

Magdalena Michalak^{1*}, Klaudia Gustaw¹, Adam Waško¹, Magdalena Polak-Berecka¹

¹ Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności,
Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wpłynęło w marcu 2016 r.
Zaakceptowano w maju 2016 r.

1. Wprowadzenie. 2. Zanieczyszczenie środowiska kadmem a zdrowie człowieka. 3. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jako biosorbent jonów metali ciężkich. 4. Rola zewnętrznych struktur komórkowych w wiązaniu jonów metali ciężkich. 4.1. Biosorpcja jonów metali ciężkich przez białka powierzchniowe. 4.2. Udział polisacharydów w wiązaniu jonów metali ciężkich. 5. Czynniki wpływające na wydajność procesu biosorpcji. 6. Kinetyka procesu biosorpcji. 7. Podsumowanie

Biosorption of cadmium ions by cell surface structures of bacteria from *Lactobacillus* species

Abstract: Cadmium is a heavy metal which is one of the major polluting component of human and animal environment. Exposure can lead to accumulation of metal ions in the tissues, causing adverse health effects. In recent years, the ability of biological material, such as bacteria, to remove cadmium and other toxic metals have been explored. Biosorption is a process of rapid binding of metals from solution onto functional groups that occur on the surface of bacterial cells. Species such as *Lactobacillus*, present in the human gastrointestinal tract and in fermented food, have the ability to bind and detoxify heavy metal ions due to the occurrence of negatively charged functional groups. These bacteria offer several advantages compared to other microorganisms, primarily thanks to their probiotic activity and GRAS (Generally Recognized As Safe) status. In this review, our intention was to describe the current understanding of biosorption mechanism of lactobacilli and to explain how bacterial surface structures interact with metal ions.

1. Introduction. 2. Environmental pollution by cadmium and human health. 3. Bacteria from *Lactobacillus* species as biosorbent of heavy metal ions. 4. Role of extracellular structures in the binding of heavy metal ions. 4.1. Biosorption of heavy metal ions by surface proteins. 4.2. Impact of exopolysaccharides on the binding of heavy metal ions. 5. Factors affecting efficiency of biosorption process. 6. Kinetic studies of biosorption process. 7. Summary

Słowa kluczowe: białka powierzchniowe, biosorpcja, egzopolisacharydy, kadm, *Lactobacillus*

Keywords: biosorption, cadmium, cell surface proteins, exopolysaccharides, *Lactobacillus*

1. Wprowadzenie

Kadm to metal ciężki, który jest jednym z ważniejszych składników zanieczyszczających środowisko życia ludzi oraz zwierząt. Ekspozycja środowiskowa może prowadzić do wchłaniania jego związków przez organizm oraz ich niekorzystnego oddziaływania na komórki i tkanki [59]. Jedną z metod mających na celu eliminację metali ciężkich ze środowiska jest biosorpcja – zjawisko, które polega na usuwaniu zanieczyszczeń z zastosowaniem materiałów biologicznych. Do cech, które wyróżniają biosorpcję wśród metod konwencjonalnych (precypitacja, elektrodializa, adsorpcja na węglu aktywnym, itp.) zalicza się: niski koszt, wysoką efektywność, minimalizację odpadów pochodzenia chemicznego lub biologicznego, regenerację biosorbentów oraz możliwość odzysku metalu [25, 51].

Zdolność do przeprowadzania procesu biosorpcji w stosunku do metali ciężkich potwierdzono również wśród bakterii kwasu mlekowego (lactic acid bacteria – LAB) [9, 40, 46, 73, 77, 96]. Mikroorganizmy te, stano-

wiące naturalną mikroflorę błon śluzowych ludzi oraz zwierząt, są powszechnie stosowane do produkcji preparatów probiotycznych. Znaczący udział w aktywności biologicznej LAB odgrywają poszczególne komponenty komórkowe, w tym najbardziej zewnętrzne polimery tj. polisacharydy i białka powierzchniowe [39, 79]. Liczne badania wskazują, że w zależności od rodzaju, a nawet szczepu mikroorganizmu mają one związek z adhezją, agregacją oraz hamowaniem rozwoju patogenów [28, 50]. Dodatkowo, badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że dzięki obecności grup funkcyjnych stanowią one główny czynnik zaangażowany w interakcje bakteria–metal [19, 28, 30, 56, 57, 73].

2. Zanieczyszczenie środowiska kadmem a zdrowie człowieka

W wyniku rozwoju cywilizacji, uprzemysłowienia i urbanizacji kadm stał się metalem szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. W przemyśle wykorzystywany

* Autor korespondencyjny: Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie; ul. Skromna 8, 20-950 Lublin; e-mail: magdalena.michalak@up.lublin.pl

jest przede wszystkim do produkcji akumulatorów, baterii niklo-kadmowych oraz galwanicznych powłok ochronnych. Dodatkowo, związki kadmu wchodzi w skład barwników, stabilizatorów tworzyw sztucznych, czy materiałów fluorescencyjnych. Mogą być także używane do wytwarzania sztucznych ogni, stopów łożyskowych i lutowniczych bądź też prętów kadmowych [16]. Każdego roku do środowiska wprowadzanych jest 13 000 ton kadmu, który trafia do różnych ekosystemów i pozostaje w ciągłym obiegu zagrażając zdrowiu człowieka [70].

Związki kadmu dostają się do organizmu człowieka przede wszystkim drogą oddechową i pokarmową. Szacuje się, że w zależności od wielkości cząsteczek, 10–50% wdychanego kadmu jest absorbowana przez tkanki. Podobna zależność występuje w przypadku wchłaniania kadmu, który dostaje się do organizmu wraz z pożywieniem. Absorpcja tego metalu może wahać się w przedziale od około 5 do 10%, na co dodatkowo wpływa zawartość w diecie mikroelementów, takich jak żelazo, wapń, miedź czy cynk. Deficyt tych składników zwiększa bowiem wydajność wchłaniania metali ciężkich i ich kumulację w organizmie. W przypadku kontaktu kadmu ze skórą, potencjalny efekt toksyczny, w związku ze znikomym poziomem wchłaniania, jest bardzo mały [8].

Za najbardziej znaczące źródło narażenia ludzi na kadm uważane jest palenie papierosów. W organizmach palaczy stężenie tego pierwiastka we krwi, jak i w nerkach jest kilkakrotnie wyższe niż u osób niepalących. Ekspozycja na kadm w postaci aerozoli jest istotnym zagrożeniem w zakładach produkcyjnych, w których metal dostaje się do układu oddechowego podczas procesów, takich jak np. lutowanie lub spawanie [60].

Drogą pokarmową pierwiastek ten trafia do organizmu wraz z zanieczyszczoną żywnością, do której należą m.in. skorupiaki, podroby, warzywa liściaste. Uwzględniając zaś podstawowe produkty spożywcze, w krajach azjatyckich to ryż, a w krajach Europy Zachodniej – warzywa bulwiaste, stanowią główne źródło pokarmowej ekspozycji na toksyczny kadm [2, 35]. Dzielne spożycie kadmu w Polsce przez osoby dorosłe kształtuje się na poziomie 23–120 µg, podczas gdy w skali światowej jest to około 150 µg [17]. Istotnym źródłem narażenia człowieka na metal jest też woda pitna, która może ulegać kontaminacji w wyniku kontaktu z instalacją wodociągową wykonaną z materiałów zawierających kadm, bądź też z odpadami rolniczymi lub przemysłowymi. Ponadto, zanieczyszczone leki oraz suplementy diety uważane są za potencjalne źródło tego metalu w organizmie człowieka [2].

Kadm, który został zaabsorbowany w organizmie początkowo gromadzi się w enterocytach. Wchłanianie tego metalu możliwe jest przede wszystkim dzięki obecności w komórkach nabłonka jelitowego białko-

wych przenośników, takich jak DMT1 (divalent metal transporter 1) i MTP1 (metal transporter protein 1). Duży wpływ odgrywa również dyfuzja prosta oraz system białek transportowych (hZTL1, ZNT1), które odpowiedzialne są za transport jonów cynku i wapnia. Absorbowanie kadmu z przewodu pokarmowego możliwe jest także na skutek połączeń metalu z grupami tiolowymi cysteiny i glutationu (GSH), w wyniku czego tworzy się odpowiednio: Cd-cysteina i Cd-GSH [72]. Następnie kadm, który uległ wchłonięciu, przedostaje się z enterocytów nabłonka jelitowego do krwiobiegu. Stąd transportowany jest do wątroby zwykle związany z białkami, takimi jak albuminy oraz metalotioneiny. Intensywna produkcja metalotioneiny może prowadzić do nekrozy i apoptozy hepatocytów, w wyniku czego kompleks metal-białko przedostaje się do tkanek i narządów w organizmie człowieka [5].

Uważa się, że 50% kadmu zawartego w organizmie jest magazynowane w wątrobie i nerkach, co ma związek z dużą koncentracją metalotioneiny w tych organach. Pozostała część zaabsorbowanego metalu gromadzi się w płucach, trzustce, jądrach, grasicy, śledzionie, sercu, śliniankach oraz ośrodkowym układzie nerwowym [10, 71]. Długotrwała ekspozycja na kadm prowadzi także do akumulacji tego metalu w kościach i włosach [17].

Kadm ma negatywny wpływ na zdrowie człowieka nawet w małych ilościach, a ponieważ organizm ma ograniczoną zdolność reagowania na obecność metalu, nie jest on efektywnie usuwany [88]. Dowodzi tego fakt, że dziennie wydalanie kadmu, głównie z moczem, nie przekracza 0,01% ilości pierwiastka spożywanego w diecie. W przypadku ostrego zatrucia kadmem, spowodowanego zazwyczaj kontaktem z metalem w miejscu pracy, objawy pojawiają się zazwyczaj po 24 godzinach. Charakterystyczne zmiany to duszności, ogólne osłabienie, gorączka. Może również wystąpić obrzęk lub zapalenie płuc, a w ciężkich przypadkach – niewydolność oddechowa i śmierć [71]. Długotrwała, kilku – kilkunastoletnia ekspozycja na kadm, prowadzi do zatruć przewlekłych. Pierwszymi zauważalnymi objawami są wydalanie z moczem niskocząsteczkowych białek i zwiększona ilość wydalanej kreatyniny. Nierzadko pojawiają się nieprawidłowości ze strony układu oddechowego i zmiany morfologiczne krwi, takie jak eozynofilia (zwiększenie liczby granulocytów kwasochłonnych) oraz zmniejszona zawartość hemoglobiny w erytrocytach [17].

Niekorzystne działanie kadmu wiąże się z szeregiem mechanizmów, które prowadzą do różnorodnych zmian w organizmach żywych, przyczyniając się także do wzrostu ryzyka wystąpienia nowotworów. Uszkodzenie tkanek powodowane przez metal może być wynikiem indukowania stresu oksydacyjnego oraz epigenetycznych zmian w ekspresji DNA [65, 89]. Ponadto, kadm zaburza działanie komórkowych szlaków transporto-

wych, a także ingeruje w metabolizm i funkcje pierwiastków niezbędnych dla organizmu, takich jak np. cynk i magnez [83, 84]. Inne działania patologiczne obejmuje hamowanie syntezy hemu i upośledzenie funkcji mitochondriów, co może prowadzić do apoptozy komórki [13, 72]. Zaobserwowano również, że kadm działa toksycznie na skutek wyczerpywania glutationu i wiązania metalu do grup tiolowych białek [84]. Warto dodać, że przedstawione mechanizmy, w zależności od obecności innych metali ciężkich, takich jak ołów i arsen, mogą mieć nasilony efekt chorobotwórczy. Jednak, jak pokazują badania, występowanie cynku i seleniu oraz czynników zwiększających poziom jądrowego czynnika Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) może łagodzić toksyczne działanie kadmu [93].

3. Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* jako biosorbent jonów metali ciężkich

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus* tworzą dużą, heterogenną grupę Gram-dodatnich, katalazoujemnych, fakultatywnie beztlenowych bakterii, które należą do typu *Firmicutes* [43, 92]. Bakterie te zaliczane są do grupy bakterii mlekowych wytwarzających kwas mlekowy, jako końcowy produkt fermentacji węglowodanów. W zależności od gatunku należą do mezofili lub termofili. *Lactobacilli* rosną w szerokim zakresie temperatur od 2 do 53°C oraz w pH od 3 do 8. Występują w środowiskach bogatych w węglowodany będących substratami przeprowadzanej przez nie fermentacji. Do wzrostu potrzebują także dodatku w podłożu aminokwasów, peptydów, kwasów tłuszczowych, estrów, soli, pochodnych kwasów nukleinowych i witamin. Pomimo dużych wymagań pokarmowych, *lactobacilli* zasiedlają zróżnicowane nisze środowiskowe: od wody, gleby i ścieków, po tkanki roślinne i nabłonek przewodu pokarmowego ludzi oraz zwierząt [26, 43].

Rodzaj *Lactobacillus* obejmuje grupę bakterii, które odgrywają nie tylko kluczową rolę w wytwarzaniu żywności fermentowanej (produkty mleczarskie, kiszonki, dojrzewające wędliny), ale także są wykorzystywane do produkcji farmaceutycznych preparatów probiotycznych [20]. Zgodnie z definicją zatwierdzoną przez FAO i WHO probiotyki to „żywe szczepy ściśle określonych drobnoustrojów, które podawane w odpowiednich ilościach modulują równowagę bakteryjną flory jelitowej i wywierają korzystny efekt na zdrowie konsumenta” [36]. Obecne na rynku preparaty probiotyczne posiadają w swoim składzie żywe kultury jednego, lub większej liczby szczepów bakterii naturalnie występujących w przewodzie pokarmowym człowieka lub zwierząt [26]. Bakterie należące do rodzaju *Lactobacillus* dzięki wytwarzaniu substancji antybakteryjnych, tj. m.in. bakteriocyn i kwasów organicznych wykazują działa-

nie antagonistyczne w stosunku do drobnoustrojów chorobotwórczych. Ponadto, istotną rolę w hamowaniu zasiedlania przewodu pokarmowego przez patogeny odgrywa zdolność przylegania bakterii chorobotwórczych i probiotycznych do nabłonka jelitowego oraz konkurencja o receptory śluzówkowe i nabłonkowe. Dodatkowo, bakterie te poprawiają trawienie i przyswajanie składników odżywczych, usuwają substancje toksyczne, obniżają poziom cholesterolu i poprawiają odporność organizmu [18, 52, 80].

Pałeczki *Lactobacillus* w przewodzie pokarmowym ulegają kontaktowi z jonami metali i innymi zanieczyszczeniami pochodzącymi z diety, a dzięki wykształceniu odpowiednich mechanizmów potrafią chronić się przed ich toksycznym działaniem. Na podstawie obecności operonu *cadA* uważa się, że główny mechanizm odporności LAB na metale ciężkie opiera się na transporcie jonów metalu poza komórkę (efflux system) [61]. Wskazywałoby to, że jony metalu będą pozostawać niezwiązane przez bakterie w przewodzie pokarmowym. Jednak proces detekcji jonów metalu przez komórkę, transkrypcja odpowiednich genów i nagromadzenie właściwej ilości białek wymaga czasu. Podczas tych procesów, ‘uwięziony’ na powierzchni komórki bakterii metal przedostaje się wraz z nią wzdłuż przewodu pokarmowego, a następnie ulega usunięciu na drodze defekacji. Pomimo tej możliwości, prawdopodobnie jednak idealnym kandydatem do detoksyfikacji jest mikroorganizm, który nie posiada genów kodujących transportery metali, a jedynie wiąże je na powierzchni swoich osłon komórkowych lub gromadzi wewnątrz komórki w cytoplazmie [53]. Prócz działania skierowanego bezpośrednio wobec pierwiastków, bakterie mlekowe posiadają również zdolność do redukcji stresu oksydacyjnego spowodowanego toksycznością metali, mogą też łagodzić uszkodzenia narządów (nerki, wątroba) oraz ograniczać zmiany histopatologiczne [53, 96].

Kadm, który dostał się do organizmu drogą pokarmową w pierwszym etapie ulega wchłonięciu przez nabłonek jelitowy, który zasiedlany jest przez bakterie mlekowe. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że szczep *L. plantarum* CCFM8610 wiązał jony kadmu, co powodowało zwiększone wydalanie metalu z organizmu [97]. Podobną zależność zauważono w przypadku probiotycznego szczepu *L. rhamnosus* GG, który regulował wchłanianie aflatoksyny B1 u szczurów prowadząc do występowania większej ilości mykotoksyny w kale w porównaniu do grupy kontrolnej. Może to prowadzić do ograniczenia występowania kompleksów Cd-MT, który w efekcie, jest w mniejszym stopniu magazynowany w wątrobie lub transportowany wraz z krwią do nerek. Dzięki temu, znacznie ograniczona jest liczba niezwiązanych przez białko jonów metalu, a przez to prawdopodobieństwo występowania stresu oksydacyjnego i co za tym idzie uszkodzenie

tkanek jest mniejsze [31, 95]. Dodatkowo, zauważono, że żywe kultury lactobacilli i bifidobacterii, tj. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *B. bifidum* oraz *B. longum* mogą zwiększać wchłanianie i biodostępność potrzebnych dla organizmu metali, w tym m.in. wapnia, magnezu oraz żelaza u ludzi i zwierząt. Można, więc przypuszczać, że żywe komórki bakterii *L. plantarum* CCFM8610 będą wykazywały zdolność do większej absorpcji tych metali *in situ*, a tym samym zmniejszały wchłanianie kadmu do krwiobiegu [97].

Uważa się, że głównym mechanizmem odpowiedzialnym za wiązanie jonów metali na powierzchni komórek bakterii jest wymiana jonowa. W procesie uczestniczą ponadto zjawiska, takie jak kompleksowanie, precypitacja, adsorpcja, chelatowanie oraz dyfuzja przez ścianę i błonę komórkową [1, 3].

Dane literaturowe wskazują, że wykorzystanie jako źródła sorpcyjnego zarówno żywej, jak i martwej biomasy prowadzi do usuwania jonów metali ciężkich [33, 40, 56, 57, 77, 97]. Przykładowo, Tian i wsp. [77] badając zdolności sorpcyjne 16 szczepów bakterii probiotycznych wobec jonów miedzi wykazali, że wszystkie bakterie lepiej wiązały jony metalu, jeśli w eksperymencie zastosowano żywe komórki. Sugerowano, że inaktywacja termiczna biomasy mogła spowodować nieodwracalne uszkodzenia zewnętrznej struktury komórkowej, a tym samym zmniejszyła liczbę miejsc wiążących jony miedzi. Z kolei inne badania pokazały, że efektywność wiązania jonów kadmu przez szczep *L. plantarum* CCFM8610 nie uległa znaczącej zmianie i była zbliżona w przypadku stosowania żywych i martwych komórek i wynosiła odpowiednio 77 i 73% [97]. Z drugiej jednak strony Mrvčić i wsp. [57] wnioskują, że lepsze zdolności sorpcyjne częściej wykazywały komórki martwe, co można tłumaczyć zwiększeniem dostępności grup funkcyjnych na powierzchni biosorbentu. Można, więc sądzić, że wydajność biosorpcji jest w dużej mierze zależna od gatunku, a nawet szczepu bakterii, które ulegają kontaktowi z jonem metalu. Nie da się, zatem jednoznacznie stwierdzić wpływu żywej lub martwej biomasy na wydajność omawianego procesu.

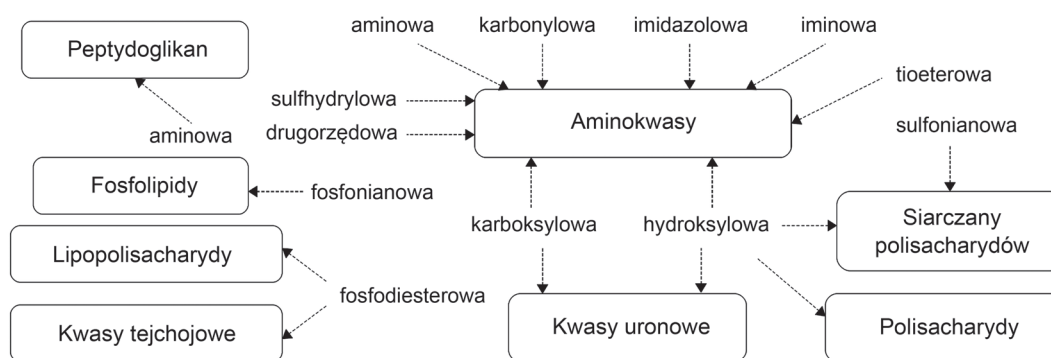
Wiązanie jonów metali przez LAB to proces dynamiczny. Halttunen i wsp. [34] analizując wybrane szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* zaobserwowali, że potrzeba od 5 minut do 1 godziny, by bakterie wydajnie związały jony kadmu i ołowiu w roztworze wodnym. Podobne rezultaty uzyskano badając zdolność bakterii *Pseudomonas putida* do wiązania kationów metali, w tym kadmu. Otrzymane wyniki skłoniły autorów do wniosku, że szybka adsorpcja metali z roztworów wodnych jest raczej efektem ich wiązania do powierzchni ściany komórkowej, aniżeli akumulacji jonów metalu (sorbatu) wewnątrz komórki [64]. Z kolei w innej pracy, autorzy porównywali efektywność usuwania jonów kadmu i ołowiu z roztworów wodnych

przez dwa probiotyczne szczepy: *L. rhamnosus* LC-705 i *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały szybkie wiązanie metalu i osiągnięcie stanu równowagi już po godzinie eksperymentu [40]. Podobne rezultaty uzyskano dla bakterii należących do gatunku *Enterococcus faecium*, które mają zastosowanie w wytwarzaniu produktów fermentowanych. Zaobserwowano usuwanie kadmu i ołowiu z roztworu przez *E. faecium* EF031 i probiotyczny szczep *E. faecium* M74. Zjawisko to było efektem tworzenia kompleksów metal–komórka bakterii, który utrzymywał się przez 48 godzin trwania eksperymentu. Po upływie godziny, badane szczepy bakterii zmniejszyły stężenie jonów metali w roztworze o 60%, co wykazało, że kompleksowanie metalu jest procesem wyjątkowo szybkim [78]. Powyższe wyniki wskazują, że zastosowanie probiotycznych szczepów bakterii mlekowych w produktach żywnościowych może przyczynić się do wiązania toksycznych jonów metali w organizmie człowieka, a powstający kompleks jest wystarczająco trwały, by ulec usunięciu z przewodu pokarmowego na drodze defekacji [53, 87].

4. Rola zewnętrznych struktur komórkowych w wiązaniu jonów metali ciężkich

Negatywnie naładowane grupy funkcyjne, takie jak aminowa, estrowa, hydroksylowa, karboksylowa, karbonylowa, sulfonowa, występujące na powierzchni komórki, w wyniku działania sił elektrostatycznych adsorbują kationy metali (Rys. 1). W związku z tym, protony i/lub kationy metali lekkich (sód, potas, magnez, wapń), które naturalnie związane są z grupami funkcyjnymi obecnymi na powierzchni komórek bakterii, zostają wypierane przez jony metali występujące w roztworze wodnym [51].

Informacji dotyczących przebiegu procesu biosorpcji jonów metali dostarczają zarówno proste, jak i bardziej złożone układy eksperymentalne. Każda z metod badawczych pozwala ujawnić wybrane aspekty dotyczące sorbatu oraz jego interakcji z miejscem wiążącym jon metalu. W celu oznaczenia stężenia sorbatu w fazie wodnej można wykorzystać atomową spektroskopię absorpcyjną (AAS), elektrody jonoselektywne (ISE), spektrometrię UV-Vis, a także plazmę wzbudzaną indukcyjnie (ICP). Użyteczną metodą w wizualizacji morfologii biosorbentu jest skaningowa i transmisyjna mikroskopia elektronowa (SEM/TEM). Z kolei określenie miejsc aktywnych biosorbentu możliwe jest dzięki wykorzystaniu technik analitycznych, takich jak spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (ESR) i jądrowy rezonans magnetyczny (NMR). Analiza termogravimetryczna (TGA) oraz



Rys. 1. Grupy funkcyjne występujące w wybranych biomolekułach na powierzchni komórek bakterii, które uczestniczą w procesie biosorpcji. Na podstawie [86]

skaningowa kolorymetria różnicowa (DSC) dostarczają informacji o stabilności termicznej biosorbentu. Ponadto, stopień utlenienia, kompozycja elementów powierzchniowych na biosorbencie, jak i stopień utlenienia i środowisko koordynacyjne metalu wiążącego się do biosorbentu wyznacza się stosując odpowiednio, spektroskopię fotoelektronów w zakresie promieniowania X (XPS) oraz absorpcyjną spektroskopię rentgenowską (XAS) [22].

Zdolności sorpcyjne niektórych komponentów komórkowych *Lactobacilli*, takich jak egzopolisacharydy i białka powierzchniowe, zostały zauważone już kilka lat temu [19, 28, 30, 56, 57]. W swojej pracy Haltunnen i wsp. [33] wykazali, że neutralizacja ładunku ujemnego grup karboksylowych i fosforanowych na powierzchni *L. fermentum* ME3 prowadzi do zmniejszenia zdolności do biosorpcji jonów kadmu przez bakterie. Sugerowano, że to właśnie oddziaływania elektrostatyczne pomiędzy kationami metali, a niektórymi grupami funkcyjnymi na powierzchni komórek bakterii mają wpływ na usuwanie jonów metali ciężkich. Poznanie struktury fizykochemicznej polimerów ściany komórkowej *Lactobacilli* istotnych w procesie wiązania jonów metali ciężkich pozwala zrozumieć pośrednie, jak i bezpośrednie uwarunkowania zdolności sorpcyjnych komensalnej mikroflory jelitowej.

4.1. Biosorpcja jonów metali ciężkich przez białka powierzchniowe

Najbardziej zewnętrzną, a zarazem najliczniejszą grupę białek otaczających komórkę tworzą białka warstwy S (S-layer protein – SLP), które stanowią od 10 do 15% ogółu białek ściany komórkowej. Jest to krystaliczna, dwuwymiarowa powłoka zbudowana z białek i glikoprotein połączonych w sieć o zróżnicowanej symetrii (ukośna (p1, p2), kwadratowa (p4), heksagonalna (p3, p6)). Białka te mają stabilną strukturę trzeciorzędową, a ich masa cząsteczkowa mieści się w zakresie od 25 do 71 kDa, co czyni je najmniejszymi znanymi dotychczas białkami uczestniczącymi w procesie

adhezji do komórek nabłonkowych [38]. Występowanie warstwy S potwierdzono dotychczas u szczepów należących do gatunków: *L. acidophilus*, *L. amylovorus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. crispatus*, *L. gallinarum*, *L. helveticus* oraz *L. hilgardii*. Charakterystyczną cechą białek powierzchniowych S bakterii z rodzaju *Lactobacillus*, oprócz małych rozmiarów, jest ich wysoki punkt izoelektryczny, który nadaje tym polimerom silnie zasadowy charakter [39].

Bakteryjne białka powierzchniowe zawierają dwa regiony strukturalne, z których jeden odpowiada za przymocowanie białka do ściany komórkowej, drugi zaś uczestniczy w utrzymaniu struktury białka na powierzchni. Dotychczas scharakteryzowano je w następujących białkach warstwy S: białku SA *L. acidophilus* ATCC 4356, CbsA *L. crispatus* JCM 5810, SlpB u szczepów *L. crispatus* K313 i K2-4-3, SlpA *L. crispatus* ZJ001, SlpA *L. brevis* ATCC 8287 oraz białku syntetyzowanym przez szczep *L. hilgardii* B706. Większość bakteryjnych białek warstwy S zawiera peptyd sygnałowy. Takie białka wiążą się niekowalencyjnie ich N- lub C-końcem do peptydoglikanu i wtórnych polimerów ściany komórkowej (kwasy teichojoyowe, teichuronowe). W kotwiczeniu uczestniczy motyw SLH, zaś w przypadku jego braku, zachodzi interakcja pomiędzy resztami aminokwasów białek a naładowanymi ujemnie węglowodanami, które występują w ścianie komórkowej bakterii [11, 38].

Liczne badania wskazują na istnienie korelacji pomiędzy obecnością białek warstwy S, ich budową, a właściwościami powierzchniowymi *Lactobacilli* [76, 91]. Ponadto, wykazano, że białka warstwy S bakterii z rodzaju *Lactobacillus* chronią komórkę przed niekorzystnymi warunkami środowiska, w tym metalami ciężkimi. Występowanie tej warstwy powiązано ze spadkiem wrażliwości na mutanolizynę u *L. helveticus* ATCC 12046 [48], sok żołądkowy i trzustkowy u *L. acidophilus* M92 [23] oraz kwas taninowy i siarczany miedzi w winie u szczepu *L. hilgardii* B706 [19].

W celu zrozumienia mechanizmów zaangażowanych w wiązanie jonów metali można wykorzystać analizę widm w podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-IR),

która daje wgląd w naturę wiązań i pozwala zidentyfikować różne grupy funkcyjne na powierzchni ściany komórkowej bakterii. Z wykorzystaniem tej techniki po odpowiedniej ekstrakcji białek S-layer pochodzących ze szczepów *L. kefir* CIDCA 8348 i JCM 5818 wykazano, że te polimery zdolne są do oddziaływania z metalami poprzez grupy karboksylowe reszt kwasu asparaginowego i glutaminowego. Koordynacja jest najczęściej jednokleszczowa i uzupełniona przez dodatkowe wiązania koordynacyjne obejmujące grupy –NH ze szkieletu peptydowego. Wykonane analizy pozwoliły także stwierdzić, że powstałe oddziaływania prowadzą do zmian w strukturze drugorzędowej białek. Odnotowano zwiększenie liczby β -harmonijek przy jednoczesnym spadku struktur α -helis, umożliwiając dopasowanie ich konformacji do obecności jonów metali przy najmniejszych kosztach energetycznych. Zauważona zależność była tym większa, im większy był promień jonowy kationu dwuwartościowego (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) [29]. Efektem powstałych zmian był wzrost sztywności białek, ich wytrzymałości oraz zdolności rozpraszania energii podczas odkształcania [69].

Pomimo, że podczas biosorpcji obserwuje się wyraźne interakcje grup funkcyjnych z jonami metali, rola jaką pełnią niektóre struktury powierzchniowe wydaje się być nie do końca poznana. Schut i wsp. [73] badali zdolności sorpcyjne szczepu *L. hilgardii* DSM 20176 i zaobserwowali, że bakterie traktowane proteinazą K, a więc pozbawione warstwy S cechowały się mniejszą zdolnością do wiązania jonów miedzi (o 38%) i żelaza (o 17%) w porównaniu do tych samych bakterii z warstwą S obecną na powierzchni komórki. Natomiast ten sam szczep bakterii, również nie zawierający białek powierzchniowych, w obecności jonów cynku i manganu wiązał jony z efektywnością większą o odpowiednio 17 i 58% [73]. Wyniki badań innych autorów pokazały, że szczepy bakterii *L. kefir* CIDCA 8348 i JCM 5818 pozbawione białek S-layer cechowały się większymi właściwościami sorpcyjnymi niż te same bakterie posiadające je na swojej powierzchni. Jednocześnie badania te wykazały, że po usunięciu SLP, komórki bakterii były bardziej podatne na szkodliwe działanie jonów ołowiu. Autorzy sugerowali więc, że białka powierzchniowe mogą stanowić raczej barierę ochronną przed jonami metalu, a rolę w usuwaniu toksycznych jonów metali przypisywali raczej innym komponentom komórkowym, takim jak np. egzopolisacharydy [54, 55].

4.2. Udział polisacharydów w wiązaniu jonów metali ciężkich

Strukturami, które powszechnie występują na powierzchni bakterii Gram-dodatnich są polisacharydy. To zróżnicowane, zazwyczaj obojętne polimery, które mogą być kowalencyjnie bądź jonowo zwią-

zane z kwasem N-acetylomuramidowym w łańcuchu peptydoglikanu (cell wall polysaccharide – WPS). Kiedy polisacharydy są luźno połączone z otoczką komórkową i zachodzi ich uwalnianie do środowiska zewnątrzkomórkowego, oznaczane są jako EPS (extracellular polysaccharides). Polisacharydami otoczkowymi (capsular polysaccharides – CPS) nazywamy zaś struktury, które tworzą gęstą, ściśle związaną z błoną komórkową powłokę. Warto zauważyć, że w literaturze istnieją pewne nieścisłości w odniesieniu do definicji podanych grup, co przekłada się na nieprzestrzeżenie nomenklatury w artykułach naukowych [15, 66].

Polisacharydy wytwarzane przez *Lactobacilli* to zazwyczaj heteropolisacharydy składające się z grup cukrowych, takich jak glukoza, ramnoza, galaktoza, a także N-acetyloglukozamina (GlcNAc) oraz N-acetylogalaktozamina. U niektórych szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus* występują też reszty kwasu glukuronowego, fosforan, acetyl i grupy pirogronianowe. Istnieją również pewne szczepy bakterii zdolne są do syntetyzowania homopolisacharydów, takich jak glukany i fruktany z sacharozy [74].

Badania nad *Lactobacillus rhamnosus* GG pozwoliły na zidentyfikowanie u tego szczepu dwóch różnych klas EPS: zarówno długich i bogatych w galaktozę, jak i krótkich, obfitujących w glukozę/mannozę cząsteczek. Co ciekawe, mutanty *L. rhamnosus* CMPG5351 z inaktywowanym genem biosyntezy galaktozy wykazywały zwiększoną zdolność adhezji do linii komórkowej CaCo-2, w porównaniu do szczepu wyjściowego, co jest prawdopodobnie związane z osłanianiem adhezyn bakteryjnych [44].

Ze względu na lokalizację i obfitość, ww. struktury w znacznym stopniu decydują o właściwościach biologicznych bakterii. Liczne badania wskazują na udział polisacharydów w adhezji, tworzeniu biofilmu, wiązaniu metali ciężkich, agregacji bakterii oraz w zabezpieczeniu komórki przed działaniem czynników zewnętrznych tj. stres osmotyczny, antybiotyki, sole żółci, niskie pH, itp. [14, 67, 68].

Cennym narzędziem analitycznym pozwalającym potwierdzić udział egzopolisacharydów w przyłączaniu jonów metali ciężkich jest skaningowa mikroskopia elektronowa SEM [45]. Uzyskany obraz przed oraz po eksperymencie procesu biosorpcji ukazuje zmiany w morfologii polimerów ściany komórkowej uczestniczących w wiązaniu jonów metali [21, 67]. Dodatkowo, w połączeniu z techniką EDX możliwe jest uzyskanie informacji o rozmieszczeniu poszczególnych elementów na powierzchni biomasy. Należy jednak mieć na uwadze, iż zastosowanie powyższej techniki daje możliwość jedynie jakościowej oceny morfologii struktury zewnętrznej komórki [51].

Z wykorzystaniem odpowiednich metod instrumentalnych wykazano, że w wyniku kontaktu egzopolisa-

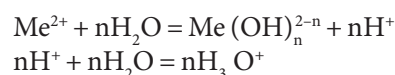
charydów z jonami metali dochodzi do wytworzenia kompleksów, które unieruchamiają metal. Badania pokazują, że powstały kompleks jest efektem elektrostatycznych oddziaływań pomiędzy ligandami metali, a negatywnie naładowanymi egzopolisacharydami [62, 75]. Powyższe obserwacje, pomimo, że odnoszące się do bakterii nie należących do LAB, potwierdzają funkcję jaką pełnią EPS u szczepu *L. rhamnosus* E/N. Przeprowadzone w ostatnim czasie eksperymenty wykazały, że zawartość jonów kadmu w tych strukturach po procesie biosorpcji wzrosła do 141% w porównaniu do początkowej zawartości jonów [67]. Wykorzystując technikę FT-IR zauważono wyraźne przesunięcia spektralne widm w pasmach, które pochodziły od drgań grup hydroksylowych, karboksylowych i karbonylowych, wskazując jednoznacznie na interakcję pomiędzy powyższymi grupami funkcyjnymi, a sorbatem [21, 67].

5. Czynniki wpływające na przebieg procesu biosorpcji

Oprócz budowy ściany komórkowej istotnym czynnikiem wpływającym na zdolności sorpcyjne bakterii są parametry fizykochemiczne. Do najważniejszych z nich zaliczyć można pH, temperaturę, siłę jonową, stężenie sorbatu i sorbentu, jak i obecność związków powierzchniowo czynnych. Sterowanie tymi czynnikami umożliwia przebieg biosorpcji w najkorzystniejszych warunkach, zapewniając jednocześnie największą wydajność procesu [85].

W oparciu o badania potwierdzające dominację wymiany jonowej nad innymi mechanizmami odpowiedzialnymi za proces biosorpcji, można wnioskować, że kluczowy wpływ na efektywność usuwania metali z roztworów wodnych ma wartość pH [7, 27]. Odczyn środowiska determinuje protonowanie/deprotonowanie miejsc wiążących jony metali wpływając na dostępność grup funkcyjnych dla sorbatu. Uważa się, że poszczególne grupy funkcyjne warunkują występowanie odmiennego punktu izoelektrycznego (wartości pH roztworu, przy której ładunek powierzchniowy jest zerowy) na powierzchni komórki. Gdy pH jest niższe od punktu izoelektrycznego, powierzchnia komórki bakteryjnej zyskuje ładunek dodatni, zaś powyżej tej wartości przyjmuje ładunek ujemny powodując tym samym przyciąganie kationów metali [98]. Jeśli zwiększa się wartość pH, następuje wzrost ładunku ujemnego na powierzchni biosorbentu do momentu, gdy wszystkie grupy funkcyjne ulegną deprotonacji. Sprzyja to nasileniu sił elektrostatycznych i adsorpcji jonów. Ponadto, uważa się, że podwyższony odczyn środowiska prowadzi do występowania większej liczby ujemnych grup funkcyjnych zdolnych do wiązania

jonów metali. Obserwuje się także spadek konkurencji pomiędzy protonami, a jonami metali, co jest spowodowane zmniejszeniem liczby jonów wodorowych obecnych w roztworze [94]. W związku z tym, gdy pH jest niskie, na skutek konkurencji o miejsca wiążące kationy i produkty kwaśnej hydrolizy, znacznie spadają zdolności sorpcyjne bakterii. Green-Ruiz i wsp. [32] zaproponowali dwie reakcje, które wyjaśniają przedstawione zjawisko:



Rozpatrując proces biosorpcji przez LAB w roztworach wodnych można stwierdzić że, niska wartość pH środowiska (< 3), a co za tym idzie duża liczba kationów wodorowych wiąże się z ograniczonym wiązaniem jonów metali. Dopiero wzrost tej wartości do pH 6 prowadzi do większej efektywności procesu. W tych warunkach grupy karboksylowe uczestniczące w procesie są naładowane ujemnie, co zwiększa wiązanie jonów metali. Jeśli zaś pH roztworu wzrasta powyżej tej wartości, odnotowuje się spadek rozpuszczalności jonów metali i możliwa jest ich precypitacja. Liczne badania wykazały, że największą wydajność biosorpcji osiąga się, jeśli odczyn środowiska ma wartość pH zbliżoną do 5,0 [40, 57, 73].

Obecność innych jonów metali w roztworze, na skutek konkurencji pomiędzy jonami sorbatu, zwiększa siłę jonową w roztworze i negatywnie wpływa na proces biosorpcji. Z drugiej jednak strony, wzrost stężenia biomasy bakteryjnej zwiększa powierzchnię sorpcyjną i liczbę miejsc wiążących, co w efekcie zwiększa liczbę związanych jonów metali [12]. Czasem jednak ilość przyłączonego metalu na jednostkę masy sorbentu spada wraz ze wzrostem jego dawki. Tłumaczy się to nakładaniem lub agregacją dostępnych miejsc wiążących, co w efekcie może prowadzić do mniejszego wychwytu jonów sorbatu [58, 63].

Obok stężenia, na wydajność procesu w znacznym stopniu wpływa rozmiar biosorbentu. Zwiększona powierzchnia kontaktu z jonem metalu przyczynia się do wzrostu efektywności procesu biosorpcji. Ponadto uważa się, że wraz ze wzrostem początkowego stężenia sorbatu w roztworze, zwiększa się ilość wiążanego metalu w jednostce masy biosorbentu. Wynika to z faktu, że początkowe stężenie metalu w roztworze pozwala przezwyciężyć opór pomiędzy fazą wodną a stałą [86].

Uważa się, że zmiana temperatury prowadzenia procesu biosorpcji w zakresie od 20 do 35°C nie ingeruje w znaczący sposób w jej przebieg. Dopiero wzrost temperatury powyżej 35°C prowadzi do wzrostu aktywności powierzchniowej i energii kinetycznej substancji rozpuszczonej, a tym samym wpływa korzystnie na wiązanie jonów metali ciężkich [85]. Inne doniesienia

literaturowe pokazują, że zmiana temperatury prowadzenia procesu z 15 do 30°C zwiększyła dwukrotnie (z 10,11 do 20,15 mg/g) skuteczność przyłączania jonów ołowiu do egzopolisacharydów *L. plantarum* 70810. Z kolei dalszy wzrost temperatury prowadzenia procesu wiązał się ze spadkiem wydajności biosorpcji do wartości 12,36 mg/g. Tłumaczy się to nasileniem ruchu atomów metalu. W tych warunkach może dochodzić do osłabienia oddziaływań elektrostatycznych pomiędzy ligandem a sorbentem, co skutkuje uwolnieniem części jonów sorbatu [21, 81]. Pomijając te rozbieżności, należy mieć na uwadze fakt, że niekiedy zbyt wysoka temperatura może prowadzić do uszkodzenia ściany komórkowej bakterii. Dlatego też przyjmuje się, że najkorzystniej jest prowadzić proces przyłączania jonów metali w temperaturze pokojowej [85].

Udział w zwiększeniu skuteczności biosorpcji ma również powinowactwo metalu do biosorbentu, które można modulować poprzez wstępną obróbkę fizyczną lub chemiczną biomasy wpływającą na jej przepuszczalność i ładunek powierzchniowy, ułatwiając tym samym dostęp grup funkcyjnych do jonów metali [1].

6. Kinetyka procesu biosorpcji

Kinetyka biosorpcji wskazuje tempo, w jakim substancje rozpuszczone ulegają adsorpcji na powierzchni materiałów biologicznych. Pozwala to określić przydatność materiału biologicznego, który ma być wykorzystany, jako biosorbent jonów metali. W tym celu niezbędne jest wyznaczenie pojemności sorpcyjnej (q_e) określanej, jako masa jonów metalu, które uległy zaadsorbowaniu w suchej masie biosorbentu w stosunku do aktualnego stężenia w roztworze wodnym. Parametr Q_e opisuje wzór (1) przedstawiony poniżej, w którym V_0 i V_e to początkowa i końcowa objętość roztworu, która ulega kontaktowi z sorbentem; C_0 i C_e to stężenia początkowe i równowagowe metalu w roz-

tworze; m jest ilością biosorbentu, wyrażaną zazwyczaj, jako sucha masa [24].

$$q_e = \frac{C_0 V_0 - C_e V_e}{m} \quad (1)$$

Eksperymenty mające na celu określenie kinetyki biosorpcji polegają zazwyczaj na kontakcie biosorbentu z roztworem jonów (metoda batch) o znanym stężeniu początkowym. Kinetykę przeprowadzanego procesu śledzi się do momentu uzyskania równowagi w układzie sorpcyjnym, gdy nie obserwuje się już zmiany stężenia kationów w roztworze [85]. Badania kinetyczne dostarczają cennych informacji dotyczących prawdopodobnego mechanizmu biosorpcji, która obejmuje proces dyfuzji i reakcje chemiczne. Przyjmuje się, że transport sorbatu do wnętrza komórki przebiega w kilku etapach. W pierwszym z nich obserwuje się dyfuzję zewnętrzną – sorbat dyfunduje z objętości roztworu do warstwy cieczy, która otacza powierzchnię biomasy, a następnie transport substancji rozpuszczonej w całej warstwie granicznej. Kolejny etap to transport jonów metali przez pory do wewnętrznych części sorbentu i wychwyt cząsteczek przez miejsca aktywne. Ostatni, czwarty etap polega na sorpcji i desorpcji sorbatu [51].

Spśród wielu modeli kinetycznych opisanych w literaturze, najczęściej brane są pod uwagę te, które opierają się na porządku reakcji chemicznych, zwłaszcza modele Lagergrena (pseudo-I-rzędowy) i Ho (pseudo-II-rzędowy) (Tabela I). W wielu pracach dotyczących procesu biosorpcji zauważono jednak, że model zaproponowany przez Lagergrena jest odpowiedni tylko podczas początkowego etapu procesu. Wynika to głównie z wykorzystania liniowej formy równania, która wymaga znajomości pojemności sorpcyjnej (q_e). Dane na temat tego współczynnika nie są natomiast potrzebne w przypadku stosowania drugiego z przedstawionych modeli kinetycznych [90].

W momencie uzyskania stanu równowagi dynamicznej obserwowany jest rozdział jonów metalu

Tabela I
Wybrane modele kinetyczne opisujące proces biosorpcji

Model	Równanie	Forma liniowa równania	Piśmiennictwo
Pseudo-pierwszorzędowy Lagergrena	$\frac{dq_t}{dt} = k_1 (q_e - q_t)^2$	$\log (q_e - q_t) = \log q_e - \frac{k_1}{2.303} t$ $v_1 = k_1 q_e$ $v_2 = k_1 q_e$	[41]
Pseudo-drugorzędowy	$\frac{dq_t}{dt} = k_2 (q_e - q_t)^2$	$q_t = \frac{t}{\frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{t}{q_e}}$ $v_2 = k_2 q_e^2$	[37]

Objaśnienia: q_e i q_t – masa jonów metalu, które uległy adsorpcji na biosorbencie w stanie równowagi e i czasie t ; k_1 – stała szybkości modelu Lagergrena; v_1 – początkowa szybkość biosorpcji, k_2 – stała szybkości modelu pseudo-drugorzędowego; v_2 – początkowa szybkość adsorpcji

między roztworem i biosorbentem. Można go opisać za pomocą izoterm adsorpcji, które przedstawiają zależność, jaka występuje w stałej temperaturze pomiędzy ilością substancji zaadsorbowanej (jonów) przez jednostkę masy biosorbentu, a stężeniem równowagowym w adsorbencie. Powszechnie stosowanym modelem opisu równowagi sorpcyjnej jest zaproponowana przez Langmuira teoria adsorpcji jednowarstwowej [42]. Obejmuje ona kilka założeń. Mianowicie informuje, że na powierzchni adsorbentu występuje określona liczba miejsc aktywnych, które zdolne są do wiązania adsorbentu, a ich liczba jest proporcjonalna do wielkości powierzchni. Ponadto, jednemu miejscu aktywnemu odpowiada jedna cząsteczka adsorbentu, która nie ma możliwości swobodnego przemieszczania się na powierzchni adsorbentu. Zjawisko to nazywane jest adsorpcją zlokalizowaną. Dodatkowo, nie obserwuje się wzajemnych oddziaływań pomiędzy zaadsorbowanymi cząsteczkami, a powstała warstwa adsorpcyjna powoduje zmniejszenie sił adsorpcyjnych i tworzy się w ten sposób warstwa jednocząsteczkowa. W konsekwencji procesu, maksymalne stężenie warstwy powierzchniowej równa się ilości występujących na powierzchni adsorbentu miejsc aktywnych [47]. Z uwagi na to, że w analizowanym środowisku mogą znajdować się jony różnych metali ciężkich, które wiążą się na powierzchni biosorbentu, niezwykle pomocne w planowaniu procesu biosorpcji jest zastosowanie modeli wieloskładnikowych. Najbardziej powszechnie stosowana jest izoterma BET (Brunauer-Emmett-Teller) wykorzystująca prosty model jednoskładnikowy, przy założeniu, że równanie Langmuira dotyczy każdej warstwy [22].

7. Podsumowanie

Bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, wchodzące w skład mikroflory błon śluzowych ludzi oraz zwierząt, są przykładem bakterii o działaniu prozdrowotnym, a coraz częściej zauważany i doceniany jest ich potencjał, jako wydajnych sorbentów metali ciężkich. Duży wpływ na działanie detoksykacyjne lactobacilli wobec pierwiastków wynika z budowy ich ściany komórkowej. Z tego względu, określenie udziału poszczególnych struktur komórkowych bakterii w procesie biosorpcji jest ważnym etapem poznawczym, dającym wgląd w potencjał bakterii, które mogą zostać wykorzystane do usuwania jonów metali nie tylko ze środowiska, ale również z przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt.

Piśmiennictwo

- Abbas S.H., Ismail I.M., Mostafa T.M., Sulaymon A.H.: Biosorption of heavy metals: a review. *J. Chem. Science Technol.* **3**, 74–102 (2014)
- Abernethy D.R., DeStefano A.J., Cecil T.L., Zaidi K., Williams R.L.: Metal impurities in food and drugs. *Pharm. Res.* **27**, 750–755 (2010)
- Ahemad M., Kibret M.: Recent trends in microbial biosorption of heavy metals: a review. *Biochem. Molecul. Biol.* **1**, 19–26 (2013)
- Åvall-Jääskeläinen S., Palva A.: *Lactobacillus* surface layers and their applications. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**, 511–529 (2005)
- Aziz R., Rafiq M.T., Yang J, Liu D., Lu L., He L., Daud M.K., Li T., Yang X.: Impact Assessment of Cadmium Toxicity and Its Bioavailability in Human Cell Lines (Caco-2 and HL-7702). *BioMed Res. Int.* DOI:10.1155/2014/839538 (2014)
- Bäth K., Roos S., Wall T., Jonsson H.: The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiol. Lett.* **253**, 75–82 (2005)
- Bayramoğlu G., Yakup Arica M.: Construction a hybrid biosorbent using *Scenedesmus quadricauda* and Ca-alginate for biosorption of Cu(II), Zn(II) and Ni(II): kinetics and equilibrium studies. *Bioresour. Technol.* **100**, 186–193 (2009)
- Bernhoft R.A.: Cadmium toxicity and treatment. *Sci. World. J.* DOI:10.1155/2013/394652 (2013)
- Bhakta J.N., Ohnishi K., Munekage Y., Iwasaki K., Wei M.Q.: Characterization of lactic acid bacteria-based probiotics as potential heavy metal sorbents. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 1193–1206 (2012)
- Bishak Y.K., Payahoo L., Osatdrahimi A., Nourazarian A.: Mechanisms of cadmium carcinogenicity in the gastrointestinal tract. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 9–21 (2015)
- Buda B., Dylus E., Górska-Frączek S., Brzozowska E., Gamian A.: Właściwości biologiczne białek powierzchniowych bakterii z rodzaju *Lactobacillus*. *Post. Hig. Med. Dośw.* **67**, 229–237 (2013)
- Bueno B.Y.M., Torem M.L., Moa F., De Mesquita L.M.S.: Biosorption of lead(II), chromium(III) and copper(II) by *R. opacus*: equilibrium and kinetic studies. *Miner. Eng.* **21**, 65–75 (2008)
- Cannino G., Ferruggia E., Luparello C., Rinaldi A.M.: Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*, **9**, 377–384 (2009)
- Cescutti P.: Bacterial capsular polysaccharides and exopolysaccharides (w) Microbial glycobiology. Structures, relevance and applications, red. A.P. Moran, O. Holst, P.J. Brennan, M. von Itzstein, Elsevier, Amsterdam, 2009, s. 93–108
- Chapot-Chartier M.P., Kulakauskas S.: Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* DOI: 10.1186/1475-2859-13-S1-S9 (2014)
- Czczot H., Majewska M.: Kadm – zagrożenia i skutki zdrowotne. *Farm. Pol.* **66**, 243–250 (2010)
- Czczot H., Skrzycki M.: Kadm – pierwiastek całkowicie zbędny dla organizmu. *Post. Hig. Med. Dośw.* **64**, 38–49 (2010)
- Di Cerbo A., Palmieri B.: Review: The market of probiotics. *Pak. J. Pharm. Sci.* **28**, 2199–2206 (2015)
- Dohm N., Petri A., Schlander M., Schlott B., König H., Claus H.: Molecular and biochemical properties of the S-layer protein from the wine bacterium *Lactobacillus hilgardii*. *Arch. Microbiol.* **193**, 251–261 (2011)
- Farnworth E.R.: The evidence to support health claims for probiotics. *J. Nutr.* **138**, 1250–1254 (2008)
- Feng M., Chen X., Li C., Nurgul R., Dong M.: Isolation and identification of an exopolysaccharide-producing lactic acid bacterium strain from chinese paocai and biosorption of Pb(II) by its exopolysaccharides. *J. Food Sci.* **77**, 111–117 (2012)
- Fomina M., Gadd G.M.: Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour. Technol.* **160**, 3–14 (2014)
- Frece J., Kos B., Svetec I.K., Zgaga Z., Mrsa V., Sušković J.: Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 285–292 (2005)

24. Gadd G.M.: Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**, 13–28 (2009)
25. Gadd G.M.: Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, **156**, 609–643 (2010)
26. Gajewska J., Błaszczak M.K.: Probiotyczne bakterie fermentacji mlekowej (LAB). *Post. Mikrobiol.* **51**, 55–65 (2012)
27. Gao J.F., Zhang Q., Wang J.H., Wu X.L., Wang S.Y., Peng Y.Z.: Contributions of functional groups and extracellular polymeric substances on the biosorption of dyes by aerobic granules. *Bioresour. Technol.* **102**, 805–813 (2011)
28. Gerbino E., Carasi P., Araujo-Andrade C., Tymczyszyn E., Gómez-Zavaglia A.: Role of S-layer proteins in the biosorption capacity of lead by *Lactobacillus kefir*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 583–592 (2015)
29. Gerbino E., Mobili P., Tymczyszyn E.E., Fausto R., Gómez-Zavaglia A.: FTIR spectroscopy structural analysis of the interaction between *Lactobacillus kefir* S-layers and metal ions. *J. Mol. Struct.* **987**, 186–192 (2011)
30. Gerbino E., Mobili P., Tymczyszyn E.E., Frausto-Reyes C., Araujo-Andrade C., Gómez-Zavaglia A.: Use of Raman spectroscopy and chemometrics for the quantification of metal ions attached to *Lactobacillus kefir*. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 363–371 (2012)
31. Gratz S., Taubel M., Juvonen R.O., Viluksela M., Turner P.C., Mykkanen H., El-Nezami H. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG modulates intestinal absorption, fecal excretion, and toxicity of aflatoxin B1 in rats. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 7398–7400 (2006)
32. Green-Ruiz C., Rodriguez-Tirado V., Gomez-Gil B.: Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects. *Bioresour. Technol.* **99**, 3864–3870 (2008)
33. Halttunen T., Salminen S., Meriluoto J., Tahvonen R., Lertola K.: Reversible surface binding of cadmium and lead by lactic acid and bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **125**, 170–175 (2008)
34. Halttunen T., Salminen S., Tahvonen R.: Rapid removal of lead and cadmium from water by specific lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 30–35 (2007)
35. He P., Lu Y., Liang Y., Chen B., Wu M., Li S., He G., Jin T.: Exposure assessment of dietary cadmium: findings from shanghainese over 40 years, China. *BMC Public Health*. DOI: 10.1186/1471-2458-13-590 (2013)
36. Hill C., Sanders M.E. i wsp.: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastro. Hepat.* **11**, 506–514 (2014)
37. Ho Y.S., McKay G.: Pseudo-second order model for sorption processes. *Process Biochem.* **34**, 451–465 (1999)
38. Hu S., Kong J., Sun Z., Han L., Kong W., Yang P.: Heterologous protein display on the cell surface of lactic acid bacteria mediated by the S-layer protein. *Microb. Cell Fact.* DOI:10.1186/1475-2859-10-86 (2011)
39. Hynönen U., Palva A.: *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 5225–5243 (2013)
40. Ibrahim F., Halttunen T., Tahvonen R., Salminen S.: Probiotic bacteria as potential detoxification tools: assessing their heavy metal binding isotherms. *Can. J. Microbiol.* **52**, 877–885 (2006)
41. Lagergren S.: Zur theorie der sogenannten adsorption gelöster stoffe. *Kungliga Svenska Vetenskapsakademiens Handlingar.* **24**, 1–39 (1898)
42. Langmuir I.: The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *J. Am. Chem. Soc.* **40**, 1361–1403 (1918)
43. Lebeer S., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J.: Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 728–764 (2008)
44. Lebeer S., Verhoeven T.L., Francius G., Schoofs G., Lambrichts I., Dufrene Y., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.: Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microb.* **75**, 3554–3563 (2009)
45. Li W.W., Yu H.Q.: Insight into the roles of microbial extracellular polymer substances in metal biosorption. *Bioresour. Technol.* **160**, 15–23 (2014)
46. Lin Z., Zhou C., Wu J., Zhou J., Wang L.: A further insight into the mechanism of Ag⁺ biosorption by *Lactobacillus* sp. strain A09. *Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* **61**, 1195–1200 (2005)
47. Liu Y., Liu Y.J.: Biosorption isotherms, kinetics and thermodynamics. *Sep. Purif. Technol.* **61**, 229–242 (2008)
48. Lortal S., Vanheijenoort J., Gruber K., Sleytr U.B.: S-layer of *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046: isolation, chemical characterization and re-formation after extraction with lithium chloride. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 611–618 (1992)
49. Marraffini L.A., Dedent A.C., Schneewind O.: Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 192–221 (2006)
50. Mercan E., İspirli H., Sert D., Yilmaz M.T., Dertli E.: Impact of exopolysaccharide production on functional properties of some *Lactobacillus salivarius* strains. *Arch. Microbiol.* **197**, 1041–1049 (2015)
51. Michalak I., Chojnacka K., Witek-Krowiak A.: State of the art for the biosorption process – a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **170**, 1389–1416 (2013)
52. Millette M., Luquet F.M., Ruiz M.T., Lacroix M.: Characterization of probiotic properties of *Lactobacillus* strains. *Dairy Sci. Technol.* **88**, 695–705 (2008)
53. Monachese M., Burton J.P., Reid G.: Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 6397–6404 (2012)
54. Moppert X., Costauoec T.L., Raguene G., Courtois A., Simon-Colin C., Crassous P., Costa B., Guezennec J.: Investigations into the uptake of copper, iron and selenium by a highly sulphated bacterial exopolysaccharide isolated from microbial mats. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 599–604 (2009)
55. Morillo Perez J.A., Garcia-Ribera R., Quesada T., Aguilera M., Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sanchez M.: Biosorption of heavy metals by the exopolysaccharide produced by *Paenibacillus jamilae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 2699–2704 (2008)
56. Mrvčić J., Prebeg T., Barišić L., Stanzer D., Bačun-Družina V., Stehlik-Tomas V.: Zinc binding by lactic acid bacteria. *Food Technol. Biotechnol.* **47**, 381–388 (2009)
57. Mrvčić J., Stanzer D., Solić E., Stehlik-Tomas V.: Interaction of lactic acid bacteria with metal ions: opportunities for improving food safety and quality. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 2771–2782 (2012)
58. Nadeem R., Hanif M.A., Shaheen F., Perveen S., Zafar M.N., Iqbal T.: Physical and chemical modification of distillery sludge for Pb(II) biosorption. *J. Hazard. Mater.* **150**, 335–342 (2008)
59. Ninkov M., Kataranovski M. i wsp.: Toxicity of oral cadmium intake: Impact on gut immunity *Toxicol. Lett.* **237**, 89–99 (2015)
60. Nordberg G.F., Nogawa K., Nordberg M., Friberg L.: Cadmium (w) Handbook of the Toxicology of Metals, red. G.F. Nordberg, B.F. Fowler, M. Nordberg, L. Friberg, Elsevier, Amsterdam, 2007, s. 445–486

61. Oleńska E., Małek W.: Mechanizmy oporności bakterii na metale ciężkie. *Post. Mikrobiol.* **52**, 363–371 (2013)
62. Pal A., Paul A.K.: Microbial extracellular polymeric substances central elements in heavy metal bioremediation. *Ind. J. Microbiol.* **48**, 49–64 (2008)
63. Pal A.A., Ghosh S., Paul A.K.: Biosorption of cobalt by fungi from serpentine soil. *Bioresour. Technol.* **97**, 1253–1258 (2006)
64. Pardo R., Herguedas M., E. Barrado E., Vega M.: Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. *Anal. Bioanalyt. Chem.* **376**, 26–32 (2003)
65. Patra R.C., Rautray A.K., Swarup D.: Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet. Med. Int.* DOI: 10.4061/2011/457327 (2011)
66. Patten D.A., Laws A.P.: *Lactobacillus*-produced exopolysaccharides and their potential health benefits: a review. *Benef. Microbes.* **6**, 457–471 (2015)
67. Polak-Berecka M., Szwajgier D., Waśko A.: Biosorption of Al^{+3} and Cd^{+2} by an Eopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus*. *J. Food Sci.* **79**, T2404–2408 (2014)
68. Polak-Berecka M., Waśko A., Paduch R., Skrzypek T., Sroka-Bartnicka A.: The effect of cell surface components on adhesion ability of *Lactobacillus rhamnosus*. *Anton. Leeuw.* **106**, 751–762 (2014)
69. Qin Z., Buehler M.J.: Molecular dynamics simulation of the α -helix to β -sheet transition in coiled protein filaments: evidence for a critical filament length scale. *Phys. Rev. Lett.* DOI: <http://dx.doi.org/10.1103/PhysRevLett.104.198304> (2010)
70. Rani A., Kumar A., Lal A., Pant M.: Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int. J. Environ. Health Res.* **24**, 378–399 (2014)
71. Sarkar A., Ravindran G., Krishnamurthy V.: A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *Int. J. Bio. Tech. Res.* **3**, 17–36 (2013)
72. Schauder A., Avital A., Malik Z.: Regulation and gene expression of heme synthesis under heavy metal exposure-review. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **29**, 137–158 (2010)
73. Schut S., Zauner S., Hampel G., König H., Claus H.: Biosorption of copper by wine-relevant lactobacilli. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 126–131 (2011)
74. Sengupta R., Altermann E., Anderson R.C., McNabb W.C., Moughan P.J., Roy N.C.: The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators Inflamm.* DOI:10.1155/2013/237921 (2013)
75. Shuhong Y., Meipin Z., Hong Y., Han W., Shan X., Yan L., Jihui W.: Biosorption of Cu^{2+} , Pb^{2+} and Cr^{6+} by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*. *Carbohydr. Polym.* **101**, 50–56 (2014)
76. Sleytr U.B., Schuster B., Egelseer E.M., Pum D.: S-layers: principles and applications. *FEMS. Microbiol. Rev.* **38**, 823–864 (2014)
77. Tian F., Xiao Y., Li X., Zhai Q., Wang G., Zhang Q., Zhang H., Chen W.: Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8246 against copper toxicity in mice. *PLoS One*, **10**, e0143318 (2015)
78. Topcu A., Bulat T.: Removal of cadmium and lead from aqueous solution by *Enterococcus faecium* strains. *J. Food Sci.* **75**, T13–T17 (2010)
79. Torino M.I., Font de Valdez G., Mozzi F.: Biopolymers from lactic acid bacteria. Novel applications in foods and beverages. *Front. Microbiol.* DOI:10.3389/fmicb.2015.00834 (2015)
80. Tulumoglu S., Yuksekdag Z.N., Beyatli Y., Simsek O., Cinar B., Yaşar E.: Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. *Anaerobe.* **24**, 36–42 (2013)
81. Uslu G., Tanyol M.: 2006.: Equilibrium and thermodynamic parameters of single and binary mixture biosorption of lead (II) and copper (II) ions onto *Pseudomonas putida*: effect of temperature. *J. Hazard. Mater.* **B135**, 87–93 (2006)
82. Valko M., Morris H., Cronin M.T.D.: Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* **12**, 1161–1208 (2005)
83. Van Kerkhove E., Pennemans V., Swennen Q.: Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *BioMetals.* **23**, 823–855 (2010)
84. Vesey D.A.: Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal tubule: focus on the interaction with essential metals. *Toxicol. Lett.* **198**, 13–19 (2010)
85. Vijayaraghavan K., Yun Y.S.: Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnol. Adv.* **26**, 266–291 (2008)
86. Volesky B.: Biosorption and me. *Water Res.* **41**, 4017–4029 (2007)
87. Vriee A., Holleman F., Zoetendal E., de Vos W., Hoekstra J., Nieuwdorp M.: The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia.* **53**, 606–613 (2010)
88. Waalkes M.P.: Cadmium carcinogenesis. *Mutat. Res.* **533**, 107–120 (2003)
89. Wang B., Shao C., Li Y., Tan Y, Cai L.: Cadmium and its epigenetic effects. *Curr. Med. Chem.* **19**, 2611–2620 (2012)
90. Wang J., Chen C.: Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* **27**, 195–226 (2009)
91. Waśko A., Polak-Berecka M., Paduch R., Jóźwiak K.: The effect of moonlighting proteins on the adhesion and aggregation ability of *Lactobacillus helveticus*. *Anaerobe.* **30**, 161–168 (2014)
92. Wells J.M.: Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb. Cell Fact.* DOI:10.1186/14752859-10-S1-S17 (2011)
93. Wu K.C., Liu J.J., Klaassen C.D.: Nrf2 activation prevents cadmium-induced acute liver injury. *Toxicol. App. Pharmacol.* **263**, 14–20 (2012)
94. Zamil S., Ahmad S.S., Choi M.H., Park J.Y., Yoon S.C.: Correlating metal ionic characteristics with biosorption capacity of *Staphylococcus saprophyticus* BMSZ711 using QICAR model. *Bioresour. Technol.* **100**, 1895–1902 (2009)
95. Zhai Q., Narbad A., Chen W.: Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. *Nutrients.* **7**, 552–571 (2015)
96. Zhai Q., Wang G., Zhao J., Liu X., Narbad A., Chen Y.Q., Zhang H., Tian F., Chen W.: Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 4063–4071 (2014)
97. Zhai Q., Wang G., Zhao J., Liu X., Tian F., Zhang H., Chen W.: Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against acute cadmium toxicity in mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 1508–1515 (2013)
98. Zouboulis A.I., Loukidou M.X., Matis K.A.: Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochem.* **39**, 909–916 (2004)