

Zbigniew GOŁAB
Irena LANGOWSKA
Zofia KAPALA

Instytut Chemii Nieorganicznej
i Metalurgii Pierwiastków Rzadkich
Politechniki Wrocławskiej

BIOAKUMULACJA METALI CIĘŻKICH U BAKTERII *BACILLUS MYCOIDES*

Wstęp

Badania nad możliwością zastosowania mikroorganizmów do usuwania użytecznych i cennych metali z roztworów zyskują coraz większe znaczenie. Rośnie bowiem niedobór niektórych rzadkich metali i potrzeba detoksykacji zanieczyszczonego ściekami środowiska naturalnego. Konwencjonalne metody chemiczne usuwania metali z wód są czasem nieefektywne lub bardzo drogie [9].

Istnieje szereg możliwości oddziaływania między mikroorganizmami a rozpuszczonymi metalami. Aktywność drobnoustrojów może prowadzić do produkcji nierozpuszczalnych związków metali jak np. siarczki (bakterie redukujące siarczany) [15] i związki żelazowe wytwarzane przez *Thiobacillus ferrooxidans* [7], czy lotnych związków rtęci, selenu i arsenu [13]. Wiadomo, że metale takie jak potas czy magnez są akumulowane w komórkach organizmów w wysokich koncentracjach jako podtrzymujące ich normalny metabolizm. Inne jak; żelazo, cynk, mangan, miedź, kobalt, nikiel, molibden i wanad są wymagane przez różne drobnoustroje, ale zapotrzebowanie na nie jest zwykle małe. Jednakże te, jak i inne, zasadniczo toksyczne, nie posiadające funkcji metabolicznych metale jak kadm, srebro, rtęć mogą być akumulowane, w znacznych ilościach, w masie komórkowej mikroorganizmów znajdujących się w środowisku zawierającym zwiększone stężenie tych pierwiastków [1,5,14]. Zjawisko to związane jest zarówno z wewnątrzkomórkowym pobieraniem [2] jak i wiązaniem metali na powierzchni komórek [4,5,9,14]. Zostało ono stwierdzone u bakterii z rodzajów *Sphaerotilus* [3,5,9], *Micrococcus* [14] i *Bacillus* [1]. Te ostatnie należą do najbardziej rozpowszechnionych w zanieczyszczonych wodach bakterii saprofitycznych, gdzie uczestniczą w procesach biodegradacji.

Celem niniejszej pracy było zbadanie akumulacji miedzi, cynku i ołowiu w masie komórkowej *Bacillus mycoides*.

Materiał i metody

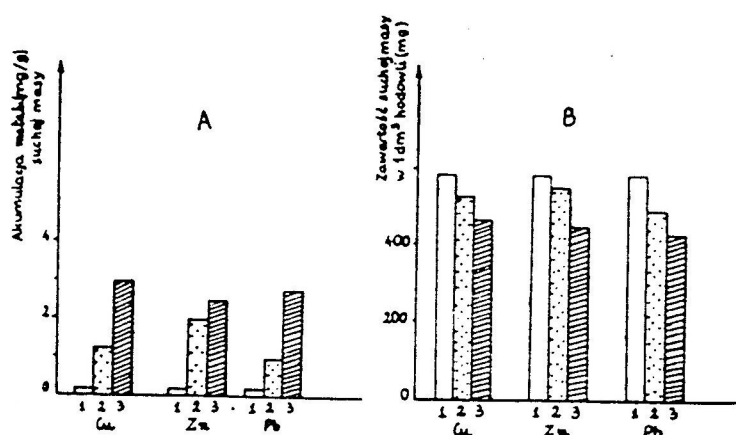
Szczep bakterii *Bacillus mycoides* wyizolowano z rzeki Oławy w pobliżu Wrocławia. Podstawową pożywką stosowaną do jego hodowli był w doświadczeniach bulion odżywczy, rozcieńczony wodą destylowaną w stosunku 1:1 (pożywka I). Prócz tego w badaniach nad wpływem podłoża na akumulację miedzi używano podstawową pożywkę mineralną wg Stckesa [11] z różnymi źródłami węgla i azotu; pożywka II zawierała pepton (1 g/dm^3), pożywka III - pepton (1 g/dm^3) i glukozę (2 g/dm^3), pożywkę IV - hydrolizat kazeiny ($0,5 \text{ g/dm}^3$), pożywka V - NH_4Cl (1 g/dm^3) i glukozę (2 g/dm^3). Metale do pożywki wprowadzano w stężeniach 10 i 50 mg/dm^3 , miedź w formie $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, cynk - ZnCl_2 , ołów $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Wszystkie hodowle prowadziło się w kolbach okrągłych płaskodennych zawierających 150 cm^3 podłoża zaszczerpionego 1 cm^3 24 godzinnej bulionowej hodowli *B. mycoides*. Próby inkubowano w temperaturze 30°C przez okres 12, 24, 72, 96 godzin na wytrząsarsce o 160 obrotach na minutę. Kontrolę przeżywalności bakterii wykonywano metodą płytkową. Po zakończeniu inkubacji masę bakteryjną odwirowywano, przepłukiwano 2-krotnie roztworem fizjologicznym i 1-krotnie wodą destylowaną. Suchą masę bakterii oznaczano wagowo. Po spopiehleniu jej w piecu mufowym (przez 5 godz. w 500°C), materiał rozpuszczano w 20 % HCl . Otrzymany roztwór sączone i w przesączu oznaczano metal. Oznaczenia dokonywano metodą absorpcji atomowej, stosując spektrofotometr Perkin-Elmer 403.

W oparciu o stwierdzone na drodze obserwacji w mikroskopie elektonowym wzrost ilości sudanofilnych granul w komórkach bakterii hodowanych w obecności miedzi, przeprowadzono izolację budującego te struktury kwasu poli- β -hydroksymasłowego (PHB) wg metody Williamsona, Wilkinsona [18]. W izolowanej frakcji PHB komórek hodowanych przez 96 godzin na pożywce z $50 \text{ mg/dm}^3 \text{ Cu}$, oznaczano metodą absorpcji atomowej miedź, zakładając możliwość gromadzenia się metalu w tym materiale zapasowym. W uzupełnieniu tych badań oznaczano intensywność utleniania PHB w procesie oddychania endogennego komórek hodowanych w obecności miedzi oraz miedzi i wapnia przy użyciu respirometru Warburga [16].

Wyniki

Akumulację miedzi, cynku i ołowiu w masie bakteryjnej oraz wpływ tych pierwiastków na wzrost *Bacillus mycoides* w 72 godzinnych hodowlach na bulionie rozcieńczonym z tymi metalami przedstawiono na rys. 1.

Jak wynika z diagramów na rys. 1, badane metale akumulowały się w masie bakteryjnej. Stopień nagromadzenia miedzi, cynku i ołowiu w bakte-

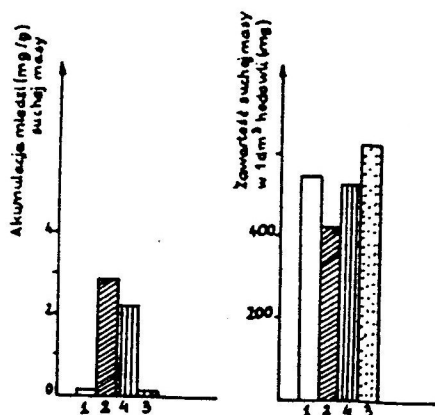


Rys. 1. Wpływ różnych stężeń Cu(II), Zn(II), Pb(II) w podłożu hodowlanym na akumulację metalu w biomasie i wzrost *Bacillus mycoides*

1 - kontrola, 2 - 10 mg/dm³ metalu, 3 - 50 mg/dm³ metalu

riach zależał od stężenia tych pierwiastków w podłożu rys. 1A. Im wyższa była koncentracja metali w pożywce tym większe jego nagromadzenie stwierdzano w biomasie. Badane metale wywierały toksyczny wpływ na komórki *B. mycoides*, co objawiało się spadkiem przyrostu biomasy w porównaniu z kontrolą (rys. 1B). Efekt ten był wprost proporcjonalny do ilości zakumulowanego w masie bakteryjnej metalu i jego koncentracji w podłożu.

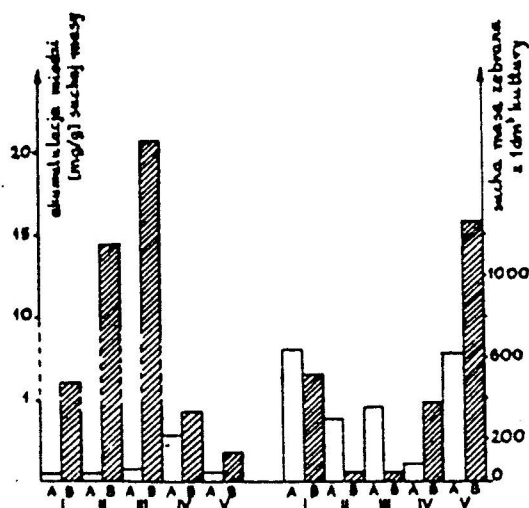
Toksyczne oddziaływania miedzi na komórki niwelowane były w znacznym stopniu przez wprowadzenie do podłoża z tym metalem jonów wapnia (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ obecności jonów miedzi - 50 mg/dm³ i wapnia - 50 mg/dm³ na akumulację Cu w biomasie i wzrost *Bacillus mycoides*

1 - kontrola, 2 - 50 mg/dm³ Cu(II), 3 - 50 mg/dm³ Ca(II), 4 - 50 mg/dm³ Cu + 50 mg/dm³ Ca (II)

Dodatek jonów wapnia do prób z miedzią powodował spadek ilości akumulowanej w masie bakteryjnej miedzi i równocześnie większy przyrost biomasy, prawie taki jak w kontroli bez Cu. Jony wapnia wpływały również dodatnio na wzrost *B. mycoides* po wprowadzeniu ich do pożywek (bulion rozcieńczony) nie zawierającej miedzi.



Rys. 3. Wpływ składu podłoża hodowlanego na akumulację miedzi w biomacie i wzrost *Bacillus mycoides*

A - kontrola, B - 50 mg/dm³ Cu(II), I-V - poszczególne pożywki

Na rysunku 3 zobrazowano zależność bioakumulacji miedzi od składu podłoża na jakim hodowano bakterie. Przedstawione na nim diagramy opracowano na podstawie danych pochodzących z 72 godzinnej hodowli na podłożach, których skład podano w metodach, zawierających 50 mg/dm³ Cu(II). Pozwalają one wnioskować, że największą akumulację metalu w masie bakteryjnej uzyskuje się na podłożach bogatych w składniki organiczne, a przyrost biomasy jest wtedy niewielki (pożywki II i III). Badany pierwiastek wprowadzony w tej samej ilości do pożywek ubogich akumuluje się w masie bakteryjnej w niewielkim stopniu. Nie obserwuje się wtedy zahamowania wzrostu bakterii (w porównaniu z kontrolą na tych podłożach), a nawet jego stymulację (pożywki IV i V).

Wyniki izolacji kwasu poli-β-hydroksymasłowego z hodowli *Bacillus mycoides* zamieszczono w tabeli 1. Wskazują one wyraźnie, że badane bakterie w czasie wzrostu na pożywce z miedzią gromadzą znacznie większe ilości tego polimeru niż w równoległych próbach bez metalu. Po 72 godzinach inkubacji w suchej masie komórek hodowanych w obecności Cu(II) stwierdzono prawie 3-krotnie, a po 96 godzinach nawet 5-krotnie więcej PHB niż w biomacie otrzymanej z próbek kontrolnych.

Oznaczenie miedzi zawartej w PHB izolowanym z 96 godzinnej hodowli

Tabela 1.

Wpływ obecności metali w hodowli na zawartość kwasu poli- β -hydroksymasłowego oraz akumulację Cu(II) w komórkach *Bacillus mycoides*

Czas inkubacji (godz.)	Rodzaj próby, stęż. metali 50 mg/dm ³	Bioakumulacja Cu(II) mg/g s. m.	Zawartość pHB w suchej masie komórek (%)
12	Kontrola	0,037	0,52
	Cu(II)	1,6	1,02
	Ca(II)	0,066	0,49
	Cu(II) + Ca(II)	0,91	0,94
18	kontrola	0,023	6,2
	Cu(II)	1,7	6,2
	Ca(II)	0,094	7,3
	Cu(II) + Ca(II)	1,08	5,1
24	kontrola	0,082	6,7
	Cu(II)	1,7	19,8
	Ca(II)	0,10	6,4
	Cu(II) + Ca(II)	1,4	10,0
48	kontrola	0,023	7,0
	Cu(II)	1,93	21,0
	Ca(II)	0,046	5,5
	Cu(II) + Ca(II)	1,63	11,9
72	kontrola	0,10	7,0
	Cu(II)	2,25	27,2
	Ca(II)	0,079	6,2
	Cu(II) + Ca(II)	1,95	17,4
96	kontrola	0,11	7,2
	Cu(II)	3,05	35,9
	Ca(II)	0,068	4,9
	Cu(II) + Ca(II)	2,44	19,6

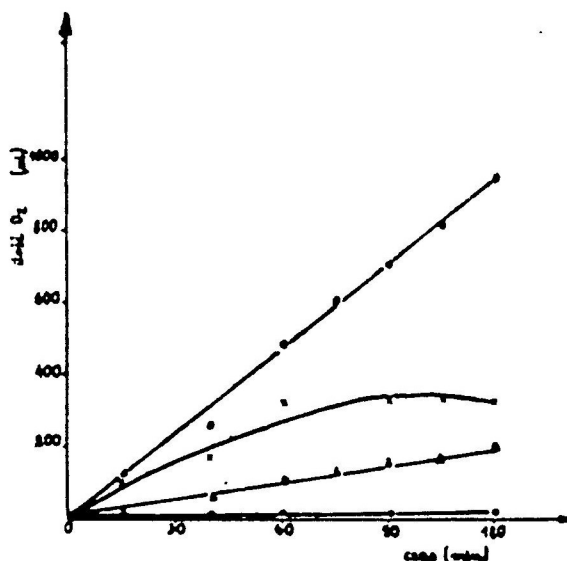
Tabela 2.

Wpływ obecności metali na proces akumulacji Cu(II) w kwasie poli- β -hydroksymasłowym

Rodzaj próby stęż. metalu 50 mg/dm ³	Bioakumulacja Cu(II) mg/g s.m.	Procentowa zawartość pHB w suchej masie	Akumulacja Cu(II) w pHB mg/g s. m.	% Cu(II) zakumulowanej w pHB
Cu(II)	1,9	6,3	0,68	35,8
Cu(II) + Ca(II)	1,7	5,6	0,38	22,8

B. mycoides na pożywce z Cu(II) oraz Cu(II) i Ca(II) wykazało, że odpowiednio 35 % i 23 % tego pierwiastka, akumulowanego przez komórki gromadzi się w kwasie poli- β -hydroksymasłowym (tabela 2).

Przebieg oddychania endogennego odmytych komórek pochodzących z 18 godzinnej hodowli *B. mycoides* w pożywce nie zawierającej metali, z $50 \text{ mg/dm}^3 \text{ Cu(II)}$, $50 \text{ mg/dm}^3 \text{ Ca(II)}$ i z $50 \text{ mg/dm}^3 \text{ Cu(II)} + 50 \text{ mg/dm}^3 \text{ Ca(II)}$ przedstawia rysunek 4.



Rys. 4. Wpływ obecności miedzi w podłożu hodowlanym na oddychanie endogenne *Bacillus mycoides*

x - kontrola, Δ - Cu(II),
● - Cu(II) + Ca(II),
o - Ca(II).

Jak widać jony wapnia stymulują utlenianie substratu energetycznego jakim jest PHB. Komórki hodowane w obecności miedzi oddychają wolniej niż kontrolne, a u bakterii, które były kontaktowane z miedzią i wapniem proces ten jest bardzo zahamowany.

Dyskusja

Badania wykazały, że miedź, cynk i ołów akumulowane są w masie komórkowej *Bacillus mycoides*. Ilość nagromadzonych metali w biomase była wprost proporcjonalna do ich stężenia w podłożu. Pierwiastki te wywierają toksyczny wpływ na komórki, objawiający się spadkiem przyrostu biomasy w porównaniu z kontrolą. Efekt ten był tym wyraźniejszy, im większa była koncentracja metali w podłożu. Toksyczne oddziaływanie jonów miedzi niwelowane było w znacznym stopniu przez dodanie do podłoża odżywczych jonów wapnia. Wiązało się to z mniejszą akumulacją miedzi i większym przyrostem biomasy niż w próbkach bez dodatku jonów Ca. Możliwym jest jak sugeruje Dzidkowski i inni [3], że ochronne działanie wapnia polega na efektywnej konkurencji z innymi kationami na II-gim stopniu utleniania w oddziaływaniu z komórkami.

Stopień nagromadzenia miedzi w masie bakteryjnej zależał od zasobności podłoża odżywczego. Na podłożach bogatych bakterie akumulowały najwięcej metalu, co wiązało się z największym hamowaniem ich wzrostu. Podłoża ubogie sprzyjały mniejszej akumulacji i wzrost na nich bakterii był mniej ograniczony. Podobne zjawiska obserwowali Sakharova i inni u *Bacillus megatherium* [8] i Zevenhuizen i inni u *Klebsiella* [19], łącząc je ze stanem fizjologicznym komórek. Większą akumulację miedzi na podłożach bogatych w związki organiczne można tłumaczyć zdolnością tworzenia się kompleksów metalu z takimi związkami co może ułatwić jego transport do komórki.

Jak wykazano w pracy wzrostowi akumulacji miedzi w biomacie *B. mycoides* towarzyszył przyrost zawartości kwasu poli- β -hydroksymasłowego. Przyrost ten był znacznie większy w komórkach wystawionych na działanie miedzi niż w bakteriach hodowanych w nieobecności tego pierwiastka. Wzrost zawartości substancji lipidowych w komórkach drożdży w obecności miedzi obserwowali Khovrytchev i inni [6].

Kwas poli- β -hydroksymasłowy jest materiałem zapasowym gromadzącym się w bakteriach takich rodzajów jak *Sphaerotilus*, *Bacillus*, *Azotobacter* i *Beijerinckia* i stanowi główny składnik granul lipidowych występujących w ich komórkach. Obserwowany w naszych doświadczeniach wzrost zawartości pHB w komórkach *Bacillus mycoides* hodowanych w kontakcie z miedzią był zapewne reakcją obronną organizmu na toksyczny wpływ metalu, jednakże w omawianym polimerze wyizolowanym z komórek stwierdzono 35 % miedzi akumulowanej w biomacie.

Wyniki obserwacji oddychania endogennego mogą być pośrednim dowodem na wiązanie znacznej ilości miedzi w omawianym polimerze. Wolniejsze niż w kontroli oddychanie komórek hodowanych w obecności miedzi i prawie jego zupełne zahamowanie u bakterii rosnących w podłożu z miedzią i wapniem, może wynikać z uwalniania związanych z utlenianym substratem energetycznym jonów Cu. Jony miedzi znane są jako hamujące oddychanie poprzez ograniczanie aktywności cytochromów u mikroorganizmów [6, 17], zaś jony wapnia stymulują rozkład pHB, co wynika zarówno z rysunku 4, jak i wspomniane jest w literaturze [10].

LITERATURA

- [1] Beveridge T.J., Murray R.G.E., J. Bacteriol. 141, 1980, 876.
- [2] Bucheder F., Broda E., Europ. J. Biochem. 45, 1974, 555.
- [3] Dzidkowski J., Guziński G., Ludwików F., Medoń P., Mięksiz S., Wielki Program Badawczy Ochrona Środowiska Politechniki Wrocławskiej Report Politechniki Wrocławskiej 1978.

- [4] Gerrard T.L., Teleborg J.N., Williams H.H., J. Bacteriol. 119, 1974, 1057.
- [5] Hatch R.T., Menawat A., Biotechn. and Bioeng. Symp. nr 8, 1978, 191.
- [6] Khovrytchev M.P., Strunk C., Schumann E., Lirova S.A., Rabotnova J.L., Z. Allg. Microbiol. 17, 1977, 29.
- [7] Olem H., Unz F.F., Biotechn. and Bioeng. 19, 1977, 1475.
- [8] Sakharova Z.V., Sheforostova L.D., Kotschetkov T.A., Mikrobiologiya 49, 1978, 61.
- [9] Shumate S.E., Strandberg G.W., Biotechn. and Bioeng. Symp. nr 8, 1978, 13.
- [10] Stainer R.I., Adelberg E.A., Ingraham J.L., General Microbiology (fourth edition), Macmillan Press LTD, London and Basingstoke 1977, 353.
- [11] Stockes J.L., J. Bacteriol. 67, 1954, 273.
- [12] Stokdale H., Ribbons D.W., Dawes E.A., J. Bacteriol. 95, 1968, 1798.
- [13] Summers A.O., Silver S. Annu. Rev. Microbiol. 32, 1978, 612.
- [14] Tornabene T.G., Peterson S.L., Appl. Microbiol. 29, 1975, 680.
- [15] Tuttle J.H., Dugan P.R., Randles C.I., Appl. Microbiol. 17, 1969, 297.
- [16] Umbreit W.W., Burris R.H., Stauffer J.P., Manometric techniques A manual describing methods applicable to the study of the metabolism. Ed. 4. Burgess Publishing Company 1964.
- [17] Webb M., Biochem. Biophys. Acta 222, 1970, 423.
- [18] Williamson D.H., Wilkinson J.P., J. Gen. Microbiol. 19, 1958, 198.
- [19] Zevenhuizen L., P.T.M., Dolfing J., Eshuis E.J., Scholten-Koerselman I.J., Microbial Ecol. 5, 1979, 139.

BIOACCUMULATION OF HEAVY METALS BY BACILLUS MYCOIDES BACTERIA

It was found, that *B. mycoides* bacteria accumulated copper, zinc and lead in their cellular mass. The quantities of metals found in biomass were directly proportional to their concentrations in the nutrient medium. It was shown that on a rich medium. The accumulation of copper was higher than on a poor one. Calcium ions influenced on the limitation of the toxic activity of copper and caused a smaller accumulation of Cu in biomass. About 35 % of copper accumulated in biomass was found as bonded to the poly- β -hydroxybutyric acid (cellular reserve material).