

ISSN 2304-9081

Учредители:
Уральское отделение РАН
Оренбургский научный центр УрО РАН

Бюллетень
Оренбургского научного центра
УрО РАН
(электронный журнал)



2014 * № 3

On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

© Коллектив авторов, 2014

579.22:574.23

И.Ю. Никифорова¹, Е.В. Любунь², Е.В. Плешакова¹, А.Ю. Муратова²

СКРИНИНГ И ИЗУЧЕНИЕ РИЗОБАКТЕРИЙ, УСТОЙЧИВЫХ К КАДМИЮ

¹ Национальный исследовательский Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

² Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов, Россия

Цель. Провести скрининг и изучение устойчивости ризобактерий к кадмию (II).

Материалы и методы. Произведен скрининг устойчивых к кадмию (II) ризобактерий. Для проявивших устойчивость штаммов определены значения максимальной толерантной концентрации (МТК) и минимальной ингибирующей концентрации металла (МИК). Произведена первичная идентификация выделенных штаммов. Исследована биоаккумуляция кадмия (II) одной из полученных в ходе скрининга ризобактерий.

Результаты. Из 17 выделенных штаммов устойчивость к металлу проявили 3, два из которых принадлежат к роду *Bacillus*, один – к *Arthrobacter*. Значения МТК и МИК составили, соответственно для *B. sp.13* – 1,2 и 1,4 ммоль, для *B. sp. 14* – 0,5 и 1 ммоль. *A. sp. 5* в ходе исследования утратил устойчивость к кадмию (II). Выявлена способность клеток *B. sp. 13* к аккумуляции ионов кадмия (II) в фазе экспоненциального роста.

Заключение. Результаты исследования предполагают возможность использования выделенных штаммов *Bacillus sp. 13* и *14* в фиторемедиации загрязненных кадмием (II) почв.

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

I.U. Nikiforova¹, Ye.V. Lyubun², E.V. Pleshakova¹, A.Y. Muratova²

SCREENING AND INVESTIGATION OF CADMIUM (II) RESISTANT RHIZOBACTERIA

¹ National Research Saratov State University N.G. Chernyshevskiy, Saratov, Russia

² Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS, Saratov, Russia

Objective. Screening and investigation of cadmium (II)resistant rhizobacteria.

Materials and methods. We produced screening and investigation of cadmium (II) resistant rhizobacteria. Maximal tolerant concentrations (MTC) and minimal inhibitory concentrations (MIC) of the metal were determined for these strains. The selected strains were initially identified. Bioaccumulation of cadmium (II) by one of the cadmium resistant rhizobacteria were studied.

Results. 3 of the 17 initially obtained strains showed metal resistance. 2 of them identified as being *Bacillus*, 1 of them – as being *Arthrobacter*. MTC and MIC were determined, respectively for *B. sp.13* – 1.2 and 1.4 mM, for *B. sp. 14* – 0.5 and 1 mM. *A. sp. 5* has lost its resistance to cadmium (II) during the study. Clarified the ability of *Bacillus sp. 13* and *14* cells to accumulate cadmium (II) in the phase of its exponential growth.

Conclusions. Investigation results suggest option to be exploited for phytoremediation of the cadmium (II) polluted soils.

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

Ведение

Проблема антропогенного загрязнения почв тяжелыми металлами возникла вследствие развития промышленности. Локальное вовлечение значительного количества тяжелых металлов в природный круговорот элементов оказывает токсическое влияние на живые организмы, в том числе и на человека [1].

Кадмий относится к первому классу опасности среди тяжелых металлов. Источниками загрязнения кадмием являются, в основном, металлургические заводы и гальваническое производство, а также сжигание твердого и жидкого топлива [2].

Множество научных работ посвящено проблеме очистки почв от тяжелых металлов. Имеются также и технические разработки очистительных конструкций. Однако на сегодняшний день наиболее экологичным и экономически выгодным решением является фиторемедиация – использование растений и ассоциированных с ними ризобактерий для очистки загрязненной среды. Исследование микроорганизмов, устойчивых к тяжелым металлам, и механизмов их воздействия на растения-аккумуляторы чрезвычайно важно для повышения эффективности процесса фиторемедиации [3].

Целью данной работы явились скрининг и изучение устойчивости ризобактерий к кадмию (II).

Материалы и методы

Выделение устойчивых к кадмию (II) ризобактерий и их характеристика. Микроорганизмы выделяли из ризосферы растений, произрастающих на загрязненной почве, и, по литературным данным, обладающих способностью к гипераккумуляции кадмия (II) – паслен черный (*Solanum nigrum* L.) и череда трехраздельная (*Bidens tripartita* L.) [1, 4].

Для выделения микроорганизмов переносили навеску (1 г) ризосферной почвы в колбы со 100 мл стерильной жидкой питательной среды ВАР и встряхивали на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре и 160 об/мин, после чего из полученной суспензии готовили десятикратные разведения: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . По 0,1 мл из разведений 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} переносили в чашки Петри на поверхность мясопептонного агара и инкубировали в термостате при 28-30°C в течение 5 суток. Однотипные колонии принимали за колонии одного микробного вида и отсеивали в чистую культуру для дальнейшего исследования.

Для проверки устойчивости к кадмию (II) выделенных штаммов чистые культуры бактерий высевали на агаризованную модифицированную среду ВАРМ (buffered arabinose-MES medium). Состав данной среды был следующим (ммоль): Na_2HPO_4 – 0,1; NH_4Cl – 1; CaCl_2 – 1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1; NaH_2PO_4 – 0,1 с добавлением глюкозы 0,1%, 1 мл/л раствора микроэлементов и раствора хелатора металлических ионов – нитрилотриацетата (НТА) в концентрации 0,108 ммоль. При необходимости среду уплотняли, добавляя агар-агар в концентрации 2,5%.

Раствор микроэлементов содержал (ммоль): $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,0025; ZnCl_2 – 0,0025; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,002; H_3BO_3 – 0,01; MoO_3 – 0,0002; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0005; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,0005 [5].

В опытные среды добавляли 0,2 ммоль кадмия (II) в виде $\text{CdCl}_2 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$, контрольные среды не содержали металла. Засеянные чашки Петри культивировали в термостате при 28-30°C в течение 3 суток.

У устойчивых к кадмию (II) штаммов были изучены культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки для первичной их идентификации согласно определителю Берджи [6, 7]. Для выяснения особенностей строения исследуемых ризобактерий проведено окрашивание и изучение их препаратов с помощью светового микроскопа Leica DM 2500 при тысячекратном увеличении. Окрашивание проводилось по методикам Грама и Шеффера-Фултона (для выяснения наличия спор) [8, 9].

Для штаммов бактерий, проявивших устойчивость к кадмию (II), определяли следующие показатели устойчивости ризобактерий к этому металлу: максимальная толерантная концентрация (МТК) и минимальная ингибирующая концентрация (МИК). МТК – это показатель устойчивости бактериальной культуры на действие вещества, равный его максимальной концентрации, при которой наблюдается рост бактерий. МИК – это показатель действия вещества на бактериальную культуру, равный его минимальной концентрации, при которой происходит полное угнетение роста бактерий [10, 11].

Микроорганизмы, взятые из суточных культур, культивировали в жидкой среде ВАРМ с добавлением Cd (II) в концентрации 0-2 ммоль. Пробирки концентрационного ряда засеивали суспензиями исследуемых микроорганизмов до 0,2 ед. опт. пл. (при длине волны $\lambda=440$ нм фотоэлектроколориметра КФК-2) и инкубировали в термостате при 28-30°C в течение 2 суток, после чего оценивали рост микроорганизмов, вновь измеряя оптическую плотность

микробных суспензий. МТК определяли как концентрацию металла в среде в той последней пробирке, где еще наблюдался рост микроорганизмов. МИК определяли как концентрацию металла в той первой пробирке, где рост микроорганизмов был меньше, чем в предыдущей.

Изучение поглощения (биоаккумуляции) кадмия (II) проводили на одном из выделенных ризосферных штаммов – 13, который проявлял устойчивость к металлу. Отмытую от среды суточную культуру в виде суспензии переносили в колбы объемом 0,25 л с 50 мл стерильной жидкой среды ВМ до 0,2 ед. опт. пл. Опытные среды содержали кадмий (II) в концентрации 0,2 ммоль. Также использовали контрольные среды двух видов – не содержащие металл (для контроля роста микроорганизма в среде) и содержащие металл, но не инокулированные ризобактериями (для определения потерь кадмия). Колбы с опытными и контрольными средами встряхивали на шейкере при комнатной температуре и 160 об/мин. В течение последующих 48 часов с помощью центрифугирования (Eppendorf centrifuge 5810R) собирали супернатанты (надосадочная культуральная жидкость, смыв с поверхности клеток) и клеточную биомассу [12].

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 минут при температуре 170°C.

Результаты и обсуждение

Выделение устойчивых к кадмию (II) ризобактерий и их характеристика. Из ризосферы растений-гипераккумуляторов кадмия (II) было выделено 17 штаммов. В результате произведенного скрининга способность к росту в присутствии 0,2 ммоль кадмия (II) показали штамм 5, выделенный из ризосферы *V. tripartita* L., а также штаммы 13 и 14, выделенные из ризосферы *S. nigrum* L. Для данных микроорганизмов дано описание их культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков (табл. 1).

Микроскопия окрашенных препаратов показала сходство в строении штаммов 13 и 14: оба представлены грамположительными палочками с овальной спорой, практически не раздувающей клетку и занимающей центральное положение. Штамм 5 представлен неспорообразующими грамотриабельными палочками неправильной формы.

Таблица 1. Культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки выделенных ризосферных бактерий, проявивших устойчивость к камню (II)

Признак	Лабораторный шифр штамма бактерий		
	5	13	14
1	2	3	4
Характеристика колонии	Круглая с фестончатым краем, плоский профиль, крупная (15-20 мм в диаметре), поверхность гладкая с прожилками, блестящая, непрозрачная, непросвечивающая в центре, структура неоднородная, цвет грязно-белый, консистенция сухая	Неправильной формы, плоский профиль, крупная (40 мм в диаметре), поверхность шероховатая, матовая, непрозрачная, просвечивающая, структура однородная, цвет бежевый, консистенция плотная	Неправильной формы, плоский профиль, средняя (7-10 мм в диаметре), поверхность шероховатая, матовая, непрозрачная, просвечивающая, структура однородная, цвет грязно-белый, консистенция сметанобразная
Форма и размер клеток	Палочки неправильной формы	Палочки, 2–3 Ч 1 нм	Палочки, 2–3 Ч 1 нм
Окраска по Граму	+/-	+	+
Наличие спор	–	+	+
Рост на МПБ	+/-	+	+
Рост на МПБ + 2,5% NaCl	+	+	+
Рост на МПБ + 6,5% NaCl	+	+	+
Подвижность (на среде Пешкова)	+	–	–
Продукция:			
пиоцианина	–	–	–
флуоресцина	–	–	–
каталазы	+	+	+
оксидазы	+	+	+
уреазы	–	+	+
лецитиназы	–	+	+
1	2	3	4
липазы	–	–	–
желатиназы	+	+	+
аммиака	–	–	–
индола	–	–	–
сероводорода	–	–	–
Гидролиз крахмала	–	+	+
Использование цитрата (на среде Симмонса)	±	±	±

Продолжение таблицы 1			
1	2	3	4
Фиксация атмосферного азота (на среде Эшби)	+	+/-	+
ОФ-тест с:			
глюкозой	O –	--	O –
фруктозой	+F	O F	O F
сахарозой	O F	O F	O F

Примечание: + - наличие признака; -- - отсутствие признака; O - окисление; F - ферментация.

Полученные данные позволяют предположить принадлежность выделенных штаммов 13 и 14 к роду *Bacillus*, а штамма 5 – к роду *Arthrobacter* [7].

В работах Khatun et al. (2012), Ghaima (2013) и Huang et al. (2014) также описаны устойчивые к кадмию (II) представители рода *Bacillus*, выделенные из почв [12-14].

Результаты исследования влияния кадмия (II) на выделенные микроорганизмы представлены на рисунке 1.

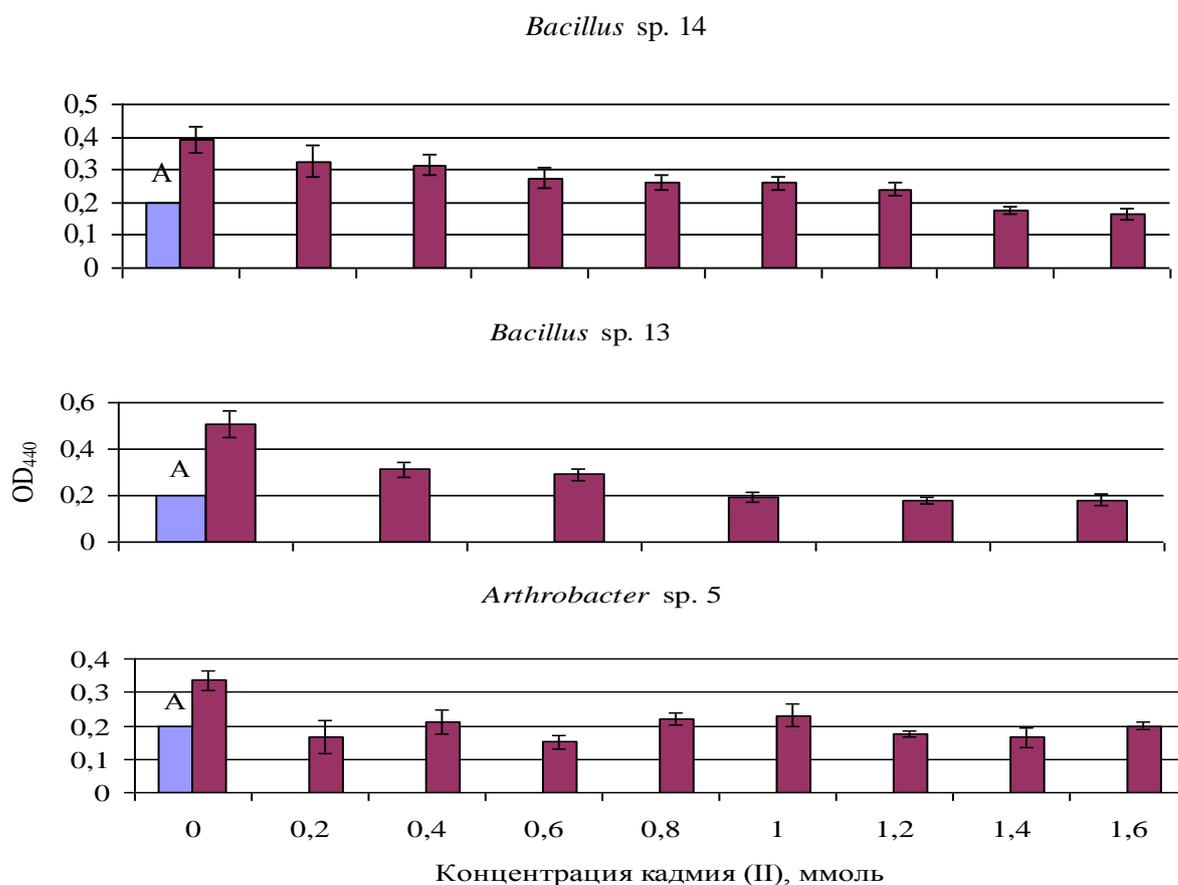


Рис. 1. Влияние различных концентраций кадмия (II) на рост штаммов.

Примечание: А – исходная посевная доза.

Наибольшая устойчивость к кадмию (II) наблюдалась у штамма *Bacillus* sp. 14; МТК составила 1,2 ммоль, МИК – 1,4 ммоль. Меньшие значения МТК и МИК отмечены для *Bacillus* sp. 13 – 0,5 ммоль и 1 ммоль соответственно (рис. 1). При первичном скрининге *Arthrobacter* sp. 5 показал устойчивость к кадмию (II), однако в ходе последующих экспериментов данное свойство было утрачено.

Основываясь на опытных значениях МТК, штаммы *Bacillus* sp. 13 и 14 классифицированы как устойчивые к кадмию (II) [1].

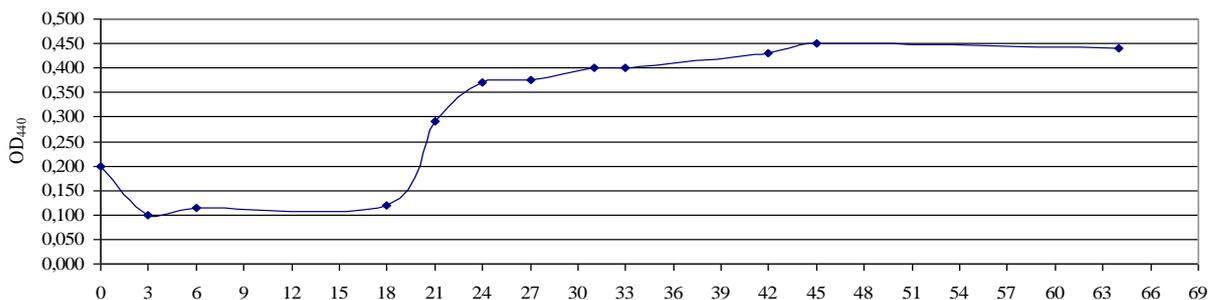
Для *B. cereus*, выделенной Khatun et al. (2012) из загрязненной почвы, описано высокое значение МТК кадмия (II) – 12,5 ммоль [13]. В исследовании Huang et al. (2014) значительная устойчивость к металлу (до 1,5 ммоль) показана для *B. cereus* RC-1, также выделенной с загрязненного участка [12].

На следующем этапе работы изучена биоаккумуляция бактериями кадмия (II). Процесс адсорбции металла на поверхности микроорганизмов включает связывание его с клеточной стенкой, цитоплазматической мембраной, а также веществами капсул и внеклеточных выделений. Взаимодействие связано, главным образом, с отрицательным зарядом этих поверхностных структур. У бацилл участками связывания кадмия (II) в клеточной стенке могут быть карбоксильные группы пептидогликанов. Аналогичные группы взаимодействуют с металлом и в составе цитоплазматической мембраны. Далее, с помощью специфических и неспецифических транспортеров, кадмий (II) проникает внутрь клетки. Таким же образом, металл выносится из клетки по завершении фазы экспоненциального роста [15].

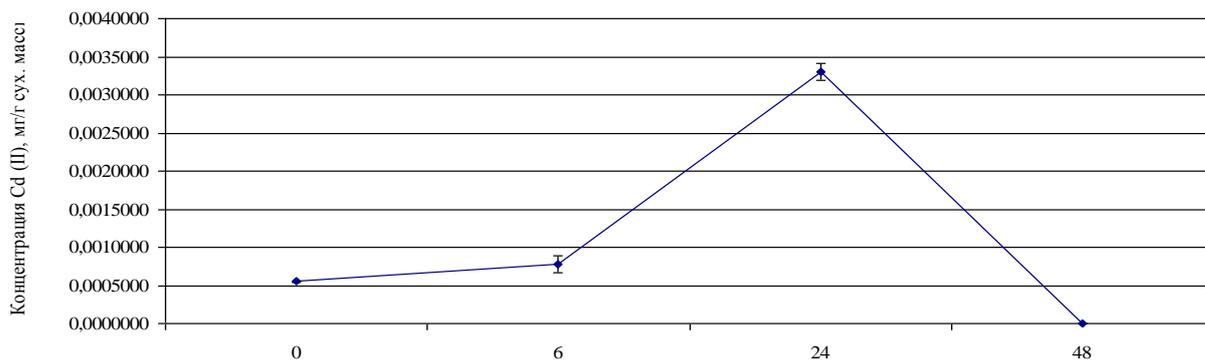
Кривая поглощения кадмия (II) клетками штамма *Bacillus* sp. 13 представлена на рисунке 2. На графиках видно, что концентрация металла незначительно увеличивается в биомассе клеток с момента начала и до 6 часов культивирования. С 6 и до 24 часов культивирования концентрация кадмия (II) резко возрастает, а после – также резко снижается. К 48 часам кадмий (II) полностью отсутствует в клетках. На поверхности клеток наибольшее количество металла оказывается спустя 48 часов культивирования.

Больше всего кадмия (II) в культуральной жидкости наблюдается в начале культивирования, а в течение последующих 6 часов количество металла сокращается. На вторые сутки культивирования его концентрация увеличивается лишь незначительно.

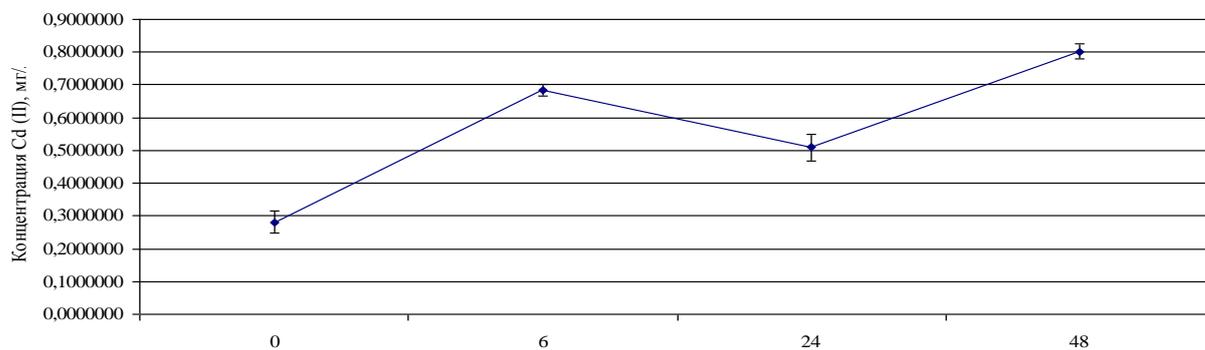
Кривая роста *Vacillus* sp.13 на среде ВАМ



Клеточная биомасса *Vacillus* sp.13



Поверхность клеток *Vacillus* sp.13



Культуральная жидкость

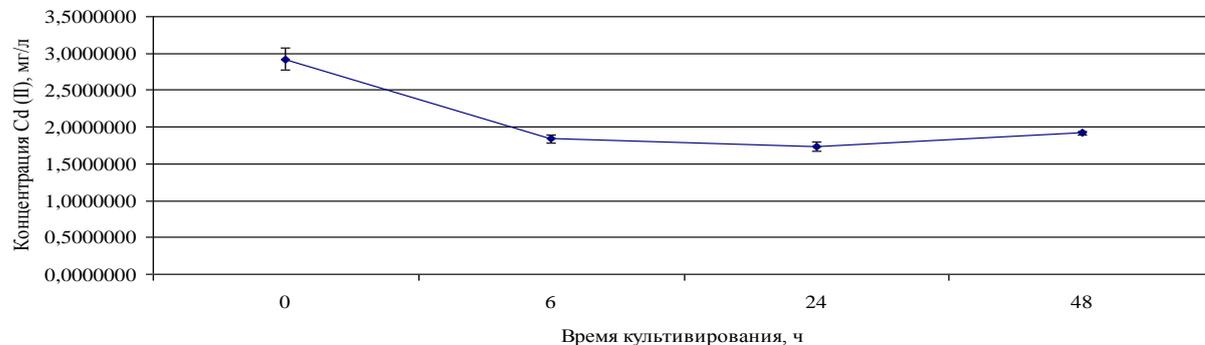


Рис.2. Кривая роста *Vacillus* sp. 13 (верхний график) и кривые поглощения кадмия (II) различными фракциями.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что только растущие клетки *Bacillus sp.* 13 способны к поглощению кадмия (II). Результаты исследования биоаккумуляции кадмия (II), проведенного Huang et al. (2014) на более устойчивой *B. cereus* RC-1, также показали, что при внесении в среду 0,2 ммоль кадмия (II) выведение его из клеток достигало максимального уровня спустя 24 часа культивирования, что соответствует концу экспоненциальной фазы роста микроорганизма [12]. Причем в начале культивирования микроорганизмов ионы кадмия (II) накапливаются на поверхности, а в фазу экспоненциального роста значительная их часть транспортируется внутрь клеток.

Заключение

Промышленность и, отчасти, сельское хозяйство способствуют загрязнению окружающей среды тяжелыми металлами, оказывающими токсическое действие на живые организмы.

Кадмий является одним из основных загрязнителей почвы среди тяжелых металлов, главным образом, потому, что его техногенное накопление в окружающей среде идет высокими темпами. Кадмий очень токсичен, вследствие загрязнения почв он проникает в растительные организмы.

Однако в природе существуют механизмы защиты от пагубного действия тяжелых металлов, в том числе и кадмия. Почвенные микроорганизмы «борются» с поллютантами многие миллионы лет. Данные механизмы используются в фиторемедиации загрязненных почв. Несмотря на наличие технических разработок очистительных конструкций, наиболее эффективным, экономичным и экологичным решением является фиторемедиация. Использованию ризобактерий в ассоциации с растениями для очистки почв уделяется большое внимание. Эффективное использование микроорганизмов требует знаний механизмов и принципов работы подобной системы. В частности, необходимы знания о взаимодействии кадмия и микроорганизмов [16- 18].

Выводы

- Из образцов ризосферной почвы растений-гипераккумуляторов кадмия (II) *S. nigrum* L. и *B. tripartita* L. изолировано 17 новых штаммов ризобактерий, из которых отобраны штаммы: 5, 13 и 14, проявившие способность к росту в присутствии 0,2 ммоль кадмия (II).

- Описаны культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки проявивших устойчивость к кадмию (II) штаммов

бактерий, на основании которых они были идентифицированы до рода. Штаммы 13 и 14 отнесены к роду *Bacillus*, штамм 5 – к роду *Arthrobacter*.

• Определены значения МТК и МИК, которые составили: для штамма *Bacillus sp.* 13 – 0,5 и 1 ммоль, для штамма *Bacillus sp.* 14 – 1,2 и 1,4 ммоль соответственно. На данном этапе штамм 5 был исключен из исследования в связи с утратой устойчивости к металлу.

• Для *Bacillus sp.* 13 проведено исследование механизмов устойчивости к кадмию (II) и его аккумуляции. Выявлена способность данного штамма к биоаккумуляции металла в фазе экспоненциального роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chan L. et al. Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd-polluted soils. *Applied soil ecology*. 2010. 46 (3): 383–389.
2. Байсеитова Н.М., Сартаева Х.М. Фитотоксичное действие тяжелых металлов при техногенном загрязнении окружающей среды. *Молодой ученый*. 2014. 61 (2): 382–384.
3. Мартынянчев А.В. Применение фиторемедиации почв для очистки земель сельскохозяйственного назначения. *Вестник НГИЭИ*. 2012. 32 (10): 56–63.
4. Wei S. et al. *Bidens tripartita* L. a Cd-accumulator confirmed by pot culture and site sampling experiment. *Journal of hazardous materials*. 2009. 170 (2): 1269-1272.
5. Angle J.S., Chaney R.L. Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. *Applied and environmental microbiology*. 1989. 55 (8): 2101-2104.
6. Шильникова В.К. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для вузов М.: Дрофа, 2004. 256 с.
7. Хоулт Дж. Определитель бактерий Берджи. М: Мир, 1997.
8. Ксенофонтова О.Ю. Руководство для малого практикума по микробиологии: учеб.-метод. пособие для студ. биол. фак., обучающихся по специальности «Экология». Саратов: Изд-во Саратов. Ун-та, 2008. 76с.
9. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. М.: Медицина, 1996. 544 с.
10. Ansari M.I., Malik A. Biosorption of nickel and cadmium by metal resistant bacterial isolates from agricultural soil irrigated with industrial wastewater. *Bioresource technology*. 2007. 98 (16): 3149-3153.
11. Coral M.N.U. et al. Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter spp.* isolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey. *Annals of microbiology*. 2005. 55(3): 175.
12. Huang F. et al. Bioaccumulation characterization of cadmium by growing *Bacillus cereus* RC-1 and its mechanism. *Chemosphere*. 2014. 109: 134-142.
13. Khatun M. et al. Estimation of heavy metal tolerance and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* isolated from municipal solid waste. *International journal of pharma and bio sciences*. 2012. 3: 819-829.
14. Ghaima K.K. et al. Study the heavy metals tolerance, biosorption and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from diesel fuel polluted soil. *International journal of biological and pharmaceutical research*. 2013. 4 (7): 502-506.
15. Багаева Т.В., Ионова Н.Э., Надеева Г.В. Микробиологическая ремедиация природных систем от тяжелых металлов: учеб.-метод. Пособие. Казань: Казанский университет, 2013. 56 с.
16. Овчаренко М.М. Тяжелые металлы в системе почва-растение-удобрение. М.: Пролетарский светоч, 1997. 290 с.

17. Bianucci E. et al. Involvement of glutathione and enzymatic defense system against cadmium toxicity in Bradyrhizobium sp. strains (peanut symbionts). *Biometals*. 2012. 25 (1): 23-32.
18. Jadia C.D., Fulekar M.H. Phytoremediation of heavy metals: Recent techniques. *African journal of biotechnology*. 2009. 8 (6): 921-928.

Поступила 30.07.2014

*(Контактная информация: **Никифорова Ирина Юрьевна** – студентка биологического факультета СГУ им. Н.Г. Чернышевского; адрес: 410008, г. Саратов, ул. Садовая большая, д. 54, кв. 14; тел. +79873800188; e-mail: airinmind@yandex.ru)*