

УДК 541.6:574.4/5:631

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ СИМБИОЗА РИЗОБИУМ-БОБОВЫХ НА НАКОПЛЕНИЕ ЦИНКА В РАСТЕНИИ

Е.А. ЛОПАРЕВА, канд. биол. наук, доц. Н.В. ГОНЧАРОВА

(Международный государственный экологический университет им. А.Д. Сахарова, Минск)

В модельных экспериментах на гидропонике изучены особенности поступления ионов цинка в растение. Проанализированы особенности взаимодействия бактериальных экзополисахаридов с двумя формами цинка: сульфатом цинка $ZnSO_4$ и цинком в свободной форме $Zn(0)$ в виде металлической пудры. Установлено, что присутствие уоновых кислот в составе полисахаридов влияет на гидратацию металлов в свободной форме и стимулирует увеличение количества ионов цинка в растворе.

В связи с увеличением техногенной нагрузки на биосферу проблема загрязнения экосистем тяжелыми металлами приобретает все большую актуальность. Использование биологических материалов для сорбции тяжелых металлов является перспективной технологией ввиду их экономической эффективности. Необходимо более глубокое понимание механизмов гипераккумуляции и повышение эффективности экстракции токсичных элементов из почвы в растение. Биоремедиация токсичных металлов с помощью бактерий в качестве альтернативной технологии в настоящее время привлекает большое внимание [1, 2]. Процесс биосорбции в большинстве своем является реакциями псевдоионного обмена, в которых ион металла обменивается на противоион биомассы. В процессе биосорбции участвует несколько функциональных групп, в зависимости от pH раствора и химических характеристик металла. Эффективность сорбции металлов бактериями связывают с тем, что они синтезируют внеклеточные полисахариды (экзопалисахариды - ЭПС), в основном содержащие уоновые кислоты [3]. Азотфиксирующие бактерии, синтезирующие капсульные полисахариды, такие как *Azotobacter vinelandii* и *Derxia gummosa* также сорбируют металлы из растворов [4]. Достаточно полно изучена роль ризобияльных экзополисахаридов в отношениях растения-хозяина и бактерий [5], но только недавно начали исследовать их способность сорбировать тяжелые металлы.

Целью данной работы являлось изучение структуры полисахаридов, выделяемых бактериями *Rhizobium*, и выявление закономерностей взаимодействия данных полисахаридов с цинком в зависимости от состава экзополисахаридов.

В эксперименте использовали цинк в двух формах:

- 1) металлический $Zn(0)$ (пудра металлического цинка $0 < 60$ дт, концентрация в растворе 200 мг/л, Prolabo 29 063.296) в свободной форме;
- 2) сульфат цинка $ZnSO_4$, концентрация] мг/л. Валовое содержание цинка в растворе определяли методом плазменной эмиссионной спектроскопии (ICP-AES).

Экзопалисахариды продуцировали в колбах Эрленмейера (2 л) и культивировали (30 °C) при перемешивании (227 об/мин) в течение 70 часов, экстрагировали центрифугированием и очищали осаждением (3 объема этанола). Состав экзополисахаридов анализировали методами колориметрии (соотношение нейтральных сахаров и уоновых кислот) [6, 7], газовой хроматографии после гидролиза полимеров (определение моносахаров) и методом ядерно-магнитного резонанса - ЯМР *Н (определение ацетат-, пируват- и сульфат-групп). Пики на полученных спектрах ЯМР *Н были идентифицированы по спектрам сукциногликана, продуцируемого *Sinorhizobium meliloti* M5N1, которые хорошо изучены [8]. Для диализных экспериментов использовали диализные мембраны Spectra/Por 7 (не содержащие следов тяжелых металлов) с размером пор 1000 Да. Полиэтиленовые контейнеры (100 или 50 мл) наполняли экспериментальным раствором (наружный раствор, outside): дистиллированная вода или раствор Хоаг-ланда и Арно на. Внутрь контейнеров помещали диализные мешки с раствором ЭПС с таким расчетом, чтобы финальная концентрация ЭПС составила 0,01; 0,1 или 1 г/л. Металлы добавляли в виде солей: $ZnSO_4$ 15,3 дМ. Чтобы избежать микробной деградации ЭПС, в процессе эксперимента работа велась в стерильных условиях: использовали стерильные полиэтиленовые контейнеры, растворы металлов стерилизовали фильтрацией через фильтры с размером пор 0,2 д, ЭПС - 0,45 р. Каждая серия экспериментов проводилась в трехкратной повторности. Контрольные пробы не содержали ЭПС в диализных мешках, кроме того, для исключения возможного загрязнения контейнеров и растворов, в каждой серии экспериментов были вторичные контрольные пробы: без металлов и без ЭПС. Закрытые контейнеры инкубировали в течение времени, необходимого для установления равновесия в системе при $28 \pm 0,5$ °C и регулярном перемешивании. Концентрацию тяжелых металлов определяли на атомно-абсорбционном спектрометре Varian Zeeman или в плазменном спектрометре ICP-AES. Ошибка измерения составляла меньше 2 % для всех выполненных анализов.

Ранее нами были выделены штаммы бактерий семейства Rhizobiaceae, производящие оригинальные полисахариды, содержащие уроновые кислоты [9]. Среди 58 изолированных штаммов с целью изучения взаимодействия экзополисахаридов с тяжелыми металлами был выбран ЭПС, производимый штаммом strain 5 (Str 5). Данный экзополисахарид на 42 % состоит из глюкуроновых кислот. Согласно литературным данным, экзополисахариды, содержащие уроновые кислоты, играют важную роль в ремедиации экосистем, загрязненных тяжелыми металлами [10].

В настоящей работе использовали также и сукциноглюкан, синтезируемый «диким» штаммом *Sinorhizobium Meliloti* M5N1, который состоит из D-глюкозы, D-галактозы в соотношении 7:1, и замещенными сукциниловыми, пирувилловыми и ацетиловыми кислотами в соотношении 1:1:1; и глюкуронан, состоящий из глюкуроновой кислоты частично ацетилированной в позиции 2 и/или 3, синтезируемый лабораторным штаммом *Sinorhizobium Meliloti* M5N1 CS [8]. Сравнительная характеристика данных полисахаридов представлена в таблице.

Сравнительная характеристика выделенных экзогенных полисахаридов

Штамм	ЭПС	Продуктивность синтеза ЭПС, г/л	Содержание уроновых кислот, %	Отношение Glu:Gal:AGlu	Отношение Пируват: Ацетат: Сукцинат
Str 5	Str 5	2,15	42	1.4:1:2	1,25:1:0
M5NI	Сукциноглюкан	1,4	НС	7:1:0	1:1:1
M5NI CS	Глюкуронан	1,5	100	0:0:1	*НС

Примечание. Glu - глюкоза; Gal - галактоза; AGlu - диглюкокусная кислота.

Трехкратная повторность.

*НС - не содержит.

Для изучения влияния ЭПС с различным содержанием глюкуроновых кислот на гидратацию элементарного цинка в воде цинк в виде металлической пудры вносили в пластиковые контейнеры с дистиллированной водой. Изучено влияние трех полимеров на переход ионов цинка в раствор: глюкуронан (100 % глюкуроновых кислот), str5 (42 % глюкуроновых кислот) и сукциноглюкан (0 % глюкуроновых кислот). Глюкуронан и str5 изменяли pH среды от pH 7,0 до pH 4,5, в то время как практически нейтральный сукциноглюкан, не содержащий глюкуроновых кислот, поддерживал pH среды 7,8 (рис. 1).

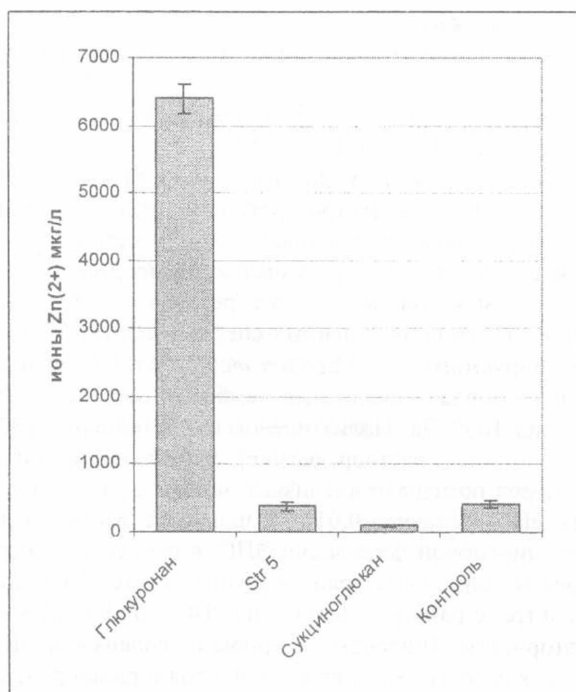


Рис. 1. Концентрация ионов цинка в растворе после 24-часовой инкубации Zn (0) в водных растворах различных ЭПС

Показано, что присутствие глюкуронана значительно повышает концентрацию ионов цинка в растворе по сравнению с контролем. В варианте с Str5 это превышение составляет 1,2 раза, а в варианте с глюкуронаном в 1,8 раза. Известно, что уронные кислоты, присутствуя в межклеточном пространстве, выполняют функцию фильтров, участвуя в сорбировании и иммобилизации токсичных веществ, изменяя растворимость ассоциированных с ними молекул и воздействуя на поверхностные характеристики растворенных частиц [3].

Полученные нами данные хорошо согласуются с литературными данными о роли микробных полисахаридов в эрозии минералов [11]. Согласно этим данным, микробные полисахариды действуют как сайты ионообмена, образуя комплексы с ионами металла и уменьшая насыщенность растворов, тем самым стимулируя дальнейшее растворение минерала.

Сорбцию полисахаридами сульфата цинка изучали, помещая ЭПС в диализные мешки SpectraPor 7 (1000 Да). Концентрацию ионов цинка в растворе измеряли после установления в системе равновесия. Для определения времени, необходимого для достижения равновесия системой «металлическая соль - вода (или питательный раствор)», из колбы 100 мл, содержащей сульфат цинка (начальная концентрация 1000 мкг/л) и диализный мешок с ЭПС (концентрация 0,1 г/л), отбирали по 1 мл через равные промежутки времени. Пробы анализировали методом плазменной эмиссионной спектроскопии (ICP-AES). Установлено, что после 24-часового взаимодействия система «металлическая соль - вода (или питательный раствор)» приходит в равновесное состояние. Содержание металлов определяли как внутри диализных мешков (C_{in}), так и в растворе (C_{out}), а также расчетным путем - количество металла, адсорбировавшегося на стенках сосуда - потери в ходе анализа (C_{lost}). Результаты процентного распределения данных величин для экспериментов в дистиллированной воде и питательном растворе представлены на рис. 2.

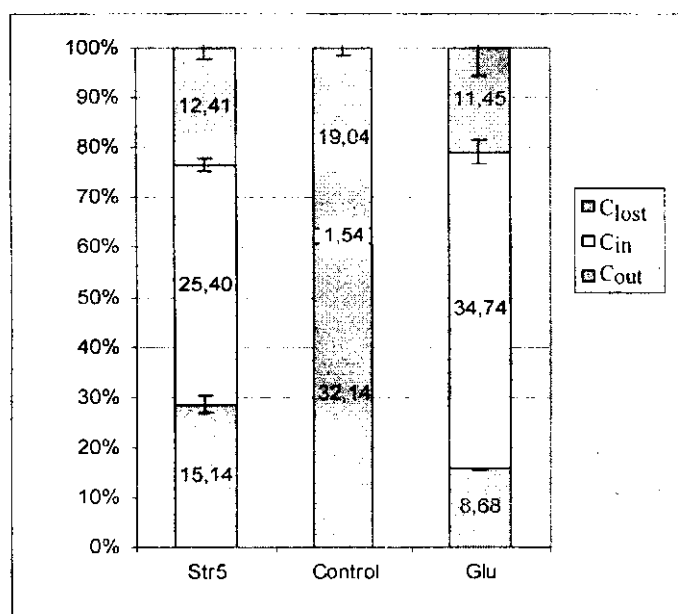


Рис. 2. Процентное содержание ионов цинка в системе «вода - ZnSO₄»

Числовые значения - количество цинка в мкг. C_{in} - количество ионов цинка (мкг) в диализном мешке; C_{OUT} - количество ионов цинка в наружном растворе; C_{lost} - количество цинка (мкг), потерянное в результате манипуляций (получено посредством вычитания C_{in} и C_{out} из начального количества ионов цинка в растворе). Повторность эксперимента - трехкратная.

Установлено, что глюкуронан сорбирует большее количество цинка из водного раствора, чем полисахарид, состоящий на 42 % из глюкуроновых кислот (Str 5). В контрольном варианте с диализными мембранами, но без ЭПС, небольшое количество металла сорбировалось на саму мембрану и на стенки сосуда, что обусловило увеличение C_{out} ионов цинка, не зарегистрированных ни во внешнем, ни во внутреннем (из диализных мешков) растворе.

Для изучения поведения экзополисахаридов в условиях конкуренции с EDTA-H₄ (EDTA - этилендиуксусная кислота) диализные мешки, содержащие ЭПС (концентрация 0,1 г/л), инкубировали в сосудах с водными растворами сульфата цинка или нитрата кадмия. Эксперимент проводился в течение 24 часов (экспериментально определенное время установления равновесия в данной системе). Концентрация EDTA

была подобрана с помощью расчета концентраций ионов на программном обеспечении JChess {база данных MINTEQ Л2), которое широко используется для моделирования различных форм неорганических соединений в водных растворах [12]. Концентрация EDTA 7 мкМ/л обеспечивает ситуацию, когда большая часть ионов Zn^{2+} связана в комплексы $ZnEDTA^{2-}$, оставляя, однако, некоторое количество свободных ионов цинка. Результаты эксперимента представлены на рис. 3.

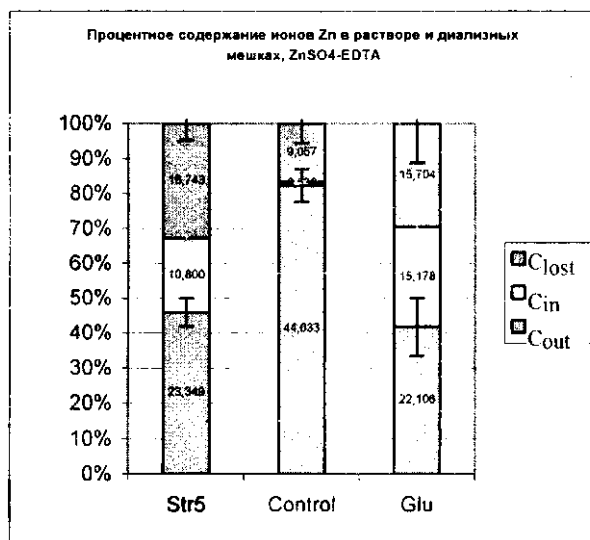


Рис. 3. Процентное содержание ионов цинка в системе «вода - EDTA - $ZnSO_4$ »

Числовые значения - количество цинка в мкг. C_n - количество ионов цинка (мкг) в диализном мешке; C_{out} - количество ионов цинка в наружном растворе; C_{lost} - количество цинка (мкг), потерянное в результате манипуляций (получено посредством вычитания C_{in} и C_{out} из начального количества ионов цинка в растворе). Повторность эксперимента - трехкратная.

Анализ влияния EDTA на поглощение ионов цинка полисахаридами бактерий. Установлено достоверное уменьшение в 2,3 раза концентрации ионов цинка в растворе полисахаридов и EDTA, по сравнению с раствором, не содержащим EDTA-комплекс. Полисахариды способны конкурировать с сильным комплексобразователем EDTA за ионы цинка. В обоих случаях: система «вода - ЭГIC» и «вода - ЭПС-EDTA» глюкоуронан в 1,4 раза больше, чем str5 стимулировал сорбцию ионов цинка.

Эти результаты согласуются с литературными данными о конкуренции между EDTA и бактериями *Bacillus subtilis* за ионы кадмия; внесение EDTA уменьшало адсорбцию кадмия бактериальными клетками при pH 6,0 с 90 до 60 % от общего количества кадмия в системе [13].

Полученные нами данные позволяют заключить, что экзополисахариды, синтезируемые бактериями *Rhizobium*, играют важную роль не только в регуляции симбиотических отношений с бобовыми растениями, но и оказывают влияние на корневое поступление тяжелых металлов в растения.

Присутствие уоновых кислот в составе полисахаридов влияет на гидратацию металлов в свободной форме и стимулирует увеличение количества ионов этого металла в растворе.

Глюкуроан, состоящий на 100 % из глюкуроновой кислоты, оказывает наиболее сильное влияние на переход ионов цинка в раствор из металлической пудры цинка (цинк в свободном состоянии).

Str 5, содержащий 42 % глюкуроновых кислот, соответственно, менее эффективен в гидратации свободного цинка. Глюкуроан, как и Str 5, успешно конкурируют с EDTA за связанные ионы цинка [14].

Работа выполнена при поддержке посольства Франции в Республике Беларусь в рамках гранта научных программ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shumate S.E., Strandberg G.W. Accumulation of metals by microbial cells. Comprehensive Biotechnology. 1985. - V. 4. Pergamon Press, New-York.
2. Gadd G.M. Biosorption // J. Chem. Technol. Biotechnol. - 1992. - № 55. - P. 302 - 304.

3. Hung Chin-Chang, Santschi P.H. Spectrophotometric determination of total uronic acids in seawater using cation-exchange separation and pre-concentration by lyophilization // *Analytica Chimica Acta*. 2001. - №42. - P. 111 - 117.
4. Biosorption of metal ions by *Azobacter vinelandii* / D. Cotoras, M. Millar, P. Viedma et al. // *World J. Microbiol. Biotechnol.* - 1992. - № 8. - P. 319 - 323.
5. Dudman W.F. The polysaccharides and oligosaccharides of *Rhizobium* and the role in the infection process. In / Eds. C. Veeger, W.E. Newton, *Advances in Nitrogen Fixation Research*. Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, The Hague, Netherlands. 1984. - P. 397 -404.
6. Monsigny M., Petit C, Roche A.C, Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol acid micro-method // *Anal. Biochem.* - 1998, - № 175. - P. 525 - 530.
7. A microtiter assay for the determination of uronic acids / B.M. Van den Hoogen, P.R. Van Weeren, M. Topes-Cardozo et al. // *Anal. Biochem.* - 1998. - № 257. - P. 107-111,
8. Heyraud, A., M. Rinaudo, B. Courtois. Comparative studies of extracellular polysaccharide elaborated by *Rhizobium meliloti* strain M5N1 in defined medium and in non-growing cell suspensions // *Int. J. Biol. Macromol.* - 1986. - № 8. - P. 85 - 88.
9. Characterization of EPS from *Rhizobium* of plants grown on the area contaminated with radionuclides. In proceedings of working group 3 / A. Lopareva, N. Pawlicki-Julian, N. Goncharova et al. ESNA XXXIII annual meeting, December 2003. - P. 42 - 46.
10. Mamaril JC, Paner ET, Capuno VT, Trinidad LC. Reduction of heavy metal concentration in liquids by *Rhizobium* polysaccharides // *Asean J Sci. Technol. Dev.* - 1989, № 6 (2), - P. 75 - 86.
11. Welch S.A., Barker W.W., Banfield J.F. Microbial extracellular polysaccharides and plagioclase dissolution // *Geochim. Cosmochim. Acta.* - 1999. - № 63. P. 1405 - 1419.
12. Allison J.D., Brown D.S., Novo-Gradac K.J. MINTEQA2/PRODEFA2, A geochemical assessment model for environmental systems: Version 3.0 Users manual. EPA/600/3-93/021, US Environmental Protection Agency, Athens, GA, 1991.
13. Fein J.B., Delear D, Experimental study of the effect of EDTA on Cd adsorption by *Bacillus subtilis*: a test of the chemical equilibrium approach // *Chemical Geology.* - 1999. N 161. - P. 375-383, --
14. Лопарева Е.А. Влияние экзогенных полисахаридов на накопление цинка растениями на примере гипераккумулятора *Thlaspi caerulescens* // Сахаровские чтения 2004 года: Экологические проблемы XXI века: Материалы междунар. науч. конф., Минск, 21-22 мая 2004 г. - Мн., 2004. - С. 227 -229.