

EFECTUL CUPRULUI ASUPRA METABOLISMULUI PROTEIC ȘI GLUCIDIC

AL BACTERIEI RIZOSFERICE *Pseudomonas aureofaciens*

Pavel GRIGORCEA, Ecaterina EMNOVA*, Oxana GANEA

Catedra Biologie Vegetală

*Institutul de Genetică și Fiziologie a Plantelor al AȘM

The evaluation of the impact of copper on protein and carbohydrate metabolism of bacteria *Pseudomonas aureofaciens* CNMN PsB-03 isolated from soybean rhizosphere soil have been made in sand columns experiment. Enhanced copper concentrations (100 and 300 ppm Cu/g of dry sand) provoked the realization of ability to plentiful EPS synthesis as protective mechanism, and investigated bacteria revealed a high resistance against copper toxicity up to concentration 300 ppm Cu/g of dry sand. Essential modifications in intracellular protein composition at three compared populations, formed during incubation for 20 weeks at the presence of high copper concentrations and then returned to normal cultivation condition, have been not established.

Solurile sudice ale Moldovei, utilizate în viticultură, sunt suprasaturate cu cupru tehnogen, în urma utilizării multianuale a fungicidelor ce conțin cupru [1]. Conținutul total de cupru (CMA Cu_{total} 55 mg/kg de sol; Cu_{mobil} 3 mg/kg de sol) în solurile cu viță de vie pot constitui 255 kg/ha (135 mg/kg de sol), în solurile arabile 42 kg/ha (22 mg/kg de sol) [2]. Migrarea metalului toxic din sol prezintă un pericol pentru populațiile tuturor organismelor vii. Dezvoltarea rezistenței la organisme are loc în procesul de adaptare la anumite condiții ale mediului extern. Reacțiile de apărare includ sinteza metaboliților, al căror rol biologic constă în neutralizarea acțiunilor negative din mediul extern. Funcții de protecție au fost depistate la diverse clase de biomolecule (proteine, lipide, polizaharide).

Rizosfera reprezintă zona ecosistemului edafic unde activitatea microbiană e maximă. Partea aceasta a ecosistemului de sol poate avea un rol semnificativ în nutriția plantelor și în controlul bioaccesibilității poluanților toxici. S-a constatat că bacteriile rizosferice ale genului *Pseudomonas* sintetizează o gamă largă de substanțe biologice active ce influențează dezvoltarea plantelor (de exemplu: antibiotice, siderofori, toxine ș.a.) [3]. Mai mult ca atât, tulpnile de bacterii cu un nivel înalt de producere a exopolizaharidelor (EPZ) contribuie la majorarea agregării solurilor și, ca rezultat, la îmbunătățirea regimului nutritiv, hidric și termic pentru plantele de cultură [4].

Scopul cercetărilor de față a constat în evaluarea efectului cuprului asupra metabolismului proteic și glucidic al bacteriei rizosferice *Pseudomonas aureofaciens*, izolate din solul aderat rădăcinilor de soia.

Material și metode

În calitate de obiecte de cercetare au fost utilizate populația bacteriană izolată din sol rizosferic sub soia *Pseudomonas aureofaciens* CNMN PsB-03 – reprezentatul genului *Pseudomonas* ce predomină în rizosfera plantelor, și cuprul – un microelement ce intră în compoziția unor enzime care catalizează procese de oxidoreducere, reglează metabolismul glucidelor, proteinelor și ale altor biomolecule. Concomitent, cuprul face parte din grupa metalelor poluante, care pot dereglă atât procesele biochimice în celulele bacteriene, cât și derula reacției adaptive (protective) contra efectului toxic al poluantului.

Ideea experimentului model pentru obținerea materialului de investigare a constat în imitarea sistemului de sol cu introducerea periodică și ocazională a substanțelor organice nutritive și a fost descrisă de noi în [5]. Experimentul a fost efectuat după cum urmează: populația *Pseudomonas aureofaciens* a fost introdusă în coloane de nisip (11 x 2 cm) cu mediu nutritiv cu zaharoză (SP) [6] ce conțineau 5 mg de zaharoză și $5 \cdot 10^8$ celule la 1g de nisip uscat. Populația a fost analizată în trei situații diferite: fără Cu și două concentrații extreme de CuSO₄·5H₂O: 100 și 300 mg Cu/kg de nisip uscat. Coloanele au fost incubate la 25°C timp de 20 săptămâni până la condiții anabiotice, ca urmare a epuizării sursei de hrană. Apoi, prima jumătate a coloanelor a fost supusă analizei, iar nisipul din a doua jumătate a coloanelor a fost suplimentat cu nutriment proaspăt de mediu SP. Conținutul acestor coloane a fost analizat după o săptămână de incubare. Parametrii analizați includeau: numărul rizobacteriilor cu capacitatea de sinteză a exopolizaharidelor (în dependență de concentrația cuprului în nisip) – prin metoda însămânțării pe cutii Petri cu mediu SP [7]; carbonul biomasei

microbiene – prin metoda de rehidratare și oxidare bicromatică [8]; sinteza cantitativă a EPZ de către bacteriile rizosferice – prin 2 metode: metoda spectrofotometrică după conținutul carbohidraților cu fenol și acid sulfuric [9] și cea gravimetrică după sedimentarea cu acetonă sau alcool etilic răcite [10]. Activitatea bacteriană a fost măsurată după viteza de hidroliză a diacetatului fluorescein (VHDF) [11]. Polimorfismul proteic a fost apreciat prin metoda SDS-PAGE [12].

Rezultate și discuții

Supraviețuirea populației de pseudomonade fluorescente *Pseudomonas aureofaciens* în prezența concentrațiilor ridicate de cupru. Din datele prezentate în Figura 1 reiese că poluarea mediului de viață al pseudomonadelor cu cupru provoacă o creștere a conținutului de carbon al biomasei microbiene (B_c) până la un prag anumit de concentrație a toxicantului, după ce intensitatea înmulțirii celulelor bacteriene scade. Adaosul de nutrient proaspăt (săptămâna a 21-a) stimulează acumularea de B_c la ambele concentrații de poluant, însă corelația dintre concentrația de cupru și carbonul biomasei bacteriene rămâne asemănătoare.

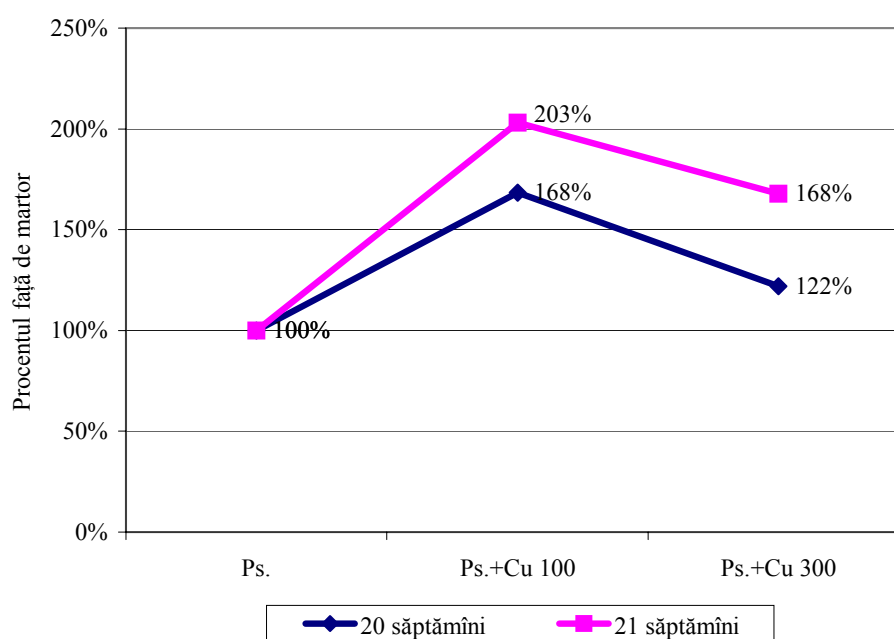


Fig.1. Carbonul biomasei microbiene în coloanele cu nisip inoculat de *Pseudomonas aureofaciens* CNMN PsB-03.

În Figura 2 este prezentat numărul rizobacteriilor cu capacitatea de sinteză a exopolizaharidelor (EPZ) în dependență de concentrația cuprului în mediu (nisip). Din datele obținute reiese că în perioada de utilizare a nutrientului până la anabioză (20 săptămâni) are loc reducerea numărului de rizobacterii producătoare de EPZ aproape de 2 ori, când concentrația cuprului este de 100 mg/kg nisip și de 20 de ori, când concentrația poluantului este respectiv de 300 mg/kg nisip față de probele de control (fără cupru). Adaosul la amestecul nisip-rizobacterii care au supraviețuit până la condiții de anabioză a nutrientului proaspăt induce o majorare abundentă a numărului de rizobacterii producătoare de EPZ, mai ales în prezența a 100 mg Cu/kg nisip.

Activitatea bacteriană măsurată după viteza de hidroliză a diacetatului fluorescein (Fig.3) denotă că, în comparație cu martorul (fără cupru), ea crește în condițiile când concentrația cuprului este de 100 mg/kg nisip, iar când concentrația cuprului este de 3 ori mai mare, această activitate scade brusc.

Astfel, conform rezultatelor acestei experiențe, populația bacteriană *Pseudomonas aureofaciens* – producătoare de EPZ, a manifestat rezistență foarte înaltă față de toxicitatea cuprului cu concentrație de până la 300 μg Cu/g de nisip uscat. Mai mult decât atât, după introducerea în nisipul poluat a nutrientului proaspăt (din media SP), această populație bacteriană a fost capabilă de a se dezvolta mai activ, în comparație cu martorul (nisip fără Cu).

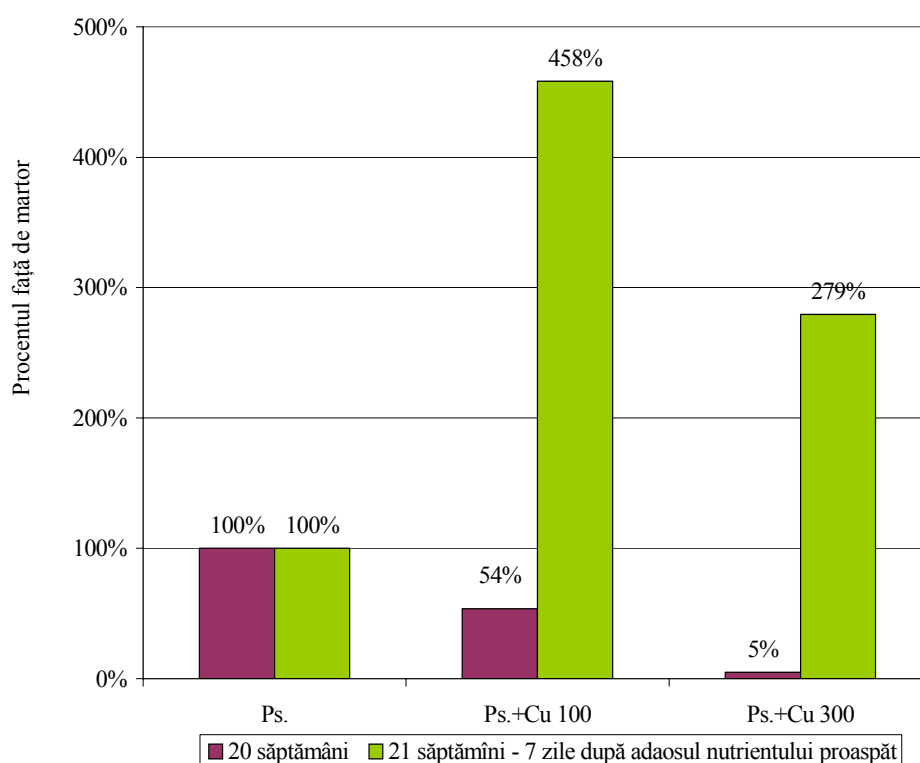


Fig.2. Numărul bacteriilor EPZ producătoare în prezența cuprului.

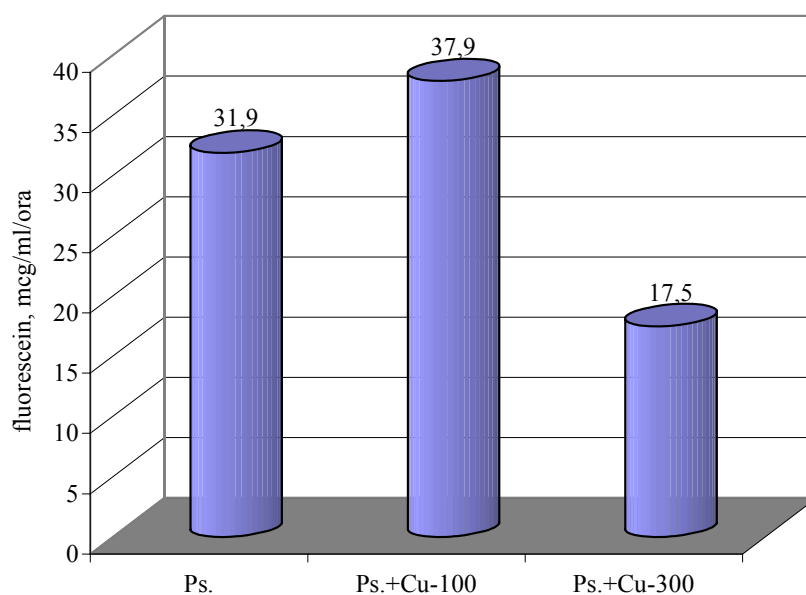


Fig.3. Efectul cuprului asupra activității esterazei (viteza de hidroliză a diacetatului fluorescein) a populației bacteriene *P.aureofaciens* CNMN PsB-03.

Polimorfismul proteic în cadrul populației bacteriene după incubarea îndelungată în prezența concentrațiilor extreme de cupru. Particularitățile influenței metalelor grele se explică prin faptul că, deși majoritatea din acestea sunt necesare pentru creștere, ele manifestă și acțiune toxică asupra celulelor, în temei datorită capacității de a denatura moleculele proteice [13]. De menționat că transportul ionilor de cupru în celulă se realizează cu ajutorul proteinelor transportoare și că cuprul intră în compoziția unei serii de proteine-enzime. S-ar putea de presupus că prezența concentrațiilor ridicate de cupru în mediu poate influența asupra compoziției proteinelor intracelulare în populațiile bacteriene.

S-a cercetat polimorfismul proteinelor sumare intracelulare la populațiile de pseudomonade rizosferice care au supraviețuit în condiții extremale – concentrații ridicate de cupru, cu utilizarea electroforezei SDS-PAGE. Analiza SDS-PAGE a proteinelor sumare din celulele bacteriene a relevat prezența a cel puțin 20 specii de molecule polipeptidice (Fig.4). Numărul benzilor polipeptidice variază în limitele de 14-22. Ele diferă și după intensitatea colorației, ceea ce relevă prezența fracțiilor în concentrații diferite. S-au evidențiat trei fracții cu intensitate mare, trei cu intensitate medie și câteva benzi cu intensitate slabă.

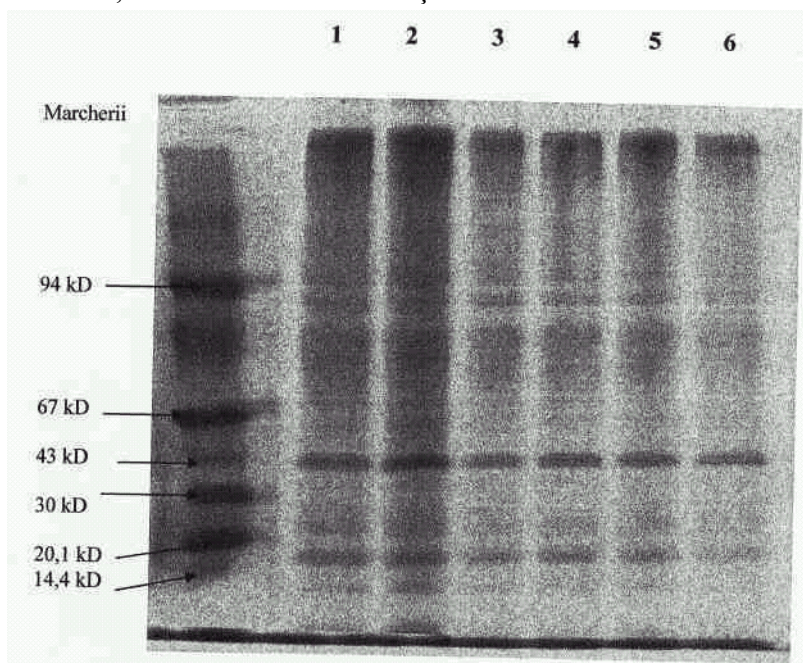


Fig.4. Polimorfismul proteic în cadrul populației bacteriene pe mediul SP în prezența concentrațiilor extreme de cupru: 1(2) – *P. aureofaciens* neintoxicată; 3(4) – plus Cu 100 mg/kg nisip; 5(6) – plus Cu 300 mg/kg nisip.

Modificări esențiale în compoziția calitativă a proteinelor intracelulare la trei populații supuse comparației, care s-au format la incubare în decurs de 20 de săptămâni în prezența concentrațiilor înalte de cupru, și reîntoarse în condiții normale de cultivare, n-au fost depistate. Aceasta ne permite să presupunem că are loc o menținere a homeostazei proteice în condiții extremale – concentrații ridicate de cupru și a acțiunii unui mecanism puternic de protecție. Atrage atenția asemănarea ideală a compoziției proteice în cele trei populații studiate, care denotă păstrarea integrității populației inițiale, în pofida faptului că concentrațiile de cupru în mediu sunt înalte.

Efectul cuprului asupra sintezei exopolizaharidelor (EPZ) de către bacteriile rizosferice *Pseudomonas aureofaciens*. Necesitatea celulelor microbiene de a produce mecanisme speciale de rezistență față de acțiunea toxică a metalelor grele este condiționată de transportul prin peretele celular și acumularea metalelor în spațiul periplasmic [14]. Totuși, unele genuri de microorganisme în comunitatea microbială posedă capacitatea de sinteză a EPZ, care pot să conțină în structura lor grupe de anioni capabili să lege cationii metalelor grele, astfel împiedicând pătrunderea metalelor în celulă. În rezultat, poate fi diminuat efectul toxic al metalelor pentru populațiile sensibile de bacterii rizosferice și pentru plante [15].

Un interes deosebit a prezentat cercetarea sintezei EPZ de către bacteriile rizosferice din genul *Pseudomonas*, supuse unei incubării îndelungate (20 săptămâni) în nisip, poluat cu concentrații înalte de cupru. Determinarea concentrației sumare a carbohidraților solubili extrași cu apă din nisip după incubarea populațiilor de pseudomonade timp de 20-21 săptămâni a arătat o creștere semnificativă a cantității hidraților de carbon în comparație cu martorul fără introducerea metalului (Fig.5). Aceste rezultate vin în concordanță cu datele indicate mai sus despre creșterea numărului de bacterii producătoare de EPZ (Fig.2) și cu ipoteza referitor la funcția de protecție a exopolizaharidelor în condiții de poluare a mediului cu metale grele [13,14].

Pentru compararea menținerii capacității de sinteză a EPZ de către populațiile de *Pseudomonas aureofaciens*, extrase după creșterea în nisip nepoluat (martor) și, respectiv, în nisip poluat cu 100 și 300 mg/kg de

nisip uscat, aceste trei populații au fost cultivate pe cutii Petri pe mediul nutritiv cu zaharoză (4%) fără adaos de cupru, adică fără presiune selectivă a metalului toxic. EPZ au fost spălate din cutii Petri și sedimentate cantitativ cu acetonă răcită din lichidul separat de celulele bacteriene. S-a constatat că la populația formată în prezența a 100 mg Cu la 1 kg de nisip și după înlăturarea cuprului din mediul de cultivare se păstrează o înaltă capacitate de sinteză a EPZ din zaharoză (*a se vedea* Tabelul). În mediu se acumulează peste 20% EPZ, deci mai mult decât la populația-martor. Concomitent, la populația creată în prezența unei concentrații mai înalte de cupru (300 mg Cu la 1 kg de nisip) după reîntoarcerea în condiții normale de cultivare (fără surplus de cupru) s-a observat o scădere semnificativă a capacității de sinteză și de acumulare în mediu a EPZ (scădere până la 26% de la nivelul populației-martor).

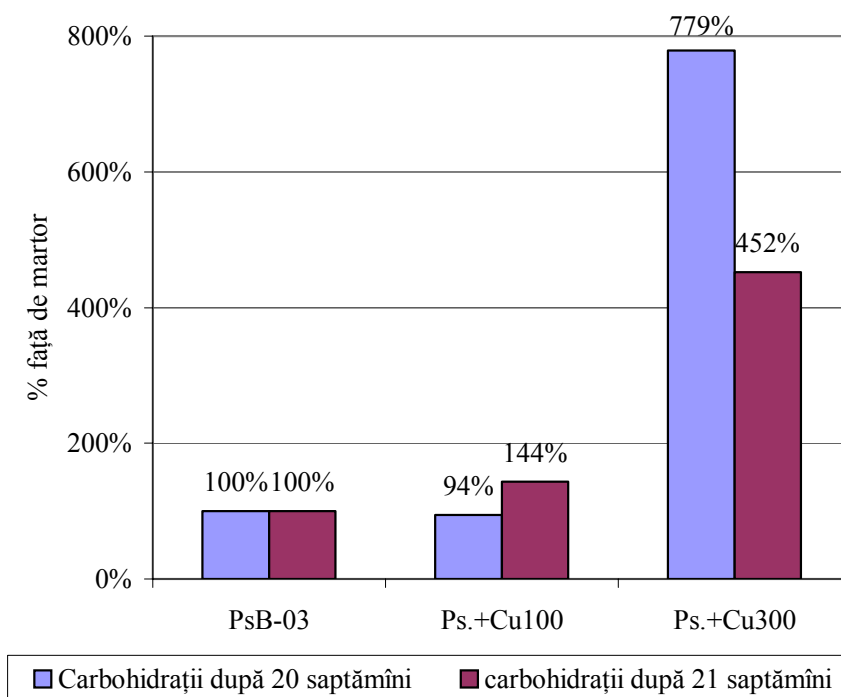


Fig.5. Compararea concentrațiilor de carbohidrați extrase din nisip inoculat cu populația de *Pseudomonas aureofaciens* CNMN PsB-03.

Tabel

Conținutul de EPZ acumulat de către populațiile de pseudomonade rizosferice supraviețuite în nisip poluat cu concentrații extreme de cupru

Varianta	Repetări - coloane	Sediment din 20 ml SN, mg	Volum SN, ml	EPZ în suspensia inițială, mg	EPZ din 120 ml MN "SP"	% față de martor	Productivitatea pe mediu "SP", g/l
Populația-martor fără adaos de Cu	1	9,5	55	522,5	550	100	4,6
	2	10,5	55	577,5			
Populația din nisip cu Cu - 100 mg/kg	1	11,5	57	655,5	656	120	5,5
	2	11,5	57	655,5			
Populația din nisip cu Cu - 300 mg/kg	1	3,0	56	168,0	172	26	1,4
	2	7,0	25	175,0			

SN - supernatant; MN - mediul nutritiv; EPZ - exopolizaharide

Concluzii

În prezența unor concentrații înalte de cupru populația de *Pseudomonas aureofaciens* din solul rizosferic realizează o capacitate de sinteză abundentă a exopolizaharidelor (EPZ) ca un mecanism de protecție și manifestă rezistență foarte înaltă față de toxicitatea cuprului cu concentrația de până la 300 mg Cu/kg de nisip

uscat. Nu au fost depistate modificări esențiale în compoziția calitativă a proteinelor intracelulare la trei populații supuse comparației, care s-au format la incubare în decurs de 20 săptămâni în prezența unor concentrații înalte de cupru și reîntoarse în condiții normale de cultivare, ceea ce denotă un conservatism al homeostazei proteice și existența unui mecanism puternic de protecție față de acțiunea unui astfel de metal greu cum este cuprul.

Referințe:

1. Burlacu I. Deservirea agrochimică a agriculturii Republicii Moldova. - Chișinău: Pontos, 2000.
2. Leah T. Cercetări privind distribuția cuprului în solurile cenușii de pădure de diversă folosință agricolă // Solul - una din problemele principale ale secolului XXI. Materialele Conferinței internaționale științifico-practice, 7 august, 2003. - Chișinău, 2003, p.365-372.
3. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. - Киев: Наукова Думка, 1990. - 448 с.
4. Alami Y., Achuak W., Marol C., Heulin T. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharid-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots // Appl. Environ. Microbiol. - 2000. - Vol.66. - P.3393-3398.
5. Emnova E., Toma S., Senicovscaia I., Daraban O., Tate R.L., Gimenez D. The survival of exopolysaccharide-producing *Pseudomonas* spp. population at high copper concentrations // Mediul Ambient. Scientific Journal of Information and Ecological Culture. - 2006. - No2 (26). - P.13-16.
6. Скворцова И.Н. Методы идентификации и выделения почвенных бактерий рода *Pseudomonas*. - Москва: Изд-во МГУ, 1981. - 45 с.
7. Звягинцев Д.Г., Асеева И.В., Бабьева И.П., Мирчинк Т.Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Москва: Изд-во МГУ, 1980. - 223 с.
8. Благодатский С.А., Благодатская Е.В., Горбенко А.Ю., Паников Н.С. Регидратационный метод определения микробной биомассы в почве // Почвоведение. - 1986. - Т.198. - №4. - С.64-71.
9. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances // Anal. Chem. - 1956. - Vol.28. - P.350-356.
10. Williams A.G., Wimpenny J.W. Exopolysaccharide production by *Pseudomonas* NCIB11264 grown in batch culture // J. Gen. Microbiol. - 1977. - Vol.102. - P.13-21.
11. Corcimaru S., Emnova E. Development of new methods for assessment of soil pollution by lead // Analele Științifice ale USM. Seria "Științe chimico-biologice". - Chișinău: USM, 2002, p.271-274.
12. Reva M., Ciobanu V., Grigorcea P. Electroforeza proteinelor și polipeptidelor. - Chișinău, 1999. - 112 p.
13. Gadd G.M., Griffiths A.J. Microorganisms and heavy metal toxicity // Microbiol Ecology. - 1978. - Vol.4. - P.303-317.
14. Nies D.N. Microbial heavy-metal resistance // Appl. Microbiol. Biotechnol. - 1999. - Vol.51. - P.730-750.
15. Емнова Е.Е., Тома С.И. Реакция ризосферного бактериального сообщества на повышение концентрации меди в почве // Buletinul AȘM. Științe biologice, chimice și agricole. - 2003. - Nr.2. - P.8-13.

Prezentat la 23.01.2007