Urszula Jankiewicz*, Anna Wojtowicz*, Marian Korc**

ZDOLNOŚĆ DO AKUMULACJI I TOLERANCJI METALI CIĘŻKICH PRZEZ BAKTERIE *PSEUDOMONAS* I *BACILLUS*

THE ABILITY OF BACTERIA *PSEUDOMONAS AND BACILLUS* TO ACCUMULATE AND TOLERATE HEAVY METALS

Słowa kluczowe: metale ciężkie, bioakumulacja, bakterie glebowe.
Key word: heavy metals, bioaccumulation, soil bacteria.

In the present study the ability to accumulate and tolerate heavy metals by bacteria Pseudomonas and Bacillus was examined. The MIC (Minimal Inhibitory Concentration) values for copper, cadmium, zinc, chromium, lead, cobalt and nickel for selected strains of Pseudomonas fluorescens ATCC 13525, Pseudomonas fluorescens 2 and Bacillus mycoides were determined. Based on the given results, the process of bioaccumulation of the abovementioned heavy metals wes carries out in order to test the possibility of exploitation of examined strains in the environmental bioremediation. The results of the study show the ability of the selected bacteria to exist in the presence of stress factors such as heavy metals.

1. WPROWADZENIE

Zanieczyszczenie środowiska naturalnego jest poważnym, ogólnoświatowym problemem. Ze względu na stale rosnącą liczbę ludności, rozwój przemysłu, a także różnorodnych technologii do środowiska dostają się substancje i związki wcześniej w nim niewystępujące lub obecne w niewielkich ilościach. Są to różnego rodzaju ksenobiotyki, wśród których można wyróżnić m.in. metale ciężkie, wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne i pestycydy [Koper i Piotrowska 2005].

* ***Dr inż. Urszula Jankiewicz, mgr Anna Wojtowicz – Katedra Biochemii, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 161, 02-787 Warszawa; tel: 22 593 25 58; e-mail: urszula.jankiewicz@sggw.pl***
** ***Mgr Marian Korc – Zakład Chemii Rolniczej, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: kcr@sggw.pl***

Zdolność do wzrostu, nawet w wysokich stężeniach metalu, występuje u wielu mikroorganizmów. Może być to wynikiem nabytych i wrodzonych mechanizmów, jak również wynikać ze środowiskowych modyfikacji metali. Odporność może być także powodowana produkcją metalotionein [Skłodowska 2000]. Pomimo niewielkiego zapotrzebowania na niektóre pierwiastki, w tym metale ciężkie, mikroorganizmy w znacznych ilościach pobierają je do wnętrza komórki. Zjawisko to prowadzi do wewnątrzkomórkowej akumulacji kationów metali i jest określane jako bioakumulacja [Sar i in. 2001]. Bioakumulacja jest drugą fazą wiązania metali ciężkich przez komórki mikroorganizmów. Poprzedzona jest sorpcją i transportem przez osłony komórkowe. Proces ten jest zależny od energii, a więc możliwy tylko w żywych komórkach. Bioakumulacja zależy od wielu czynników, w tym: substratów wzrostowych, pH i temperatury środowiska, które wpływają na jej wydajność. Takie właściwości mikroorganizmów zostały wykorzystane w praktyce, w przyjaznym dla środowiska usuwaniu i odzyskiwaniu metali ciężkich. Bioremediacja inżynieryjna jest obiecującym obecnie kierunkiem biotechnologii środowiskowej, stąd też uzasadnione jest poszukiwanie bakterii o wysokim potencjale bioakumulacji metali ciężkich.

Ilość zakumulowanych w biomasie bakterii metali ciężkich może być oznaczana techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej (Atomic Absorption Spectrometry – AAS). Jest to jedna z najczęściej stosowanych w analizie śladowej metod instrumentalnych chemii analitycznej.

Celem przeprowadzonych badań było ustalenie czy i w jakim stopniu w warunkach laboratoryjnych glebowe szczepy *Pseudomonas* i *Bacillus* wykazują zdolność do akumulacji w biomasie metali ciężkich.

2. CEL, MATERIAŁ I METODY BADAŃ

2. 1. Materiał doświadczalny

Szczepy bakteryjne użyte w doświadczeniu należały do dwóch rodzajów:

- *Pseudomonas* (*Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 i *Pseudomonas fluorescens* 2)
- *Bacillus* (*Bacillus mycoides*).

Wyznaczanie wartości minimalnego stężenia metalu hamującego wzrost bakterii (MIC – Minima Inhibitory Concentration) poszczególnych metali wyznaczono w podłożu, które stanowił agar odżywczy wzbogacony jonami metali o kontrolowanym stężeniu finalnym: 40, 120, 200, 400 mg/ml pożywki.

Jako wartość MIC przyjmowano najniższe stężenie, przy którym nie obserwowano wzrostu bakterii. Zastosowano następujące jony metali: $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $CdCl_2$, $PbCl_2$, K_2CrO_4, $NiCl_2$ i $CoCl_2$.

2. 2. Przygotowanie materiału do pomiaru bioakumulacji metali ciężkich

Warunki hodowli i skład podłoża hodowlanego. Hodowlę szczepów bakterii prowadzono w pożywce płynnej zawierającej 1,5% bulionu odżywczego. Hodowle bakterii prowadzono 48 godzin w temperaturze 28°C z wytrząsaniem.

Dla każdego z trzech szczepów bakterii wykonano dwa rodzaje prób – kontrolne i pełne. Próby kontrolne stanowiły hodowle bakterii na pożywce bulionowej. Próby pełne to hodowle bakterii na pożywce bulionowej z dodatkiem roztworów soli metali ciężkich: $CuSO_4$, $ZnSO_4$, $CdCl_2$, $PbCl_2$, K_2CrO_4, $NiCl_2$, $CoCl_2$.

Zastosowane finalne stężenia metali w pożywkach wynosiły:

Metal	Zn^{2+}	Cd^{2+}	Cu^{2+}	Co^{2+}	Cr^{2+}	Ni^{2+}	Pb^{2+}
Stężenie mg/ml	144	14	80	60	95	120	50

Po czterdziestu ośmiu godzinach hodowle odwirowywano przez 15 min w temperaturze 4°C przy 15 000 x g (wirówka firmy Sigma). Otrzymany osad przemyto wodą dejonizowaną i dwukrotnie 0,2 M roztworem EDTA, a następnie kolejny raz wodą dejonizowaną. Każdorazowo zawiesinę wirowano w omawianych wyżej warunkach.

Mineralizacja prób. Wysuszoną następnie w wirówce próżniowej biomasę poddano procesowi mineralizacji przy użyciu stężonego kwasu azotowego. Proces prowadzono w temperaturze 80°C przez trzy godziny. Następnie próby schłodzono do temperatury 20°C. Do roztworów dodano 30% (v/v) roztwór H_2O_2 i ogrzewano w temperaturze 120°C przez jedną godzinę. Po odwirowaniu próby uzupełniono 1% (v/v) roztworem kwasu azotowego do odpowiedniej objętości.

Zawartość metali ciężkich pobranych przez komórki bakterii w czasie hodowli oznaczono przy pomocy techniki GF-AAS (Absorpcyjna spektrometria atomowa z atomizacją elektrotermiczną).

3. WYNIKI I DYSKUSJA

W badaniach ustalono najniższe stężenia jonów metali hamujące wzrost bakterii. Uzyskane wyniki bardzo różnicowały poszczególne szczepy bakterii. Największe dysproporcje w poziomie stężeń jonów metali hamujących wzrost zaobserwowano u kadmu i chromu (tab. 1.). Szczep *B. mycoides* okazał się wyjątkowo mało odporny na kadm, w przeciwieństwie do szczepu *P. fluorescens* ATCC 12525, którego wzrost był hamowany dopiero przy dziesięciokrotnie wyższym stężeniu tego pierwiastka. Ten sam szczep *Pseudomonas* okazał się także wyjątkowo mało wrażliwy na wysokie stężenie jonów chromu. Obserwacja intensywności wzrostu *P. fluorescens* 2 dowiodła, że najmniejsza wartość MIC wystąpiła u tego szczepu dla kobaltu, a najwyższa dla miedzi i cynku.

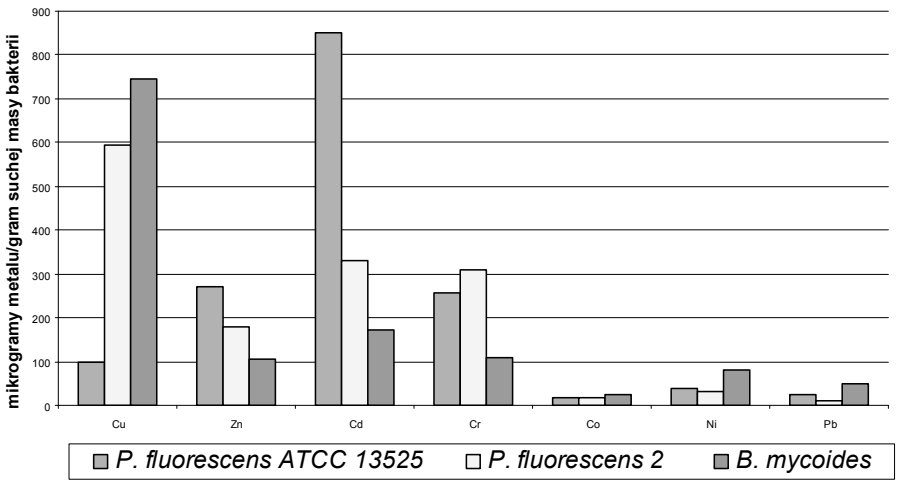
Tabela 1. Wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii

Table 1. Value of minimal concentractions of metal ions inhibit growth of bacteria

	Cu	Zn	Cd	Cr	Co	Ni	Pb
P. fluorescens ATCC 13525	400	400	400	700	300	500	300
P. fluorescens 2	400	400	200	200	120	250	200
B. mycoides	200	400	40	200	120	250	200

W ramach prezentowanej pracy wykonano doświadczenie mające na celu pomiar bioakumulacji metali ciężkich w biomasie bakterii. Hodowle trzech szczepów bakterii*: P. fluorescens ATCC 13525*, *P. fluorescens* 2 i *Bacillus mycoides* prowadzono w obecności siedmiu pierwiastków: Cu, Cd, Co, Zn, Ni, Cr i Pb.

Stosowane stężenia metali ciężkich dobrano tak, by nie spowodowały całkowitego zahamowania wzrostu bakterii. Dla każdego ze szczepów prowadzono także hodowlę kontrolną bez jonów metali. Miały one na celu porównanie zawartości danego pierwiastka w uzyskanej tak biomasie z ilością danego pierwiastka pobraną w procesie bioakumulacji. Pomiar akumulacji przeprowadzono z zastosowaniem metody AAS. Podobną metodę oznaczania metali w biomasie bakterii stosowali w swoich pracach Chang i in. [1997] i Raja i in. [2006]. Wyniki przedstawiono graficznie na rysunku 1.



Rys. 1. Akumulacja jonów metali przez badane bakterie (µg metalu/gram suchej biomasy bakterii)

Fig. 1. Accumulation of metal ions (µg of metal/gram dry bacterial biomass)

Otrzymane wyniki pokazują zróżnicowanie badanych szczepów w zdolności do kumulacji zastosowanych w doświadczeniach jonów metali. Różnice te dotyczą zarówno ilości pobranych przez bakterie pierwiastków, jak i tendencji w akumulacji poszczególnych metali.

W przypadku szczepu *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 zaobserwowano następującą tendencję w akumulacji metali: Cd > Cr > Zn > Cu > Pb > Ni > Co. Podobną tendencję w akumulacji Ni, Pb i Co można zaobserwować u drugiego szczepu z rodzaju *Pseudomonas*. Bakterie te pobrały te trzy wymienione pierwiastki w niewielkich ilościach, nie przekraczających 1% z ilości metali wprowadzonych do pożywki. Szczep *P. fluorescens* 2 wykazywał największy potencjał w akumulacji w stosunku do Cu, natomiast ogólna tendencja w preferencjach względem rodzaju pobieranego jonu metali była: Cu > Cr > Cd > Zn > Co > Ni >Pb. Podobne wyniki otrzymał w swojej pracy Hassen i in. [1998]. W prowadzonym przez nich doświadczeniu nad bioakumulacją Cu, Cd, Cr Zn i Co wykorzystali szczep *P. aeruginosa*. Bakteria ta najwyższy poziom akumulacji wykazała w stosunku do jonów miedzi, a na kolejnych miejscach znalazły się jony kadmu i chromu. Podobieństwo w otrzymanych wynikach z danymi literaturowymi dotyczy także jonów kobaltu, które w doświadczeniu u Hassen i in. [1998] nie zostały w ogóle wykryte w biomasie, a które w przypadku szczepu ATCC 13525 oznaczono jedynie w minimalnych ilościach. Jony Cu zostały także zakumulowane w znacznej ilości (87,2%) przez szczep *P. putida* CZ1 w doświadczeniu Chen i in. [2006]. Natomiast tendencja w bioakumulacji metali ciężkich przez *P. fluorescens* F439 przedstawiona w pracy Lopeza i in. [2000] jest odmienna od otrzymanej w wynikach prezentowanej pracy. Wspomniany szczep w najwyższym stopniu pobrał jony Ni, które w przypadku *P. fluorescens* ATCC 13525 i *P. fluorescens* 2 zostały zakumulowane w znikomej ilości. Tendencja w bioakumulacji zaobserwowana dla *B. mycoides* była Cu > Cd > Cr > Pb > Zn > Ni > Co. Doświadczenie innych autorów [Zouboulis i in. 2004] badających akumulację Cd i Cr przez bakterie z rodzaju *Bacillus* pokrywają się, z wynikami otrzymanymi w prezentowanej pracy. Natomiast w wynikach przedstawionych, przez Kim i in. [2007] obserwowano odmienne zdolności do bioakumulacji u bakterii *Bacillus* spp. CPB4, który w najwyższym stopniu pobierał jony Pb.

4. WNIOSKI

1. Szczepy *Pseudomonas fluorescens* 2 i *Bacillus mycoides (*izolaty środowiskowe) wykazały większą wrażliwość na metale ciężkie niż *P. fluorescens* ATCC 13525 (zakupiony z kolekcji).
2. Obserwowano duże różnice pomiędzy szczepami w preferencjach względem rodzaju pobieranego jonu metali.
3. W biomasie obydwu *P. fluorescens* znajdowało się więcej jonów cynku, chromu i kadmu w porównaniu do *B. mycoides*. W komórkach *B. mycoides* natomiast oznaczono relatywnie więcej niklu, ołowiu i miedzi.
4. Zastosowane w badaniach szczepy w najmniejszym stopniu akumulowały jony kobaltu.

PIŚMIENNICTWO

CHANG JO-SHU., LAW R., CHANG CHUNG-CHENG 1997. Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. Wat. Res. vol. 31, No.7: 1651–1658.

CHEN X., SHI J., CHEN Y., XU X., XU S., WANG Y. 2006. Tolerance and biosorption of copper and zinc by *Pseudomonas putida* CZ1 isolated from metal-polluted soil. Can J. Microbiol. 52(4): 308–316.

HASSEN A., SAIDI N., CHERIF M., BOUDABOUS A. 1998. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thurningensis*. Bioresource Technology 65:73–82.

KIM SU., HEONG YH., SEO DC., HUR JS., HEO JS., CHO JS. 2007. Characterisation of heavy metal tolerance and biosorption capacity of bacterium strain CPB4 (*Bacillus* spp.). Water Science Technol. 55(1–2): 105–11.

KOPER J., PIOTROWSKA A. 2005. Wpływ metali ciężkich na aktywność enzymatyczną gleb płowych obszaru Pomorza i Kujaw. Obieg pierwiastków w przyrodzie. Monografia tom III: 545–548.

LOPEZ A., LAZARO N., PRIEGO A. M., MARQUES A. M. 2000. Effect of pH on biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 24: 146–151.

RAJA C.E., ANBAZHAGEN K., SELVAM G.S. 2006. Isolation and characterization of a metal – resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. World Journal of Microbiology & Biotechnology 22: 577–585.

SAR P., KAZY S.K., SINGH S.P. 2001. Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature. Letters in Applied Microbiology 32: 257–261.

SKŁODOWSKA A. 2000. Biologiczne metody ługowania metali ciężkich – biohydrometalurgia. Post. Mikrobiol. 39:73–89.

ZOUBOULIS A.I., LOUKIDOUM X., MATIS K.A. 2004. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. Process Biochemistry 39: 909–916.