

# Effect of heavy metals on the production of siderophores by an endolithic strain of *Bacillus velezensis* S18



Elistratova A.A., Shirshikova T.V., Ivoilova T.M., Sharipova M.R., Khilyas I.V.\*

Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan, Russian Federation

**ABSTRACT.** The high anthropogenic load of heavy metals on water resources has a negative impact on all living organisms, causing environmental, medical and economic problems. One of the most ubiquitous microorganisms in aquatic ecosystems is the genus *Bacillus*. The study of the mechanisms by which *Bacillus* bacteria adapt to heavy metal exposure contributes significantly to the understanding of physiological and biotechnological processes. This study focuses on the effect of heavy metals on the production of siderophores by the endolithic strain *Bacillus velezensis* S18. The *B. velezensis* S18 strain was found to demonstrate resistance towards high concentrations of heavy metals, as well as the ability to secrete siderophores. Thus, *B. velezensis* S18 has significant potential for the detoxification and recovery of metals from contaminated surface and groundwater.

**Keywords:** siderophores, *Bacillus*, heavy metals

**For citation:** Elistratova A.A., Shirshikova T.V., Ivoilova T.M., Sharipova M.R., Khilyas I.V. Effect of heavy metals on the production of siderophores by an endolithic strain of *Bacillus velezensis* S18 // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - P. 877-880. DOI: [10.31951/2658-3518-2024-A-4-877](https://doi.org/10.31951/2658-3518-2024-A-4-877)

## 1. Introduction

One of the most pressing issues facing our environment is the contamination of aquatic ecosystems by heavy metals and metalloids. This is a direct result of industrial activities, urban services and the use of chemical fertilisers in agriculture (Roskova et al., 2022). High anthropogenic load of heavy metals on water resources has a negative impact on all living organisms, causing environmental, health and economic problems. Biological methods are the safest and most effective way to treat and recover surface, groundwater and wastewater. The key role in the bioremediation process belongs to microorganisms, which have developed various mechanisms of resistance to heavy metals (Gadd, 2010). Microbial siderophores are low molecular weight organic compounds that have high affinity for iron ions ( $\text{Fe}^{3+}$ ) and other metals, which provides a high potential for application in detoxification processes and extraction of metals from polluted waters (Hofmann et al., 2021). Bacteria of the genus *Bacillus* have adapted to the conditions of life in a wide variety of ecological niches, including freshwater and marine aquatic systems. Members of the genus *Bacillus* are known to be resistant to heavy metals and also produce various siderophores (Khan et al., 2016). The aim of this work was to investigate the effect of heavy metals

on the production of siderophores by endolithic strain *Bacillus velezensis* S18.

## 2. Materials and methods

**Isolation and Identification.** The strain S18 was isolated from an ultramafic rock, serpentinite. Genomic DNA from strain S18 was extracted from an overnight LB-grown culture using the phenol-chloroform method. The 16S rRNA gene (1500 bp) was amplified with polymerase chain reaction, then then sequenced using instrument ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, USA) following Sanger's method. The bacterial sequences were analyzed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).

**Heavy Metal Resistance.** *Bacillus velezensis* S18 was exposed to different concentrations of heavy metals ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ) to determine their minimum inhibitory concentrations (MICs).

**Siderophore Production Screening.** The Chrome Azurol S (CAS) agar assay was used for screening *B. velezensis* S18 capacity for siderophore production (Payne, 1994). Additionally, a replacement of  $\text{Fe}^{3+}$  with heavy-metal ions ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) in the standard CAS agar method was tested (Sarvepalli et al., 2023).

\*Corresponding author.

E-mail address: [irina.khilyas@gmail.com](mailto:irina.khilyas@gmail.com) (I.V. Khilyas)

**Received:** May 31, 2024; **Accepted:** June 14, 2024;

**Available online:** August 30, 2024

© Author(s) 2024. This work is distributed under the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.



### 3. Results and discussion

The endolithic strain *B. velezensis* S18 was isolated from a serpentinite (Khalilovsky massif, Orenburg region, Russia) (Khilyas et al., 2019). A comparative analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene of the strain S18 revealed the highest similarity with the typical strain of *Bacillus velezensis* strain L-15. The resistance of the *B. velezensis* S18 to different concentrations of heavy metals was evaluated on LA medium for determination of minimum inhibitory concentrations (MIC). The *B. velezensis* S18 demonstrated the capacity of surviving in heavy metals concentrations of 2 mM Ni<sup>2+</sup>, 1 mM Co<sup>2+</sup>, 0.5 mM Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>, 3 mM Cu<sup>2+</sup>, 4 mM Zn<sup>2+</sup> and 5 mM Fe<sup>3+</sup>. The capacity of *B. velezensis* S18 to secrete siderophores on standard CAS-agar medium was demonstrated. Replacement of Fe<sup>+3</sup> ion with Al<sup>+3</sup>, Cu<sup>+2</sup>, Ga<sup>+3</sup> ions revealed the formation of increased halo zones formed around the *B. velezensis* S18.

### 4. Conclusion

The endolithic strain *Bacillus velezensis* S18 has the capacity to synthesize metal-binding metabolites and to resist to heavy metals. This determines its potential ecological and biotechnological significance. The binding of heavy metals by *B. velezensis* S18 siderophores offers new avenues for the development of biotechnologies in the field of biometallurgy, as well as the detoxification of metals in surface water and wastewater.

### 5. Funding

This research was supported by the RSF grant (Russian Science Foundation) № 24-24-00473.

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

### References

- Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156(3): 609-643. DOI: [10.1099/mic.0.037143-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0)
- Hofmann M., Heine T., Malik L. et al. 2021. Screening for microbial metal-chelating Siderophores for the removal of metal ions from solutions. *Microorganisms* 9(1): 111. DOI: [10.3390/microorganisms9010111](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010111)
- Khan A., Doshi H.V., Thakur M.C. 2016. *Bacillus* spp.: a prolific siderophore producer. In: Islam M., Rahman M., Pandey P. et al. (Ed.), *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, pp. 309-323 DOI: [10.1007/978-3-319-44409-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_13)
- Khilyas I.V., Sorokina A.V., Eliustratova A.A. et al. 2019. Microbial diversity and mineral composition of weathered serpentinite rock of the Khalilovsky massif. *PLoS One* 14(12): e0225929. DOI: [10.1371/journal.pone.0225929](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225929)
- Payne S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 235: 329-344. DOI: [10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)
- Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. 2022. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Science of the Total Environment* 819: 153144. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.153144](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144)
- Sarvepalli M., Velidandi A., Korrapati N. 2023. Optimization of siderophore production in three marine bacterial isolates along with their heavy-metal chelation and seed germination potential determination. *Microorganisms* 11(12): 2873. DOI: [10.3390/microorganisms11122873](https://doi.org/10.3390/microorganisms11122873)

# Влияние тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18

Краткое сообщение

LIMNOLOGY  
FRESHWATER  
BIOLOGY

Елистратова А.А., Ширшикова Т.В., Ивойлова Т.М., Шарипова М.Р., Хиляс И.В.\*

Казанский федеральный университет, ул. Кремлевская, д.18, Казань, 420008, Россия

**АННОТАЦИЯ.** Высокая антропогенная нагрузка тяжелыми металлами на водные ресурсы оказывает негативное влияние на все живые организмы, вызывая экологические, медицинские и экономические проблемы. Одними из наиболее распространенных микроорганизмов водных систем являются бактерии рода *Bacillus*. Исследование механизмов адаптации бактерий рода *Bacillus* к воздействию тяжелыми металлами вносит существенный вклад в понимание физиологических и биотехнологических процессов. Исследование посвящено влиянию тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18. Штамм *B. velezensis* S18 проявляет устойчивость к высоким концентрациям тяжелых металлов и способен секретировать сидерофоры. Таким образом, *B. velezensis* S18 обладает значительным потенциалом для детоксикации и извлечения металлов из загрязненных поверхностных и грунтовых вод.

**Ключевые слова:** сидерофоры, *Bacillus*, тяжелые металлы

Для цитирования: Елистратова А.А., Ширшикова Т.В., Ивойлова Т.М., Шарипова М.Р., Хиляс И.В. Влияние тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18 // Limnology and Freshwater Biology. 2024. - № 4. - С. 877-880. DOI: 10.31951/2658-3518-2024-A-4-877

## 1. Введение

Одной из наиболее острых проблем загрязнения окружающей среды является попадание тяжелых металлов и металлоидов в водные экосистемы в результате деятельности промышленных предприятий, городских служб и применения химических удобрений в сельском хозяйстве (Roskova et al., 2022). Высокая антропогенная нагрузка тяжелыми металлами на водные ресурсы оказывает негативное влияние на все живые организмы, вызывая экологические, медицинские и экономические проблемы. Для очистки и восстановления поверхностных, подземных и сточных вод разрабатываются биологические методы, которые относятся к наиболее безопасным и эффективным. Ключевая роль в процессе биоремедиации принадлежит микроорганизмам, которые выработали различные механизмы устойчивости к тяжелым металлам (Gadd, 2010). Микробные сидерофоры – низкомолекулярные органические соединения, которые обладают высокой аффинностью к ионам железа ( $Fe^{3+}$ ) и другим металлам, что обеспечивает высокий потенциал для применения в процессах детоксикации и извлечения металлов из

загрязненных вод (Hofmann et al., 2021). Бактерии рода *Bacillus* адаптировались к условиям жизнедеятельности в самых разнообразных эконизах, включая пресноводные и морские водные системы. Известно, что представители рода *Bacillus* обладают устойчивостью к тяжелым металлам, а также продуцируют различные сидерофоры (Khan et al., 2016).

Цель данной работы - исследование влияния тяжелых металлов на продукцию сидерофоров эндолитным штаммом *Bacillus velezensis* S18.

## 2. Материалы и методы

**Выделение и идентификация.** Штамм S18 выделен из ультрамафической горной породы – серпентинита. Геномная ДНК штамма S18 выделена фенол-хлороформным методом. Фрагмент гена 16S рРНК (1500 п.н.) амплифицировали с помощью ПЦР, а затем секвенировали на приборе ABI 3730 DNA Analyzer (Life Technologies, США) по методу Сэнгера. Последовательность гена штамма *Bacillus velezensis* S18 анализировали с помощью программы Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn).

\*Автор для переписки.

Адрес e-mail: [irina.khilyas@gmail.com](mailto:irina.khilyas@gmail.com) (И.В. Хиляс)

Поступила: 31 мая 2024; Принята: 14 июня 2024;

Опубликована online: 30 августа 2024

© Автор(ы) 2024. Эта работа распространяется под международной лицензией Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0.



**Устойчивость к тяжелым металлам.** Для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК) тяжелых металлов, культуру *B. velezensis* S18 выращивали на агаризованной среде Лурия-Бертани в присутствии различных концентраций  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ .

**Способность к продукции сидерофоров** штаммом *B. velezensis* S18 определяли с использованием агаризованной среды, содержащей хром азурол S (CAS-агар) (Payne, 1994). Дополнительно, проводили скрининг продукции сидерофоров в CAS-агар среде, в которой  $\text{Fe}^{3+}$  замещали ионами тяжелых металлов ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ) (Sarvepalli et al., 2023).

### 3. Результаты и обсуждение

Эндолитный штамм *B. velezensis* S18 выделен из минерала группы серпентинита (Халиловский массив, Оренбургская область, Россия) (Khilyas et al., 2019). Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК штамма *B. velezensis* S18 показал наибольшее сходство с типовым штаммом *Bacillus velezensis* strain L-15. Устойчивость штамма *B. velezensis* S18 к различным концентрациям тяжелых металлов проверяли на агаризованной среде Лурия-Бертани для определения минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Обнаружили устойчивость штамма *B. velezensis* S18 к тяжелым металлам в концентрациях 2 мМ  $\text{Ni}^{2+}$ , 1 мМ  $\text{Co}^{2+}$ , 0.5 мМ  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , 3 мМ  $\text{Cu}^{2+}$ , 4 мМ  $\text{Zn}^{2+}$  и 5 мМ  $\text{Fe}^{3+}$ . Показали способность штамма *B. velezensis* S18 секретировать сидерофоры на стандартной среде CAS-агар. Замещение иона  $\text{Fe}^{3+}$  на ионы  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  или  $\text{Ga}^{3+}$  в среде CAS-агар выявило формирование зон просветления вокруг колонии большего диаметра по сравнению со стандартной средой.

### 4. Выводы

Эндолитный штамм *Bacillus velezensis* S18 обладает способностью продуцировать металлсвязывающие метаболиты, а также устойчив к тяжелым металлам, что определяет его потенциальную

экологическую и биотехнологическую значимость. Связывание тяжелых металлов с помощью сидерофоров *B. velezensis* S18 предоставляет новые горизонты для разработки биотехнологий в области биометаллургии, а также детоксикации металлов в поверхностных и сточных водах.

### 5. Финансирование

Работа выполнена при финансовой поддержке (за счет средств) гранта РФФИ № 24-24-00473.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Gadd G.M. 2010. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology* 156(3): 609-643. DOI: [10.1099/mic.0.037143-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0)
- Hofmann M., Heine T., Malik L. et al. 2021. Screening for microbial metal-chelating Siderophores for the removal of metal ions from solutions. *Microorganisms* 9(1): 111. DOI: [10.3390/microorganisms9010111](https://doi.org/10.3390/microorganisms9010111)
- Khan A., Doshi H.V., Thakur M.C. 2016. *Bacillus* spp.: a prolific siderophore producer. In: Islam M., Rahman M., Pandey P. et al. (Ed.), *Bacilli and Agrobiotechnology*. Springer, pp. 309-323 DOI: [10.1007/978-3-319-44409-3\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-44409-3_13)
- Khilyas I.V., Sorokina A.V., Elistratova A.A. et al. 2019. Microbial diversity and mineral composition of weathered serpentine rock of the Khalilovsky massif. *PLoS One* 14(12): e0225929. DOI: [10.1371/journal.pone.0225929](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225929)
- Payne S.M. 1994. Detection, isolation, and characterization of siderophores. *Methods in Enzymology* 235: 329-344. DOI: [10.1016/0076-6879\(94\)35151-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35151-1)
- Roskova Z., Skarohlid R., McGachy L. 2022. Siderophores: an alternative bioremediation strategy? *Science of the Total Environment* 819: 153144. DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.153144](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153144)
- Sarvepalli M., Velidandi A., Korrapati N. 2023. Optimization of siderophore production in three marine bacterial isolates along with their heavy-metal chelation and seed germination potential determination. *Microorganisms* 11(12): 2873. DOI: [10.3390/microorganisms11122873](https://doi.org/10.3390/microorganisms11122873)