

УДК 579.23, 579.24

DOI: 10.31040/2222-8349-2021-0-2-86-91

ВЛИЯНИЕ КАДМИЯ И СВИНЦА НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК У ЛАКТОБАЦИЛЛ

© Н.Л. Бруслик, А.В. Кириллова, А.Н. Сизенцов, Д.Р. Яруллина

Тяжелые металлы кадмий (Cd) и свинец (Pb) относятся к опасным загрязнителям окружающей среды. Попадая в организм человека, они способны накапливаться и приводить к развитию целого ряда серьезных заболеваний. Пробиотические лактобациллы способны увеличивать толерантность организма к тяжелым металлам, связывая их и тем самым осуществляя их детоксикацию. Мы оценили влияние Cd и Pb на образование биопленок у десяти штаммов лактобацилл, семь из которых способны извлекать Cd из среды культивирования. Мы показали, что штаммы, обладающие детоксикационным действием в отношении Cd, плохо образуют биопленки за 24 ч роста в отличие от бактерий *Lactobacillus brevis* 20054 и *Lactobacillus rhamnosus* B-8238, которые не способны извлекать Cd из раствора, но активно образуют биопленки. У этих штаммов в концентрациях 5 и 10 мг/л Cd снижал образование биопленок, а Pb не оказывал значимого эффекта на биопленки. Cd и Pb в наивысшей использованной концентрации 50 мг/л негативно влияют на процесс формирования биопленок у всех лактобацилл вследствие токсического действия на клетки. Показано, что в составе биопленки лактобациллы не приобретают повышенную устойчивость к тяжелым металлам. Установлена корреляция средней силы между формированием биопленок и гидрофобностью, электрон-акцепторными и электрон-донорными свойствами поверхности бактерий.

Ключевые слова: лактобациллы, кадмий, свинец, рост, биопленки.

Введение. Расширение производственной деятельности человека, в том числе горнодобывающей промышленности и металлургии, а также создание синтетических соединений привело к экспоненциальному росту содержания тяжелых металлов в воде, почве и воздухе. Кадмий (Cd) и свинец (Pb), согласно ГОСТ 12.1.007-76, относятся к высоко опасным веществам (2-му классу опасности). Pb действует на различные системы организма, вызывает расстройства нервной системы, анемию, гипертензию, почечную недостаточность, нарушает функцию иммунной и репродуктивной систем. Он особенно опасен для детей младшего возраста, так как вызывает у них необратимое ухудшение памяти и уменьшение интеллектуальных способностей. Pb способен накапливаться в зубах и костях. Cd оказывает токсическое воздействие на почки, костную и дыхательную системы, также страдают печень,

сердечно-сосудистая система и репродуктивная функция. Кроме того, Cd относят к числу опасных для человека канцерогенов [1].

В последние несколько лет резко вырос интерес к молочнокислым микроорганизмам, способным связывать тяжелые металлы, как к альтернативе физическим и химическим методам детоксикации тяжелых металлов. Связывание тяжелых металлов пробиотическими бактериями предложено для очистки воды, жидкой пищи и организма человека от этих поллютантов [2]. Биопленки, микробные сообщества, в которых клетки необратимо прикреплены друг к другу и субстрату, а также защищены внеклеточным полимерным матриксом преимущественно полисахаридного состава, являются распространенной формой существования микроорганизмов, в том числе лактобацилл, в естественных условиях [3]. Ранее у четырех штаммов *L. plantarum* и трех штаммов *L. fermentum*,

БРУСЛИК Наталия Леонидовна, Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: nbruslik@yandex.ru

КИРИЛЛОВА Анна Владимировна, Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: fyz246@mail.ru

СИЗЕНЦОВ Алексей Николаевич – к.б.н., Оренбургский государственный университет,
e-mail: asizen@mail.ru

ЯРУЛЛИНА Дина Рашидовна – к.б.н., Казанский (Приволжский) федеральный университет,
e-mail: kasfes@gmail.com

выделенных нами из пробиотических препаратов, кисломолочных продуктов и силоса, была обнаружена способность извлекать Cd из среды MRS при инкубировании в течение 24 ч [4]. Цель данной работы – выяснить влияние тяжелых металлов (Cd и Pb) на способность лактобацилл образовывать биопленки. Данное исследование призвано углубить наше представление о механизмах связывания ионов тяжелых металлов бактериями и способствовать практическому применению данных лактобацилл для детоксикации тяжелых металлов и увеличения толерантности организма к антропогенной нагрузке в условиях среды, загрязненной Cd и Pb. Для достижения поставленной цели, кроме собственно определения формирования биопленок методом окрашивания генцианвиолетом, мы оценили влияние Cd и Pb на рост лактобацилл и исследовали связь между биопленкообразованием и физико-химическими параметрами поверхности бактерий.

Материалы и методы исследования.

В работе использовали 10 штаммов лактобацилл: *L. brevis* DSM-20054, *L. buchneri* DSM-20057 (Немецкая коллекция микроорганизмов и культур клеток, DSMZ), *L. rhamnosus* B-8238 (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов, ВКПИМ), *L. plantarum* B-578 (Всероссийская коллекция микроорганизмов), *L. plantarum* S1 (Силос, СХП «Кулон» Чистопольского района Республики Татарстан), *L. plantarum* 8PA3 (лекарственный препарат «Лактобактерин сухой», ФГУП НПО «Биомед»), *L. plantarum* Ga (лекарственный препарат «Гастрофарм», АО «Биовет», Болгария), *L. fermentum* Na (БАД «Наринэ», ОАО «Narex», Армения), *L. fermentum* 3-2 (Кисломолочный напиток «Айран», ООО ФудМилк), *L. Fermentum* 3-3 (Кисломолочный напиток «Дар гор», ООО ФудМилк). Бактерии выращивали в 96-луночных полистироловых планшетах Cellstar (Grenier Bio-one) при 37°C на питательной среде MRS (BD Difco). В лунки планшета вносили по 150 мкл ночной культуры лактобацилл, разведенной 1:50 свежей средой MRS с Pb или Cd. Водные растворы Cd (2 мг/мл) и Pb (2 мг/мл) готовили из $Cd(NO_3)_2$ и $Pb(NO_3)_2$ (Sigma-Aldrich) соответственно, стерилизовали автоклавированием и вносили в MRS перед инокуляцией. На 24 ч роста с помощью планшетного ридера xMark Bio-Rad (США) оценивали рост культур лактобацилл по оптической

плотности при 600 нм и образование биопленок по степени связывания ими кристаллического фиолетового, как описано ранее [5].

Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента; за критерий значимости отличий между двумя группами данных принимали критерий вероятности $P < 0.05$. Для определения коэффициента корреляции использовали метод Пирсона.

Результаты и обсуждение. На первом этапе работы оценили влияние Cd и Pb в концентрациях 5, 10 и 50 мг/л на рост лактобацилл (рис. 1). Наивысшая концентрация обоих тяжелых металлов обладала значительным токсическим действием в отношении всех исследованных лактобацилл, а наименьшая концентрация, напротив, не оказывала существенного эффекта на рост бактерий. При наличии в среде роста Pb в концентрации 10 мг/л рост *L. buchneri* 20057 и *L. plantarum* Ga снижался на 26 и 28% соответственно, по сравнению с культурами, выращенными на среде без добавок. К 10 мг/л Cd проявили чувствительность три штамма *L. plantarum* (B-578, S1, 8PA3) и один штамм *L. fermentum* 3-2. В нашей работе ранее было показано, что 10 мг/л Cd практически полностью останавливает рост культур *L. brevis* 20054, *L. buchneri* 20057 и *L. rhamnosus* B-8238 [4]. Данное отличие, по-видимому, объясняется разными условиями аэрации при культивировании лактобацилл: в предыдущей работе лактобациллы инкубировали с перемешиванием каждые 30 мин, тогда как в настоящем исследовании бактерии выращивали в микроаэрофильных условиях. По-видимому, токсическое действие Cd и Pb в аэробных условиях объясняется известной способностью данных тяжелых металлов индуцировать образование активных форм кислорода (АФК), вызывающих окислительное повреждение липидов, белков и нуклеиновых кислот в клетке [6]. Полученные данные о влиянии Cd и Pb на рост лактобацилл согласуются с работой [7], в которой показано, что бактерии этой группы хотя и характеризуются в целом высокой устойчивостью к тяжелым металлам, но отношение к этим элементам у них видо- и даже штаммоспецифично.

Лактобациллы, как большинство бактерий, в естественных условиях существуют в форме биопленок [3]. Известно, что тяжелые металлы способны влиять на формирование бактериальных биопленок – так, ионы Ni и Cd

в микромолярных концентрациях ингибируют кворум-сенсинг у бактерий *Burkholderia multivorans* [8]. Для ряда бактерий, в основном патогенных (*Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* и *Escherichia coli*), наоборот, железо необходимо для образования биопленок [9]. В данной работе мы исследовали влияние Cd и Pb на способность лактобацилл образовывать биопленки по связыванию ими красителя генцианвиолета (рис. 1). Показали, что бактерии *L. fermentum* 3-3 не способны образовывать биопленки на 24 ч роста, также очень слабо это свойство проявляется у штаммов *L. fermentum* Na, *L. plantarum* Ga и S1. Среди исследованных лактобацилл наиболее активно биопленки образовывали бактерии *L. brevis* 20054 и *L. rhamnosus* B-8238, причем тяжелые металлы оказывали сходное действие на биопленки у обоих штаммов: Cd в концентрациях 5 и 10 мг/л снижал образование биопленок, а Pb не оказывал значимого эффекта на биопленки. Отметим, что 5 и 10 мг/л Cd и Pb не оказывали токсического действия на клетки, следовательно, можно предположить, что обнаруженное снижение образования биопленок связано с влиянием ионов тяжелых металлов на механизмы образования биопленок: кворум-сенсинг, биосинтез экзополисахаридов и др. [3]. У всех исследованных лактобацилл обнаружено снижение образования биопленок в присутствии 50 мг/л Cd и Pb, что, вероятно, обусловлено токсичностью этой концентрации тяжелых металлов для лактобацилл.

Известно, что в составе биопленок бактерии более устойчивы к токсическому действию тяжелых металлов по сравнению с планктонными микроорганизмами [10]. Действительно, среди исследованных лактобацилл рост активно образующих биопленки штаммов *L. brevis* 20054 и *L. rhamnosus* B-8238 в наименьшей степени зависел от присутствия в среде Cd и Pb. Тем не менее аналогичное отношение к тяжелым металлам продемонстрировал штамм *L. fermentum* 3-3, не способный формировать биопленки. Таким образом, связи между устойчивостью к тяжелым металлам и биопленкообразованием в нашей работе не выявлено.

Известно, что поверхность бактериальных клеток играет существенную роль в образовании биопленок. Поверхностные белковые (пили, S-слой) и полисахаридные (капсулы, чех-

лы, слизи) структуры влияют на биопленкообразование и определяют физико-химические свойства поверхности клеток [11]. Так, белки и вероятно также (липо)тейхоевые кислоты обуславливают гидрофобный характер бактериальной поверхности, а полисахариды – гидрофильные свойства [12]. Карбоксильные ($-\text{COO}^-$) и гидросульфитные ($-\text{HSO}_3^-$) группы на поверхности бактерий сообщают ей основные и электрон-донорные свойства [13]. Как мы показали ранее [4], у всех исследованных лактобацилл поверхности клеток слабо кислые, плохо акцептируют электроны и несут отрицательный заряд. Большинство штаммов являются гидрофильными, кроме *L. plantarum* B-578, *L. brevis* 20054 и *L. buchneri* 20057, у которых поверхности клеток гидрофобные. В данной работе мы оценили влияние этих физико-химических особенностей поверхности лактобацилл на их способность образовывать биопленки. Выявлена корреляция средней силы между формированием биопленок и гидрофобностью бактерий ($r = 0.6$, $P < 0.05$), электрон-акцепторными ($r = 0.52$, $P < 0.05$) и электрон-донорными ($r = 0.55$, $P < 0.05$) свойствами поверхности, но не обнаружена статистически значимая связь биопленкообразования с зарядом поверхности клеток.

В последние несколько лет резко вырос интерес к лактобациллам, способным связывать тяжелые металлы, как к альтернативе физическим и химическим методам детоксикации тяжелых металлов. В ряде работ показано, что полисахаридный матрикс биопленки может связывать тяжелые металлы [14]. Ранее нами была обнаружена способность связывать Cd у нескольких штаммов *L. plantarum* и *L. fermentum*, причем наиболее активно Cd из раствора поглощали бактерии *L. plantarum* B-578 и *L. fermentum* 3-3. Исходя из протяженного характера связывания Cd и отсутствия его корреляции с физико-химическими параметрами поверхности клеток бактерий, мы предположили, что клетки *L. plantarum* и *L. fermentum* аккумулируют ионы тяжелых металлов внутри клеток, а не связывают на поверхности [4]. Результаты данного исследования согласуются с этим предположением, поскольку свидетельствуют о том, что бактерии *L. plantarum* и *L. fermentum* на 24 ч роста не формируют биопленки, следовательно, полисахаридный матрикс биопленок не участвует в связывании ионов металлов.

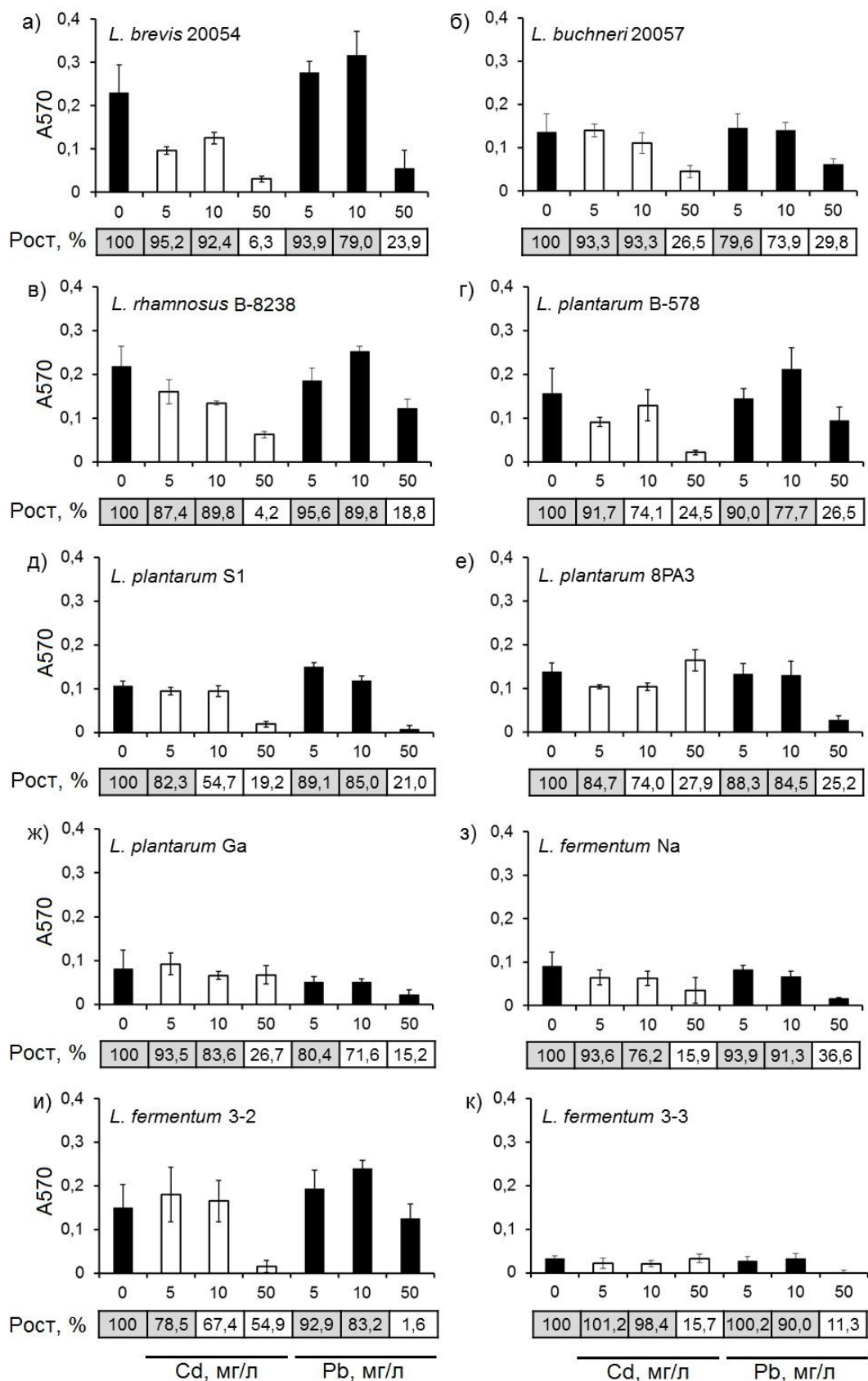


Рис. 1. Влияние Cd (светлые столбцы) и Pb (темные столбцы) на образование биопленок (диаграммы) и рост (таблицы) лактобацилл. За 100% принят рост (оптическая плотность при 600 нм) культур, инкубируемых на среде без тяжелых металлов

Таким образом, результаты данной работы свидетельствуют о том, что в нетоксичных для лактобацилл концентрациях 5 и 10 мг/л Cd способен снижать образование биопленок у некоторых лактобацилл (*L. brevis* 20054 и *L. rhamnosus* B-8238), но поскольку связывание Cd у лактобацилл происходит по механизму внутриклеточной аккумуляции, а не сорбции на поверхности клеток и матриксом биопленки, данное снижение биопленкообразования не будет снижать детоксикационное действие лактобацилл в отношении Cd. Также показано, что при росте в виде биопленок лактобациллы не приобретают повышенную устойчивость к токсическому действию тяжелых металлов.

Работа выполнена в рамках Программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана грантами РФФИ (14-34-50478, 17-00-00456).

Литература

1. Lead and Cadmium: Need for International Action? [Электронный ресурс] / Intergovernmental Forum on Chemical Safety (IFCS), Forum VI, Agenda Proposal [Dakar, 2008]. Дата обновления: 22.02.2008. URL: https://www.who.int/ifcs/documents/standingcommittee/lyc_09.pdf (дата обращения: 09.10.2020).
2. Halttunen T., Salminen S., Tahvonon R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria // *Int. J. Food Microbiol.* 2007. V. 114. P. 30–35. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040
3. Salas-Jara M.J., Ilabaca A., Vega M., García A. Biofilm forming *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics // *Microorganisms*. 2016. V. 4, No. 3. pii: E35. doi: 10.3390/microorganisms4030035
4. Kirillova A.V., Danilushkina A.A., Irisov D.S., Bruslik N.L., Fakhrullin R.F., Zakharov Y.A., Bukhmin V.S., Yarullina D.R. Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to lead and cadmium // *Int. J. Microbiol.* 2017. V. 2017. ID 9869145. 7 p. URL: <https://doi.org/10.1155/2017/9869145>
5. Яруллина Д.Р., Вакатова Л.В., Криворучко А.В., Рубцова Е.В., Ильинская О.Н. Влияние экзогенного и эндогенного оксида азота (II) на образование биопленок у *Lactobacillus plantarum* // *Микробиология*. 2013. Т. 82, № 4. С. 417–421. <https://doi.org/10.1134/S0026261713040140>
6. Patra R.C., Rautray A.K., Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration // *Vet. Med. Int.* 2011. V. 2011. 457327. doi: 10.4061/2011/457327
7. Solioz M., Mermod M., Abicht H.K., Mancini S. Responses of lactic acid bacteria to heavy metal stress, Chapter 9 // *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Tsakalidou E., Papadimitriou K. (eds). Springer Science, Business Media, LLC, 2011. P. 163–195.
8. Vega L.M., Mathieu J., Yang Y., Pyle B.H., McLean R.J.C., Alvarez P.J.J. Nickel and cadmium ions inhibit quorum sensing and biofilm formation without affecting viability in *Burkholderia multivorans* // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2014. V. 91. P. 82–87.
9. Weinberg E.D. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation // *Med. Hypotheses*. 2004. V. 63, № 5. P. 863–865. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.04.010>
10. Teitzel G.M., Parsek M.R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2003. V. 69. № 4. P. 2313–2320. doi: 10.1128/aem.69.4.2313-2320.2003
11. Choi N., Bae Y., Lee S. Cell surface properties and biofilm formation of pathogenic bacteria // *Food Sci. Biotechnol.* 2015. V. 24. P. 2257–2264. URL: <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0301-y>
12. Boonaert C.J.P., Rouxhet P.G. Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties // *Appl. Environ. Microbiol.* 2000. V. 66. P. 2548–2554. doi: 10.1128/aem.66.6.2548-2554.2000
13. Bellon-Fontaine M.N., Rault J., van Oss C.J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial-cells // *Colloids Surf.* 1996. V. 7. P. 47–53. [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)
14. Gupta P., Diwan B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies // *Biotechnol. Rep.* 2017. V. 13. P. 58–71. doi: 10.1016/j.btre.2016.12.006

References

1. Lead and cadmium: Need for international action? Intergovernmental Forum on Chemical Safety (IFCS), Forum VI, Agenda Proposal (Dakar, 2008). Date: 22.02.2008. Available at: https://www.who.int/ifcs/documents/standingcommittee/lyc_09.pdf (accessed September 9, 2020).
2. Halttunen T., Salminen S., Tahvonon R. Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, vol. 114, pp. 30–35. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.040
3. Salas-Jara M.J., Ilabaca A., Vega M., García A. Biofilm forming *Lactobacillus*: New challenges for the development of probiotics. *Microorganisms*, 2016, vol. 4, no. 3. pii: E35. DOI: 10.3390/microorganisms4030035
4. Kirillova A.V., Danilushkina A.A., Irisov D.S., Bruslik N.L., Fakhrullin R.F., Zakharov Y.A., Bukhmin V.S., Yarullina D.R. Assessment of resistance and bioremediation ability of *Lactobacillus* strains to lead and cadmium. *Int. J. Microbiol.*, 2017, vol. 2017.

ID 9869145. 7 p. Available at: <https://doi.org/10.1155/2017/9869145>

5. Yarullina D.R., Vakatova L.V., Krivoruchko A.V., Rubtsova E.V., Ilyinskaya O.N. Effect of exogenous and endogenous nitric oxide on biofilm formation by *Lactobacillus plantarum*. *Mikrobiologiya*, 2013, vol. 82, no. 4, pp. 423–427. Available at: <https://doi.org/10.1134/S0026261713040140>

6. Patra R.C., Rautray A.K., Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Int.*, 2011, vol. 2011, 457327. DOI: 10.4061/2011/457327

7. Solioz M., Mermod M., Abicht H.K., Mancini S. Responses of lactic acid bacteria to heavy metal stress, Chapter 9. *Stress Responses of Lactic Acid Bacteria*. Tsakalidou E., Papadimitriou K. (eds). Springer Science, Business Media, LLC, 2011, pp. 163–195.

8. Vega L.M., Mathieu J., Yang Y., Pyle B.H., McLean R.J.C., Alvarez P.J.J. Nickel and cadmium ions inhibit quorum sensing and biofilm formation without affecting viability in *Burkholderia multivorans*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2014, vol. 91, pp. 82–87.

9. Weinberg E.D. Suppression of bacterial biofilm formation by iron limitation. *Med. Hypotheses*, 2004, vol. 63, no. 5, pp. 863–865. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.04.010>

10. Teitzel G.M., Parsek M.R. Heavy metal resistance of biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, vol. 69, no. 4, pp. 2313–2320. DOI: 10.1128/aem.69.4.2313-2320.2003

11. Choi N., Bae Y., Lee S. Cell surface properties and biofilm formation of pathogenic bacteria. *Food Sci. Biotechnol.*, 2015, vol. 24, pp. 2257–2264. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10068-015-0301-y>

12. Boonaert C.J.P., Rouxhet P.G. Surface of lactic acid bacteria: Relationships between chemical composition and physicochemical properties. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, pp. 2548–2554. DOI: 10.1128/aem.66.6.2548-2554.2000

13. Bellon-Fontaine M.N., Rault J., van Oss C.J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial-cells. *Colloids Surf.*, 1996, vol. 7, pp. 47–53. Available at: [https://doi.org/10.1016/0927-7765\(96\)01272-6](https://doi.org/10.1016/0927-7765(96)01272-6)

14. Gupta P., Diwan B. Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: a review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies // *Biotechnol. Rep.*, 2017, vol. 13, pp. 58–71. DOI: 10.1016/j.btre.2016.12.006

EFFECTS OF CADMIUM AND LEAD ON BIOFILM FORMATION BY *LACTOBACILLUS*

© N.L. Bruslik¹, A.V. Kirillova¹, A.N. Sizensov², D.R. Yarullina¹

¹Kazan (Volga region) Federal University,
18, ulitsa Kremlevskaya, 420008, Kazan, Russian Federation

²Orenburg State University,
13, prospekt Pobedy, 450018, Orenburg, Russian Federation

Lead and cadmium are the common environmental heavy metal pollutants and have widespread distribution. In human body they get accumulated and cause many serious diseases. Probiotic lactobacilli have been reported to bind heavy metals, thus detoxifying them and increasing one's tolerance to heavy metals. In this paper, we studied the effects of Cd and Pb on biofilm formation by ten *Lactobacillus* strains from which seven were shown to remove Cd from culture medium. We showed that after 24 h Cd-detoxifying strains formed slightly detectable biofilms while Cd non-binding *L. brevis* 20054 and *L. rhamnosus* B-8238 formed mature biofilms. In latter strains, application of 5 and 10 mg/L Cd resulted in the reduced biofilm formation, while Pb had no effect at these concentrations. Both Cd and Pb at 50 mg/L concentration inhibited biofilm formation by all tested lactobacilli due to their toxic effect. The presence of lactobacilli in biofilms did not increase their resistance to heavy metals. The results of this study indicate the average correlation between the biofilm formation and physicochemical properties of a bacterial cell under consideration that is hydrophobicity, Lewis acid-base interactions and surface charge.

Key words: *Lactobacillus*, cadmium, lead, growth, biofilms.