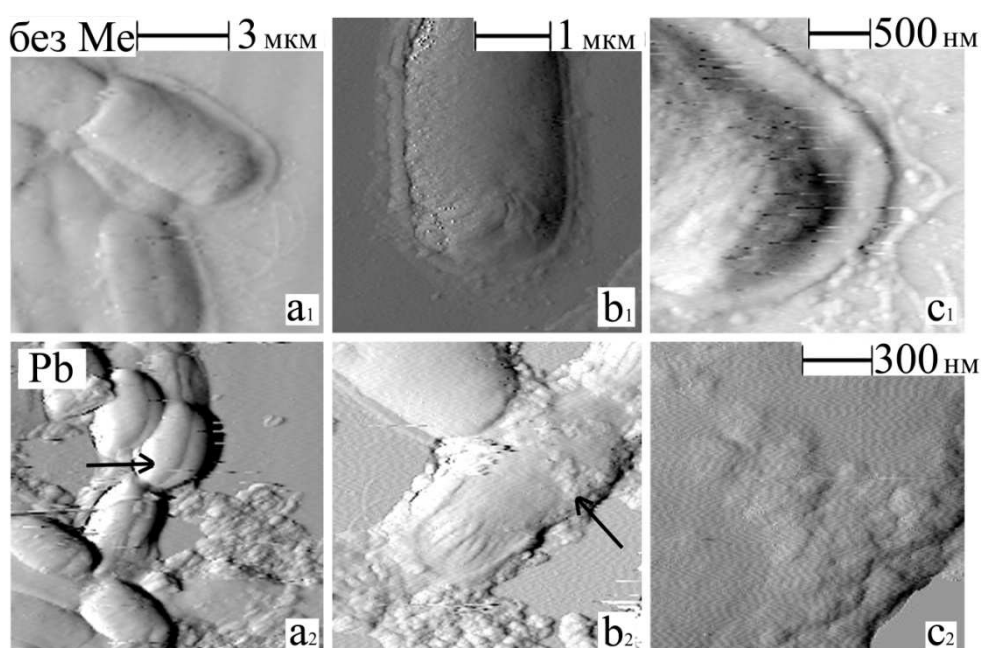


Рис. 2. Фотографии микроорганизмов без металлов и со свинцом. Сканирующая атомно-силовая микроскопия. *a*₁, *b*₁, *c*₁, — без металлов; *a*₂, *b*₂, *c*₂ — в присутствии солей свинца

Вывод

Исследования методами рентгенофлуоресцентного анализа и атомно-силовой микроскопии показали, что бактерии рода *Bacillus* накапливают металлы. При этом наиболее устойчивым к повышенным концентрациям металлов среди всех исследуемых нами бактерий является штамм *B. licheniformis* 7038. Однако локализация накопления металлов до конца не установлена. В случае со свинцом можно лишь судить о значительной его адсорбции на поверхности клетки, но это не исключает аккумуляцию свинца внутри. Для установления локализации накопления других металлов бактериями требуются дополнительные исследования.

Список литературы

- 1 Безруков, М. Г., Белоусова М. А., Сергеев А. В. Взаимодействие металлов с белками // Успехи химии. – 2000. – Т. 51. – № 4. – С. 696–711.
- 2 Букреева В.Ю., Грабович М.Ю., Епринцев А.Т. Сорбция коллоидных соединений оксидов железа и марганца с помощью железобактерий на песчаных загрузках очистных сооружений водоподъемных станций // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2009. – Т. 9. – № 4. – С. 506–514
- 3 Сизенцов А.Н., Исайкина Е.Ю., Кван О.В., Сизова Е.А. Эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при лечении экспериментальной интоксикации медью // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2015. – Т. 51 – №. 1. – С. 149–152.
- 4 Сизенцов А. Н., Пешков С.А., Нугаманова Э.М. Влияние тяжелых металлов на рост пробиотических штаммов *E.coli* М-17, *E.faecium*, *L.acidophilus*, *L.bulgaricus* и бактерий рода *Bacillus* в условиях *in vitro* // Вестник ОГУ. – 2011. – Т. 131. – № 12. – С. 358–360.
- 5 Costa, A. C., Duta F. P. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *B.cereus*, *B.sphaericus* and *B.subtilis* // Braz. J. Microbiol. – 2001. – V. 32. – №.1. – P. 159–175.
- 6 Lodeiro P. et al. Biosorption of cadmium by biomass of brown marine macroalgae // Bioresource Technology. – 2005. – V. 96. – №. 16. – P. 1796–1803.
- 7 Montes, D. Removal of mercury (II) from aqueous solutions of non-viable cells of *Bacillus* sp. // Biotechnology. – 2006. – V. 97. – №. 7. – P. 1907–1911.

Рецензенты:

Барышева Е.С., д.м.н., доцент, заведующая кафедрой биохимии и молекулярной биологии

Оренбургского государственного университета, г. Оренбург;

Лебедев С.В., д.б.н., профессор кафедры биотехнологии животного сырья и аквакультуры

Оренбургского государственного университета, г. Оренбург.