



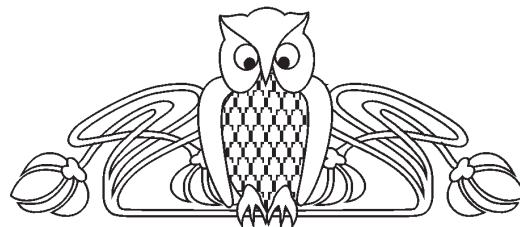
- тур культивируемого ксилотрофного базидиомицета *Lentinus edodes* // Микология и фитопатология. 2008. Т. 42, № 2. С. 173–177.
16. *Остерман Л. А.* Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. 288 с.
17. *Sakamoto Yu., Nakade K., Sato T.* Characterization of the post-harvest changes in gene transcription in the gill of the *Lentinula edodes* fruiting body // *Curr Genet.* 2009. Vol. 55. P. 409–423.
18. *Trumbly R. J.* Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular Microbiology.* 1992. Vol. 6, № 1. P. 15–21.
19. *Huang G. H., Nie X. Y., Chen J. Y.* CaMac1, a *Candida albicans* copper ion-sensing transcription factor, promotes filamentous and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae* // *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2006. Vol. 38, № 3. P. 213–220.
20. *Roeder R. G.* The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II // *Trends Biochem. Sci.* 1996. Vol. 21, № 9. P. 327–335.
21. *Muraguchi H., Fujita T., Kishibe Y., Konno K., Ueda N., Nakahori K., Yanagi S.O., Kamada T.* The *exp1* gene essential for pileus expansion and autolysis of the inky cap mushroom *Coprinopsis cinerea* (*Coprinus cinereus*) encodes an HMG protein // *Fung Genet. Biol.* 2008. Vol. 45. H. 890–896.

УДК 579.22:574.23

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ БИОАККУМУЛЯЦИИ КАДМИЯ (II) РИЗОБАКТЕРИЕЙ *BACILLUS* sp. 14

И. Ю. Сунгурцева¹, Е. В. Любунь²,
А. Ю. Муратова², Е. В. Плешакова¹

¹Саратовский государственный университет
²Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов РАН, Саратов
E-mail: airinmind@yandex.ru



Для изучения устойчивости к кадмию (II) у выделенного штамма ризобактерии *Bacillus* sp. 14 было проведено исследование по биоаккумуляции данного металла. Показана аккумулирующая способность микробных клеток в экспоненциальной фазе роста микроорганизма. Выяснена доминирующая роль поверхности растущих клеток *Bacillus* sp. 14 в устойчивости к кадмию (II).

Ключевые слова: ризобактерии, *Bacillus*, кадмий, биоаккумуляция.

Bioaccumulation of Cadmium (II) by *Bacillus* sp. 14 Rhizobacteria

I. U. Sungurtseva, Ye. V. Lyubun,
A.Y. Muratova, E. V. Pleshakova

To study the resistance of isolated rhizobacterium *Bacillus* sp. 14 to cadmium (II), bioaccumulation of the metal by this microorganism was investigated. It was shown that accumulation of cadmium (II) occurs during the exponential phase of the microorganism's growth. The predominant role of the extracellular surface of the growing cells *Bacillus* sp. 14 in the cadmium (II) resistance was clarified.

Key words: rhizobacteria, *Bacillus*, cadmium, bioaccumulation.

DOI: 10.18500/1816-9775-2015-15-4-74-77

Одной из важнейших проблем современности является повсеместное загрязнение верхних слоев почв тяжелыми металлами, в частности кадмием. Кадмий токсичен для живых организмов

и относится к первому классу опасности среди тяжелых металлов. Аккумулируясь в сельскохозяйственных культурах, кадмий, таким образом, перемещается вверх по пищевой цепи и вызывает различные заболевания животных и человека.

Недорогим и экологичным решением проблемы является фиторемедиация – технология очистки загрязненных почв с использованием растений для адсорбции, аккумуляции и детоксификации загрязняющих агентов в ходе физических, химических и биологических процессов. Однако зачастую гипераккумуляторы – это растения, медленно растущие и медленно аккумулирующие металл [1]. Поэтому в настоящее время для растений активно ведется поиск способов стимуляции продуктивности и адсорбции тяжелых металлов.

Известны устойчивые к действию кадмия микроорганизмы, которые исследуются на способность к колонизации корней растений и стимуляции их роста [2–4]. Таким образом, наряду с выбором растения также важно создание растительно-микробных ассоциаций, эффективных в процессе фиторемедиации. Для создания подобных эффективно функционирующих растительно-микробных сообществ необходимо изучение устойчивости микроорганизмов.



В связи с этим целью данной работы является изучение динамики биоаккумуляции кадмия (II) устойчивыми к данному металлу микроорганизмами.

Материалы и методы

Изучение динамики поглощения кадмия проводили на примере выделенного штамма ризобактерии *Bacillus* sp. 14, проявляющего устойчивость к металлу. Данный микроорганизм был выделен из корневой зоны растения-гипераккумулятора кадмия – *Solanum nigrum* L., произрастающего на загрязненной тяжелыми металлами территории. Выделение и определение устойчивости данной бактерии к кадмию изложены ранее [5].

Для изучения поглощения кадмия микроорганизмом отмытые от среды клетки суточной культуры в виде суспензий переносили в 0,25-литровые колбы Эрленмейера с 50 мл стерильной жидкой среды ВАР [6] до конечной концентрации клеток 0,2 единицы оптической плотности, измеренной на фотоэлектроколориметре КФК-2. Опытные среды содержали кадмий (II) в концентрации 0,0002 моль/л. Для контроля роста микроорганизма использовали среду, не содержащую металл. Культивирование проводили при температуре 29°C в условиях аэрации на качалке при 160 об/мин. Образцы для анализа кадмия отбирали, согласно кривой роста штамма *Bacillus* sp. 14 в точках, соответствующих лаг-фазе (0 ч), ранней и поздней фазе экспоненциального роста (6 и 24 ч) и в стационарной фазе (31 ч). Содержание кадмия определяли в среде (после осаждения клеток центрифугированием с использованием центрифуги Eppendorf 5810R при 10000 об/мин в течение 10 мин), в полисахаридном слое поверхности клеток (в смыве раствором хелатора ЭДТА с поверхности клеток) и, собственно, в биомассе отмытых клеток [7].

Анализ содержания кадмия (II) в собранных образцах проводили с помощью атомно-абсорбционного спектрометра Thermo SCIENTIFIC ICE 3000 SERIES. Для образцов биомассы предварительно проводилась пробоподготовка с помощью микроволновой системы закрытого типа MARS Xpress при мощности 1600 Вт, 10 мин при температуре 170°C.

Результаты и их обсуждение

На рисунке, а представлена кривая роста микробного штамма *Bacillus* sp. 14 на среде ВАР без кадмия.

Поглощение кадмия культурой *Bacillus* sp. 14 представлено на рисунке, б. Из графика

видно, что клетки данной культуры удерживают наибольшее количество металла в течение 6 ч культивирования, к 24 ч наблюдается резкое снижение содержания кадмия, а к 31 ч он уже практически отсутствует в биомассе.

Анализ содержания металла во фракции ЭДТА показал резкое увеличение его содержания к 6 ч культивирования, далее значения практически не изменялись (рисунок, в). На графике видно небольшое увеличение количества кадмия к 24 ч, а к 31 ч – небольшое снижение.

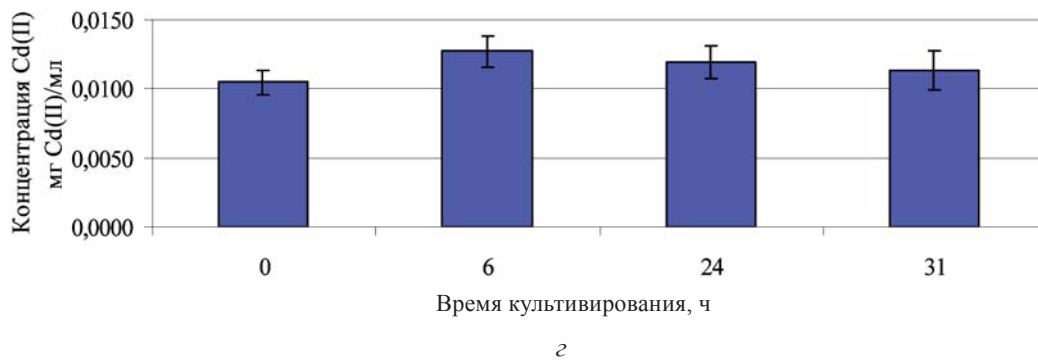
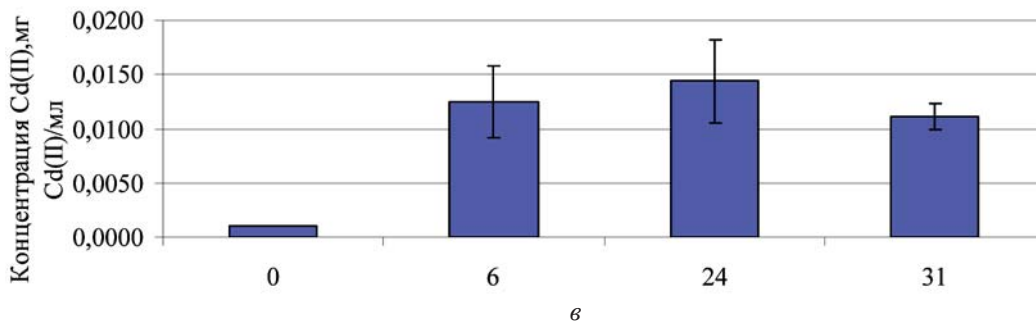
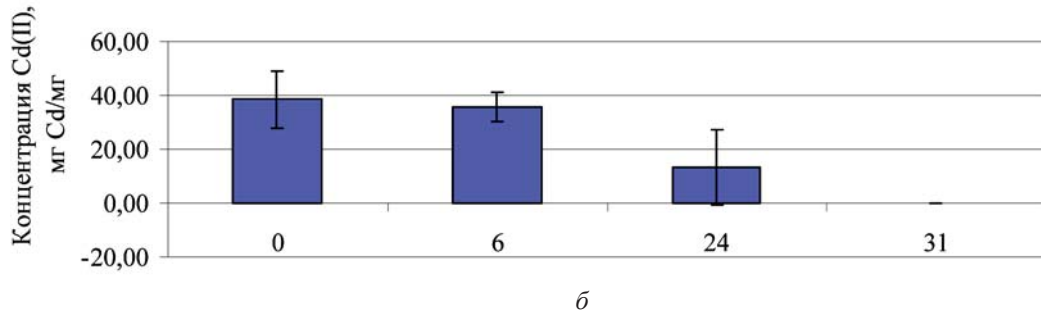
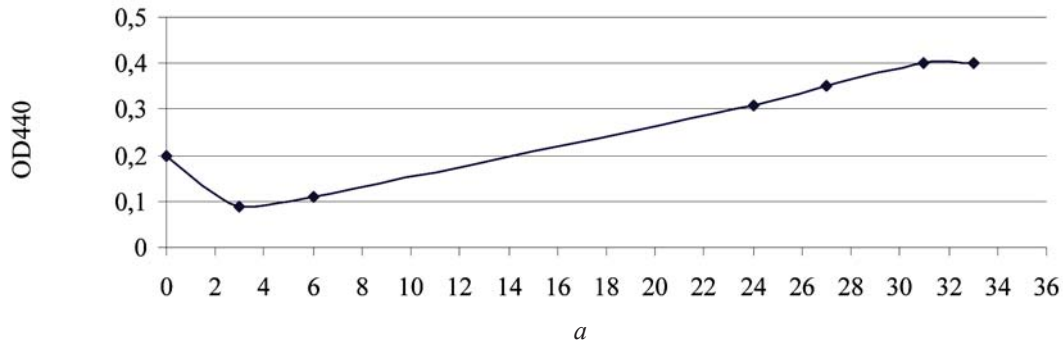
Поверхностная адсорбция металла для *Bacillus* sp. 14 хорошо выражена на протяжении всей экспоненциальной фазы роста, а к стационарной фазе количество металла сокращается. Результаты свидетельствуют о способности клеток ризосферной культуры *Bacillus* sp. 14 задерживать кадмий только в ранней фазе экспоненциального роста. Изменения его содержания в культуральной жидкости, очевидно, связаны с перемещением металла между другими фракциями.

Количество кадмия в культуральной жидкости (рисунок, г) изменяется незначительно: до 6 ч наблюдается увеличение, а после 6 ч и до 31 ч – снижение.

Согласно опубликованным данным, исследования, проведенные на культуре *Bacillus thuringiensis* DM55 в присутствии 0,00025 моль/л кадмия, также показали, что наибольшее количество кадмия аккумулируется биомассой именно с начала культивирования и до ранней фазы экспоненциального роста [8]. Результаты исследования по биоаккумуляции кадмия, проведенные на культурах *Pseudomonas putida* КТ2440 и *Pseudomonas putida* Corvallis, так же как и в данном исследовании, выявили доминирующую роль поверхности клеток [9].

Изучение нами ранее аккумуляции кадмия (II) ризобактерией *Bacillus* sp. 13 также показало [5], что значительное количество металла поступает из культуральной жидкости с начала культивирования до ранней фазы экспоненциального роста на поверхность биомассы по сравнению с количеством поступившего кадмия внутрь клеток. Максимум поглощения кадмия биомассой наблюдается в поздней фазе экспоненциального роста, а к стационарной фазе он почти полностью выводится из клеток на поверхность и отчасти в окружающую питательную среду [5].

Интересно, что подобный механизм напоминает описанный в работе F. Huang с соавторами механизм устойчивости для *Bacillus cereus* RC-1 под влиянием концентраций кадмия, ниже гомеостатической концентрации кадмия,



Кривая роста *Bacillus* sp. 14 на среде ВАР без кадмия (II) (а) и результаты исследования динамики биоаккумуляции кадмия ризобактериями *Bacillus* sp. 14: содержание кадмия (II): б – в клеточной биомассе; в – в смывах ЭДТА с клеток *Bacillus* sp. 14; г – в культуральной жидкости *Bacillus* sp. 14

составляющей 20 мг/л [9]. Однако рабочая концентрация настоящего исследования (22,4 мг/л) практически не отличается от гомеостатической.

Ионы кадмия, связываясь с поверхностными веществами, выделяемыми клетками ри-

зобактерии, создают барьер. Таким образом, иммобилизованные на поверхности клетки ионы металла не дают остальным ионам кадмия, находящимся в окружающей среде, проникнуть внутрь [10].



Литературные данные свидетельствуют о важности отрицательных зарядов на поверхности клеток. Именно электростатическое взаимодействие положительно заряженных ионов кадмия и отрицательных зарядов соединений на поверхности клеток обуславливают биосорбцию металла [10]. В частности, для *Bacillus cereus* RC-1 было выяснено, что под воздействием 20 мг/л (0,2 ммоль) кадмия на протяжении всей экспоненциальной фазы роста культуры на поверхности клеток возрастает количество отрицательных зарядов. Причем данные исследований позволили раскрыть природу этих взаимодействий: максимальное количество ионов кадмия связывается ОН-группами глюкозы и СООН-группами белков [7].

Заключение

В ходе проведенного нами исследования было выяснено, что клетки ризосферной культуры *Bacillus* sp. 14 способны поглощать кадмий в течение лаг-фазы и до ранней экспоненциальной фазы роста. Затем металл мигрирует на поверхность клеток.

Следует отметить, что интенсивная адсорбция металла на поверхности клеток у *Bacillus* sp. 14 наблюдается на протяжении всей фазы экспоненциального роста.

Сопоставив результаты исследования динамики биоаккумуляции кадмия (II) культурой *Bacillus* sp. 14 с результатами литературных источников, можно предположить, что отрицательные заряды на поверхности клеток ризосферной культуры играют важную роль в ее устойчивости к кадмию (II).

Список литературы

1. Marchiol L., Fellet G., Perosa D., Zerbi G. Removal of trace metals by *Sorghum bicolor* and *Helianthus annuus* in a site polluted by industrial wastes : a field experience // Plant Physiology and Biochemistry. 2007. Vol. 45, № 5. P. 379–387.
2. Yu X., Ai C., Xin L., Zhou G. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium wilt* and promotes the growth of pepper // Europ. J. of Soil Biology. 2011. Vol. 47, № 2. P. 138–145.
3. Chan L., Luo S., Xiao X., Guo H., Chen J., Wan Y., Li B., Xu T., Xi Q., Rao C., Liu C., Zeng G. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils // Appl. Soil Ecology. 2010. Vol. 46, № 3. P. 383–389.
4. Luo S., Xu T., Chen L., Chen J., Rao C., Xiao X., Wan Y., Zeng G., Long F., Liu C., Liu Y. Endophyte-assisted promotion of biomass production and metal-uptake of energy crop sweet sorghum by plant-growth-promoting endophyte *Bacillus* sp. SLS18 // Appl. Microbiology and Biotechnology. 2012. Vol. 93, № 4. P. 1745–1753.
5. Никифорова [Сунгурцева] И. Ю., Любунь Е. В., Плевакова Е. В., Муратова А. Ю. Скрининг и изучение ризобактерий, устойчивых к кадмию // Бюл. Оренбург. науч. центра УрО РАН. 2014. № 3. 11 с. URL: <http://www.elmag.uran.ru>.
6. Angle J. S., Chaney R. L. Cadmium resistance screening in nitilotriacetate-buffered minimal media // Appl. and Environmental Microbiology. 1989. Vol. 55, № 8. P. 2101–2104.
7. Huang F., Guo C.L., Lu G. N., Yi X. Y., Zhu L. D., Dang Z. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism // Chemosphere. 2014. Vol. 81, № 7. P. 904–910.
8. El-Helow E. R., Sabry S. A., Amer R. M. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations // Biometals. 2000. Vol. 13, № 4. P. 273–280.
9. Pabsta M. W., Charles D. M., Christian O. D., Anne J. A., Joan E. M. Defining the surface adsorption and internalization of copper and cadmium in a soil bacterium, *Pseudomonas putida* // Chemosphere. 2010. Vol. 81, № 7. P. 904–910.
10. Huang F., Danga Z., Guoa C-L., Lua G. -N., Guc R. R., Liud H.-J., Zhang H. Biosorption of Cd (II) by live and dead cells of *Bacillus cereus* RC-1 isolated from cadmium-contaminated soil // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2013. Vol. 10, № 7. P. 11–18.