

Jerzy CHMIELEWSKI

Zakład Biochemii, Uniwersytet Śląski, Katowice

AKUMULACJA METALI PRZEZ DROBNOUSTROJE

W wyniku biochemicznego działania drobnoustrojów metale i ich związki podlegają różnym przemianom metabolicznym. Przemiany te polegają głównie na tworzeniu chelatów i innych związków kompleksowych jonów metali z ligandami organicznymi przez wiązanie się z atomami siarki, azotu lub tlenu. Inne oddziaływania są związane ze zmianą wartościowości w wyniku włączenia metalu do metabolizmu drobnoustrojowego. Może również następować substytucja jednego metalu przez inny w metaloenzymach, kompleksach i związkach organometalicznych. Drobnoustroje są również zdolne do alkilowania niektórych metali i metaloidów w układach biologicznych.

Można wyróżnić kilka mechanizmów poboru i akumulacji jonów metali przez drobnoustroje. Występują zjawiska niespecyficznej akumulacji jonów metali na powierzchni komórek mikroorganizmów. Akumulację taką może powodować sorpcja jonów i wiązanie przez polimery ściany, zewnątrzkomórkowych otoczek i śluzów drobnoustrojowych.

Powszechnie występuje specyficzny transport aktywny niektórych jonów do komórek drobnoustrojów, na przykład sodu, potasu, magnezu i manganu. W szczególnych przypadkach może następować biosynteza i wydzielanie przez komórkę związków chelatujących i jonoforów, które umożliwiają pobór określonego jonu. Na uwagę zasługują również możliwości niespecyficznej bioakumulacji metali skompleksowanych z substratami energetycznymi. Biodegradacja tych kompleksów prowadzi do wewnątrzkomórkowego odłożenia metali.

Niniejsze opracowanie zawiera wiadomości dotyczące udziału wspomnianych zjawisk na procesy drobnoustrojowej akumulacji niektórych metali i metaloidów. Procesy te nabierają znaczenia w odzysku cenniejszych

metali oraz w detoksykacji środowisk biologicznych narażonych na działanie metali toksycznych.

Pobór i akumulacja metali

Drobnoustroje są wyposażone w mechanizmy, które umożliwiają pobieranie i akumulację jonów metali ze środowiska. Przyswajają one kationy niezbędne dla metabolizmu i wzrostu. Należą do nich na przykład jony Fe, Mn, Zn, Cu i Co. Niektóre mikroorganizmy wykazują również zapotrzebowanie na Mo, V i Ni. Metale te są wykorzystywane głównie do syntezy niektórych enzymów i decydują o aktywności tych enzymów. Ilości metali potrzebne do pokrycia zapotrzebowania drobnoustrojów są zwykle niewielkie. Może ono następować nawet wtedy, gdy występują one w stężeniach śladowych. Mechanizmy poboru mogą również działać w przypadku wyższych stężeń jonów metali w środowisku. Może to prowadzić do podwyższonej akumulacji, a nawet wpływać na toksyczność metalu w odniesieniu do indywidualnego organizmu akumulującego oraz zespołu drobnoustrojowego.

Występują dwa główne typy poboru jonów metalu przez organizmy. Pierwszy z nich polega, jak wspomniano, na niespecyficznym wiązaniu tych jonów na powierzchni komórki, w warstwie śluzowej i wewnątrzkomórkowym matriks. Drugi typ poboru jest związany z metabolicznie zależnymi procesami wewnątrzkomórkowymi.

Większość metali ciężkich może ulegać sorpcji na powierzchni komórek drobnoustrojowych, zarówno żywych jak i obumarłych. Okazało się, że w przypadku miedzi, kadmu i cynku możliwe jest kompleksowanie tych jonów z kwasem poligalakturonowym, istotnym składnikiem zewnętrznej warstwy komórki bakteryjnej. Metale można odzyskać z takich kompleksów i zregenerować polimer.

Powierzchniowe wiązanie jonów metali przebiega u drożdży z udziałem dwu rodzajów grup anionowych - polifosforanowych i karboksylowych. Wiązanie takie przebiega szybko i jest odwracalne. Izolowane ściany komórkowe Saccharomyces cerevisiae są zdolne do wiązania jonów rtęci w ilości odpowiadającej ich ciężarowi. Grzyby mikroskopowe Neocosmospora vasinfecta wykazują powierzchniowe wiązania jonów cynku do ujemnie naładowanych grup na powierzchni strzępek mycelium. Przebiega ono szybko i odwracalnie. W zbliżony sposób zachowuje się wiązanie cynku przez komórki Candida utilis. Wiązanie kobaltu przez Neurospora crassa przebiega również szybko i osiąga 30 do 40 % ogólnego poboru tego metalu.

Powierzchniowe wiązanie jonów metali jest szczególnie efektywne u organizmów wytwarzających śluzę lub rosnących w zewnątrzkomórkowym me-

triks. Wykazano, że polisacharydy śluzowych otoczek bakterii zoogłęalnych przyczyniały się do usuwania miedzi, kobaltu, niklu, cynku i żelaza z roztworów. Substancje ekstracelularne tworzą rodzaj nieprzepuszczalnej bariery dla jonów niektórych metali. Bakterie zoogłęalne, które pospolicie występują w środowisku wodnym, mogą rozwijać się w obecności wysokich stężeń jonów metali ciężkich. Metale te ulegają sorpcji i wytrąceniu w postaci trudnorozpuszczalnych związków w zewnątrzkomórkowym matriks.

Drugi typ poboru metali przez mikroorganizmy jest związany z metabolicznie zależnym transportem jonów do wnętrza komórki. Procesy takiego poboru cynku, kadmu, ołowiu, talu, niklu, miedzi, arsenu, srebra i germanu badano u bakterii; cynku i kobaltu u grzybów oraz cynku, kadmu, talu, miedzi, niklu, kobaltu i arsenu u drożdży i glonów. Ostatnio pojawiły się też prace dotyczące poboru uranu przez niektóre glony. Wykazano, że w większości przypadków ilość metalu związana przez powierzchnię komórki drobnoustroju była większa od pobranej w procesach energetycznie zależnych.

Niektóre bakterie i grzyby syntetyzują i wydzielają do podłoża związki chelatujące, które ułatwiają pobieranie jonów żelazowych. Stwierdzono, że bakterie Escherichia coli oraz Salmonella typhimurium wydzielają do środowiska o niskiej zawartości tych jonów związek zwany enterocheliną. Jest to cykliczny trimer 2,3-dwuhydroksy-N-benzoilo-L-seryny, który wiąże chelatowo żelazo. Skompleksowany jon żelazowy podlega aktywnemu transportowi do wnętrza komórki. Po penetracji przez błonę plazmatyczną kompleks rozpada się. Uwolniona cząsteczka bakteriocheliny może brać udział w wychwytywaniu kolejnego jonu żelaza. Wykazano, że u większości bakterii tlenowych i względnych beztlenowców występują siderofory chelatujące żelazo i ułatwiające pobieranie jonu tego metalu.

Badania poboru jonów metali przez drobnoustroje zwykle przeprowadza się w warunkach milimolowych stężeń tych jonów. Nie można wykluczyć, że w kontakcie z wysokimi stężeniami jonów niektórych metali drobnoustroje w celu przeżycia mogą ujawniać jakieś mechanizmy tolerancji. Wysokie stężenia metali mogą powodować wewnątrzkomórkowe wiązanie jonów metalu po ich pobraniu. Metal może ulegać kompartmentacji w strukturach komórkowych. Niektóre drożdże są zdolne do wytrącania talu w mitochondriach w postaci tlenku talu, który może ulegać późniejszemu usunięciu z mitochondrium i wydzieleniu w procesie oksydacyjnej detoksykacji. U drożdży Candida utilis wskutek wzrostu w obecności wysokich stężeń miedzi pojawiają się elementy komórkowe zawierające miedź.

W badaniach z użyciem mikroskopii elektronowej wykazano, że jony miedzi ulegały wiązaniu w jądrach komórkowych i chromosomach drożdży.

U glonów rodzaju Scenedesmus rosnących w obecności wysokich stężeń miedzi stwierdzano odkładanie związków tego metalu w wakuolach i jądrach komórkowych. Wytrącanie rtęci w postaci ciał elektronowo gęstych obserwowano w strzępkach grzyba rodzaju Chrysosporum, zaś cynku u rodzaju Neocosmospora po wzroście w podłożach zawierających jony tych metali. Wewnątrzkomórkowe depozyty żelaza w postaci siarczku żelazawego stwierdzano u bakterii Desulfovibrio redukujących siarczany.

W przypadku bioakumulacji germanu, metodami mikroskopii elektronowej oraz znakowania izotopowego i izolacji frakcji subkomórkowych, udało się określić losy tego pierwiastka w komórce drobnoustrojowej. Jony germanu uległy związaniu w nukleoidzie bakterii Pseudomonas sp. oraz w jądrach komórkowych grzybów mikroskopowych Oospora sp. Znaczne ilości germanu pojawiły się w frakcji zawierającej DNA. Wykazano in vitro możliwości kompleksowania germanu oraz arsenu i selenu w strukturach kwasów nukleinowych. Opracowano też hipotetyczne modele wiązania tych pierwiastków z DNA i RNA.

Stwierdzano, że mieszana populacja drobnoustrojów i czyste kultury Pseudomonas sp. przystosowane drogą indukcji enzymatycznej do biodegradacji struktury aromatycznej, posiadały zdolność akumulowania germanu w obecności substratów ortodwuhydroksyfenolowych. Tworzyły one związki kompleksowe z germanu. Bioakumulacja tego pierwiastka następowała wskutek wnoszenia w postaci kompleksów z substratem, prawdopodobnie z wykorzystaniem mechanizmów transportu tych substratów. Akumulacja germanu z kompleksów ortodwuhydroksyfenolowych uzależnia ten proces od indukcji enzymów degradujących strukturę aromatyczną liganda organicznego.

Wykazano, że bioakumulacja germanu z kompleksów germanoorganicznych może służyć jako model niespecyficznego nagromadzenia niektórych metali i metaloidów przez drobnoustroje. Prawdopodobieństwo tego modelu stwierdzono na przykładzie bioakumulacji ciężkich pierwiastków IV okresu i IV grupy układu okresowego oraz miedziowców (Cu, Ag, Au, Zn, Ga, Ge, As, Se oraz Sn i Pb) podczas degradacji kompleksującej pirokatechiny oraz octanu nie tworzącego (z wyjątkiem Cu) związków kompleksowych z tymi pierwiastkami.

Niespecyficzna akumulacja pierwiastków wnoszonych w postaci kompleksów z substratem jest prawdopodobnie jednym z kilku mechanizmów akumulacyjnych, występujących u drobnoustrojów. Może ona towarzyszyć specyficznemu transportowi niektórych jonów, ich wnoszeniu z udziałem jonoforów i czynników chelatujących, oraz zjawiskom dyfuzji. Niezależnie od tych procesów może również następować zewnątrzkomórkowe nagromadzenie związków niektórych metali i metaloidów wskutek sorpcji przez śluzę powierzchniową, substancje otoczkowe i biopolimery ściany i błony komórkowej.

Biochemiczne przemiany metali

Jony metali w wyniku aktywności biologicznej drobnoustrojów mogą podlegać zmianom wartościowości lub biotransformacji w związki organometaliczne.

Jednym z najwcześniej poznanych procesów biotransformacji jonu metalu było utlenienie jonu żelazowego do żelazowego. Bakterie posiadające zdolność przeprowadzania tej przemiany należą do rodzaju Thiobacillus. Utlenieniu żelaza niekiedy towarzyszy biooksydacja siarki do kwasu siarkowego. Energia uzyskana z procesów utlenienia tych substratów nieorganicznych jest wykorzystywana do asymilacji CO_2 i syntezy biomasy chemo-litotrofów. Znana jest również reakcja utleniania jonu Mn^{2+} przez bakterie rodzaju Arthrobacter. Niektóre bakterie heterotrofowe wykazują zdolność utlenienia jonów arseninowych (AsO_3^{3-}) do arsenianowych (AsO_4^{3-}).

Różne rodzaje bakterii i drożdży powodują redukcję kationu rtęciowego (Hg^{2+}) do postaci elementarnej (Hg^0). Powoduje to zwykle uolnienie się rtęci ze środowiska wzrostu tych drobnoustrojów. Niektóre powszechnie występujące bakterie jak Escherichia coli i bakterie rodzaju Pseudomonas, Citrobacter i Bacillus mogą również powodować utlenienie rtęci elementarnej do postaci kationowej.

Przemiana niektórych metali w związki organometaliczne drogą metylacji stanowi ważny mechanizm detoksykacyjny u drobnoustrojów. Metylacji może podlegać arsen, selen, tellur, cyna, rtęć, ołów i kadm wskutek działania różnych bakterii, drożdży i grzybów w warunkach tlenowych oraz bakterii beztlenowych. Produkty metylacji są często lotne i mogą ulegać uwolnieniu do atmosfery. Niekiedy jednak, na przykład w przypadku metylowych pochodnych rtęci, produkty metylacji są bardziej toksyczne dla wielu organizmów od rtęci elementarnej. Związki metylortęciowe mogą również podlegać degradacji mikrobiologicznej, która powoduje ponowne uwolnienie tego metalu. Degradację taką mogą przeprowadzać różne rodzaje drobnoustrojów odporne na działanie jonów rtęci.

W biotransformacji metali mogą brać udział różne drobnoustroje. Nie występuje też specyficzna mikroflora transformacyjna. Wynika z tego, że zdolność biotransformacji metali jest zjawiskiem szeroko występującym i jest właściwością powszechnie występujących drobnoustrojów.

Odporność drobnoustrojów na metale

Jednym z mechanizmów chroniących drobnoustroje przed toksycznym działaniem podwyższonych stężeń niektórych metali jest wytwarzanie

siarkowodoru. Większość metali ciężkich tworzy trudno rozpuszczalne siarczki. Wskutek tego organizmy wytwarzające H_2S często wykazują tolerancję na metale ciężkie. Szczepy drożdży Saccharomyces cerevisiae tolerujące miedź wytwarzają więcej siarkowodoru od szczepów podatnych. Mikrofotografia elektronowa wykazała, że siarczek miedzi był głównie deponowany w ścianie komórkowej oraz wokół tej ściany. Podobną precypitację siarczku miedzi obserwowano również u niektórych grzybów rodzaju Poria.

Bakterie zdolne do wytwarzania siarkowodoru również wykazują tolerancję na działanie jonów metali. Desulfovibrio desulfuricans redukuje siarczany i wytwarza siarkowódór. Może rosnąć w warunkach wysokich stężeń metali ciężkich. Podobnie w procesach beztlenowych rozkładu substancji organicznej tworzenie się siarczków zmniejsza toksyczność większości metali ciężkich.

Stwierdzono, że w mieszanych populacjach drobnoustrojów, mikroorganizmy wytwarzające siarczki mogą działać osłoniennie na organizmy podatne na toksyczne działanie metali. W ten sposób D. desulfuricans umożliwia wzrost szczepów Pseudomonas aeruginosa podatnych na działanie rtęci w obecności wysokich stężeń jonów tego metalu. Podobnie wykazano, że wytwarzanie siarkowodoru oraz zewnątrzkomórkowe wydzielanie glutationu przez Escherichia coli powodowało tolerancję i wzrost Pseudomonas aeruginosa w obecności związków rtęci.

Wiązanie i chelatowanie jonów metali przez substancje organiczne może w widoczny sposób wpływać na tolerancję podwyższonych stężeń tych jonów przez drobnoustroje. W niektórych przypadkach drobnoustroje same są zdolne do wytwarzania takich substancji, które mogą zmniejszać toksyczne działanie metali. Kwas cytrynowy wytwarzany przez liczne drożdże i grzyby może łatwo chelatować jony metali. W ten sposób może on osłaniać na przykład Aspergillus niger przed toksycznym działaniem podwyższonych stężeń miedzi lub ołowiu. Wytwarzanie kwasu szczawowego w podobny sposób powiązane jest z tolerancją na działanie miedzi u grzybów rodzaju Endothia. Niektóre mutanty Saccharomyces cerevisiae odporne na działanie miedzi wykazują zapotrzebowanie na metioninę. Można spodziewać się, że związek ten będący efektywnym czynnikiem chelatującym zostaje zużyty przez te drożdże do wytwarzania jakiejś substancji, która działa też detoksykacyjnie na związki rtęci.

Interesujące jest, że wewnątrzkomórkowe substancje organiczne mogą również determinować tolerancję na działanie jonów metali. Stwierdzono to u tolerującego rtęć szczepu Aspergillus niger. Wewnątrzkomórkowe związki sulfhydrylowe wiązały rtęć i łagodziły jej toksyczność. Obecność takich związków sulfhydrylowych obserwowano również u drożdży miedziopodpornych. Nasuwa się tu analogia z wytwarzaniem tioneiny przez orga-

nizmy wyższe. Swoiste białka o dużej zawartości grup - SH umożliwiają detoksykację przez wiązanie jonów metali ciężkich w metalo-tioneiny. Ukazały się też informacje o występowaniu metalotioneiny wiążącej Cu, Cd i Zn u sinic Synechococcus sp.

Niekiedy występują przypadki nieprzepuszczalności jonów niektórych metali przez komórkową drobnoustrojów. Nieprzepuszczalność ta może wyjaśniać tolerancję grzybów rodzaju Penicillium i Aspergillus rosnących w warunkach stężonych roztworów siarczanu miedzi. Odporność plazmidowych szczepów Staphylococcus aureus na działanie jonów kadmu jest również związana z blokowaniem transportu i zmniejszonym poborem tego metalu.

Genetyczna kontrola odporności na metale

Odporność niektórych bakterii na działanie jonów metali ciężkich podlega regulacji przez geny plazmidów, pozachromosomowych czynników odporności, które mogą również kodować odporność antybiotykową. Oba te rodzaje odporności są sprzężone i często razem występują. Większość szczepów Pseudomonas aeruginosa izolowanych w przypadkach klinicznych cechujących się wieloraką odpornością na działanie metali, wykazywała również odporność antybiotykową. Nieliczne tylko szczepy posiadały wyłącznie odporność na metale.

U bakterii Staphylococcus aureus wykazano powiązanie odporności na działanie jonów wielu metali z regulacją genetyczną zlokalizowaną w plazmidach. Okazało się jednak, że tylko w przypadku kadmu i rtęci udawało się stwierdzić istotną różnicę odporności szczepów odpornych i wrażliwych. Różnica ta może być nawet około stukrotna. Dla innych metali, na przykład ołowiu, niklu, kobaltu, arsenu i srebra różnice odporności okazały się niewielkie.

Plazmidowo zależną odporność na działanie jonów kadmu wykazano jedynie dla Staphylococcus aureus. Plazmidowe szczepy odporne tej bakterii cechują się zdolnością zmniejszonego, zablokowanego poboru i transportu kadmu w porównaniu ze szczepami nie odpornymi, pozbawionymi plazmidów.

Kontrolowana plazmidowo odporność na rtęć wydaje się bardziej rozpowszechniona niż odporność na jony kadmu. Wykazano ją u bakterii jelitowych, Staphylococcus aureus oraz u bakterii Pseudomonas. Odporność ta wynika ze zdolności biotransformacji jonów rtęci w związki organortęciowe. Wykazano, że geny odporności na rtęć mogą być przekazywane u Escherichia coli ze szczepów odpornych na podatne, a nawet do podatnych szczepów Aerobacter aerogenes.

Plazmidowo zależna odporność drobnoustrojów na działanie jonów ne-

tali ma istotne znaczenie ekologiczne i praktyczne. Odporność ta może podlegać szybkiemu przenoszeniu ze szczepów odpornych na podatne. Wiąże się to z międzyszczepowym lub nawet międzygatunkowym przenoszeniem plazmidów w procesie transformacji genetycznej. W ten sposób populacje bakterii mogą genetycznie adaptować się do oddziaływania jonów niektórych metali szybciej niż przez proces spontanicznej mutacji lub naturalnej selekcji.

Aplikacyjne aspekty akumulacji metali przez drobnoustroje

Rosnący niedobór i wzrost wartości niektórych metali oraz większe rozeznanie oddziaływań ekologicznych metali o działaniu toksycznym odprowadzanych do środowiska, nadaje znaczenie badaniom akumulacji metali przez drobnoustroje. Cele aplikacyjne tej akumulacji mogą wiązać się z odzyskaniem metali oraz detoksykacją. Drobnoustroje cechujące się wysoką tolerancją na podwyższone stężenia metali i zdolnością ich bioakumulacji można wykorzystywać w procesach odzyskiwania z odpływów przemysłowych i materiałów odpadowych.

Pojawiają się prace dotyczące odzysku srebra z materiałów odpadowych przemysłu fotograficznego. Zespoły wielobakteryjne z przewagą Pseudomonas maltophilia są zdolne do nagromadzenia około 30 % srebra w biomase. Poziom akumulacji ołowiu przez bakterie rodzaju Citrobacter może dochodzić do 10-36 % suchej biomasy. Grzybnia niektórych szczepów Penicillium może akumulować w biomase nawet 30 % uranu z roztworu zawierających 100 ppm tego jonu. Stwierdzono wysoką bioakumulację platyny, palladu, złota i rtęci przez bakterie rodzaju Pseudomonas. Opatentowano w USA ciągły proces mikrobiologicznego odzysku rtęci. Są dowody dotyczące możliwości biokoncentracji germanu z wód obiegowych mokrego odpylania gazu w przemyśle miedziowym z zastosowaniem mieszanych populacji bakterii Pseudomonas sp.

Rozpowszechnia się pogląd o aplikacyjnym znaczeniu pasywnej retencji metali na powierzchni komórek drobnoustrojowych. Może ona wynikać z wiązania jonów metali wskutek sorpcji i wiązania do słabo elektroujemnych grup składników otoczki komórki oraz wskutek agregacji nierozpuszczalnych lub koloidalnych postaci związków metalu. Metal powierzchniowo związany mógłby ulegać usunięciu przez łagodne chemiczne wymywanie. Umożliwiłoby to powtórne użycie biomasy do dalszych cykli odzysku metalu i wpływałoby na ekonomikę procesów aplikacyjnych. W odróżnieniu od tego postępowania biomasa drobnoustrojów wewnątrzkomórkowo wiążących metale mogłaby służyć do uzyskiwania popiołowych koncentratów tych metali.

LITERATURA

- Gadd G.M., Griffiths A.J., *Microbiol. Ecology* 4, (1978), 303.
- Jernelöv A., Martin A.L., *Ann. Rev. Microbiol.* 29, (1975), 61.
- Norris P.R., Kelly D.P., *Dev. Ind. Microbiol.* 20, (1979), 299.
- Summers A.O., Silver S., *Ann. Rev. Microbiol.* 32, (1978), 637.
- Silver S., Schottel J., Weiss A., *Bacterial Resistance to Toxic Metals Determined by Extrachromosomal R Factors*, w; Sharpley J.M., Kaplan A.M., *Proceedings of the Third International Biodegradation Symposium*, Appl. Science Publ., London 1976.
- Chmielowski J., *Bioaccumulation of Germanium as a Model for the Non-specific Uptake of Some Metals by Microorganisms*, 14th FEBS Meeting, Edinburgh. 1981.

ACCUMULATION OF METALS BY MICROORGANISMS

Some factors that can influence metal accumulation are discussed with a view to understand the mechanisms of microbial metal tolerance and accumulation. Microorganisms effect the removal of metal from solutions containing some metals of industrial and environmental significance by the apparent passive retention of metal ions at cell surface and by metabolisms - dependent intracellular uptake. It is also probable that the transport systems for substrates which complex with metals, may be used for the nonspecific uptake of these metals by microorganisms. Many of these accumulation mechanisms widely occur, and are not specific to particular microorganisms growing in metal - contaminated environments.