

# АККУМУЛЯТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ АССОЦИАЦИИ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ Н-5-8 *BACILLUS MEGATHERIUM* и Н-5-2 *BACILLUS CEREUS* СОЛИ СВИНЦА

ОМУРГАЗИЕВА ЧОЛПОН МОНОЛДОРОВНА, САТАРОВА ЖАЗГУЛЬ

<sup>1</sup>Кыргызский национальный университет им. Ж.Баласагына

УДК:576.8

Некоторые микроорганизмы обладают способностью противостоять в той или иной мере токсическому действию тяжелых металлов. Они могут приспособиться к росту при тех концентрациях тяжелых металлов в среде, которые вначале являются для них ингибирующими или вообще растут при гораздо более высоких (до 1000 раз) концентрациях металла, чем те, которые для других бактерий являются летальными [4]. Такие организмы обычно называют устойчивыми к действию тяжелых металлов. И, следовательно, в последнее время учеными сделаны немалые попытки по использованию почвенных микроорганизмов в качестве биоиндикаторов загрязнения.

Особенно актуальным вопросом экологической биотехнологии является проблема очистки и обезвреживания промышленных отходов и стоков, зачастую содержащих металлы в высоких концентрациях. Наиболее дешевыми и эффективными являются биологические методы очистки сточных вод и промышленных выбросов, основанные на способности микроорганизмов аккумулировать металлы из водной среды, почвы и ила в больших количествах независимо от их необходимости для клеточного метаболизма [3, 4, 5, 7].

Многим микроорганизмам свойственно накапливать содержащиеся в среде тяжелые металлы [3, 5, 6], что приводит к более или менее полному извлечению их из среды и концентрированию в клетках. Использование этого свойства имеет большие перспективы в **биотехнологии**.

Целью настоящего исследования явилось выявление аккумулирующей активности отобранных устойчивых штаммов бактерий к повышенным концентрациям соли свинца, использования их в дальнейшем для биоремедиации окружающей среды от загрязнений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Посевной материал – штамм *Bacillus megatherium* Н5-8, *Bacillus cereus* Н5-2 культивировали на мясопептонном агаре (МПА). Полученный посевной материал в асептических условиях вносили в количестве  $10^6$ ;  $10^7$  кл/мл, дающем начальную оптическую плотность  $OD=0,1$  (ФЭК-56м, 540 нм, кювета 1 см) в колбы со стерильной жидкой питательной средой.

В качестве жидких питательных сред мы использовали почвенные вытяжки без добавления агара, с целью максимально приблизить к естественным условиям.

Опыты ставили в качалочных колбах емкостью 250 мл (объем среды 50 мл), в которую вносились концентрированные растворы  $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$  (превышающие ПДК Pb в 10, 25, 50 раза) в дозах 1; 2,5; 5 мг/л при температуре 28-30°C, встряхивали на качалке при 200-220 об/мин, pH питательной среды доводили до 7,5. В качестве контроля на все варианты была использована культуральная жидкость без внесения металлов.

Через каждые 6, 12, 24, 48 часов аккумулятивную активность штаммов к содержанию в питательной почвенной среде соли свинца контролировали по изменению биомассы культуры. С измерением оптической плотности через ФЭК-КФ-2 (ОП<sub>540</sub> нм, толщина кюветы 1см), а также выражали характером роста и развития колоний и численностью колониеобразующих единиц (КОЕ), путем высева из двух последних разведений ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ) в чашки Петри с питательным агаром и ставили в термостат при 27-28°C. Через 2-3 суток подсчитывали количество колоний. Подсчет выросших колоний проводили по двум разведениям. Опыт проведен в 3-х кратной повторности. Полученные результаты обрабатывали статистически (Б.М. Доспехов, 1979).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для отбора особоустойчивых штаммов бактерий к повышенным концентрациям тяжелых металлов проводили опыты по выявлению степени аккумуляции соли свинца микроорганизмами в жидкой среде. Основное внимания мы уделяли на двух выделенных штаммов Н-5-8 *Bacillus*

*megatherium* и Н-5-2 *Bacillus cereus* как накопители высоких концентраций и трансформаторов соли тяжелых металлов.

По интенсивности роста и накоплению биомассы мы судили о включении ионов металла в определенные метаболические процессы бактерий. Способность клеток микроорганизма максимально поглощать молекулы металла из окружающей среды и трансформировать их в другие не вредные соединения, предопределяет использование таких бактерий для очистки от загрязнения.

Во всех вариантах опыта процент использования и трансформации соли свинца ассоциациями был выше, чем индивидуальными штаммами. По литературным данным также можно увидеть, что ассоциации до 4-х даже 5-6-х штаммов приводили к возрастанию деструктивной активности.

При моделировании состава микробной ассоциации необходимо учитывать ее устойчивость, поскольку интродукция в загрязненную среду неустойчивого сообщества приводит к резкому падению титра отдельных ее составляющих, в связи, с чем эффективность применения данной ассоциации снижается.

Как видно табл.1. при дозе свинца, превышающей в 10 раз ПДК (1 мг/л) наблюдалась стимуляция роста и высокая концентрация биомасс культур до 60-114% к контрольному варианту через 12-48 ч. роста. При концентрации 2,5 мг/л количество клеток (6ч) значительно ниже, чем при концентрации 5 мг/л, но выше чем в среде контрольного варианта. В процессе роста ассоциаций культур также измеряли D среды, однако при концентрации свинца 1мг/л значения D<sub>(540)</sub> и 2,5мг/л концентрации к 12ч достоверно не отличались, но более высокой концентрации свинца (5мг/л) показатель ОП увеличивается, даже большей степени, чем в контроле (рис.1.). Наибольшая скорость изменения роста клеток наблюдалась в 12ч культивирования при концентрациях 1 и 2.5мг/л, кроме 5мг/л свинца. Это свидетельствует о неравенстве метаболического потенциала культивируемых клеток, ответственного за аккумуляцию металла, при всех концентрациях в течение этого срока культивирования. Следовательно, можно предположить, что количество метаболически активных клеток бактерий в среде культивирования неодинаково для всех вариантов опыта.

Рассматривая соотношение штаммов бактерий в паре *Bacillus megatherium* + *Bacillus cereus*, можно видеть, что 2-х ассоциациях при дозе 1 и 2,5 мг/л свинца, на 6 ч до 12 ч культивирования относительное количество клеток штамма Н5-2 уменьшалось.

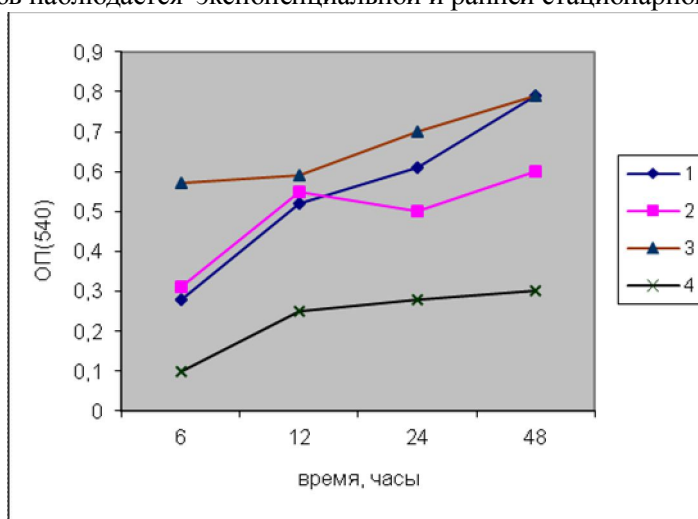
Таблица 1.

Динамика численности штаммов (Н-5-8+Н-5-2) в процессе аккумуляции соли свинца в жидкой среде

Ассоциация	Конц. свинца	Количество (кл/мл) и соотношение микроорганизмов в ассоциации, %			
		культивирование, (часы)			
		6	12	24	48
<i>B. megatherium</i> + <i>B. cereus</i> (Н-5-8+Н-5-2) соотношение	1 мг/л	89× 10 <sup>5</sup> 65,1/34,8	176× 10 <sup>5</sup> 100/0	173× 10 <sup>5</sup> 48,3/53,6	175× 10 <sup>5</sup> 51,2/47,6
<i>B. megatherium</i> + <i>B. cereus</i> (Н-5-8+Н-5-2) соотношение	2,5 мг/л	59× 10 <sup>5</sup> 47,5/52,5	108× 10 <sup>5</sup> 98,7/1,2	119× 10 <sup>5</sup> 28,5/71,4	116× 10 <sup>5</sup> 22,8/77,1
<i>B. megatherium</i> + <i>B. cereus</i> (Н-5-8+Н-5-2) соотношение	5 мг/л	61× 10 <sup>5</sup> 3,3/74,5	118× 10 <sup>5</sup> 2,5/79,3	198× 10 <sup>5</sup> 41,8/49,07	89× 10 <sup>5</sup> 42/53,1
<i>B. megatherium</i> + <i>B. cereus</i> (Н-5-8+Н-5-2) соотношение	контроль	12,3× 10 <sup>4</sup> 72,9/18,9	38× 10 <sup>5</sup> 61,4/38,5	27× 10 <sup>5</sup> 28,3/71	86,6× 10 <sup>4</sup> 76,9/23

Начиная к 24ч численность штаммов Н5-2 при возрастающих концентрациях 1; 2,5; 5мг/л свинца увеличивается, и составляла соответственно 53,6; 71,4; 49,07%. Наиболее резкие изменения численности штаммов наблюдались при высокой концентрации свинца (5мг/л) в течение всего срока культивирования. Так, с 6ч до 12ч культивирования рост штамма Н5-2 доминирует. Численность штаммов Н5-8 *Bacillus megatherium* в ассоциациях было наименьшем количестве, именно в присутствии высоком концентрации свинца в питательной среде первые 6 и 12 ч контакте. Вероятно,

это связано интенсивным поглощением клетки штамма *H5-2* соли свинца, чем клетки штамма *H5-8* (табл.1.). Таким образом, наибольшая скорость аккумуляции исследованных металлов биомассой ассоциациями штаммов наблюдается экспоненциальной и ранней стационарной фазах роста.



Диagr.1. Степень аккумулятивных способностей высоких концентраций свинца культурами *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus* (H5-8 + H5-2).

Концентрация соли свинца 1 - 1мг/л; 2 – 2,5 мг/л; 3 – 5 мг/л; 4 – контроль (без внесения металла).

Одним из факторов, влияющих на эффективность утилизации свинца, является рН среды культивирования. При дозе 2,5 мг/л (25 раза выше ПДК) свинца закисление среды в процессе контактирования не наблюдали (табл.2). Для биомассы ассоциации штаммов *H5-8 Bacillus megatherium*+ *H5-2 Bacillus cereus* оптимальное для трансформации значение рН лежит в области 6,78-7,33, она равняется 1 мг/л Рb и при понижении рН наблюдается постепенное снижение адаптационной способности, при рН 3-4 и далее замечается заметное падение концентрации биомассы характерное для всех штаммов.

Таблица 2.

Влияние рН на аккумуляции **свинца** ассоциациями культур *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus* (H-5-8+H-5-2)

Концентрация соли свинца мг/л	Показатели рН среды через 6, 12, 24 и 48 ч. роста			
	6ч	12ч	24ч	48ч
0 (контроль)	7,01	6,78	7,28	6,72
1	7,21	6,78	7,21	7,33
2,5	7,23	6,87	7,04	7,40
5	6,77	6,82	7,24	6,72

Таким образом, используемые штаммы *H5-8 Bacillus megatherium*+*H5-2 Bacillus cereus* могут увеличивать свою биомассу при достаточно высоких концентрациях свинца до 5мг/л в среде, однако оптимальными являются концентрации до 1,5 мг/л, где удельная скорость роста и биомассы культур имеют максимальные значения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Методы общей микробиологии. Т.1 /Под ред. Герхарда Ф. - М.: Мир, 1983. - 536с.
2. Методы почвенной микробиологии и биохимии /Под ред. Д.Г.Звягинцева. - М., 1980. – 224с.
3. Сенцова О.Ю., Максимов В.Н. Действие тяжелых металлов на микроорганизмы //Успехи микробиологии. - М., 1985. – Вып.20. - С.227-252.
4. Эрлих Х. Жизнь микроорганизмов в присутствии тяжелых металлов, мышьяка и сурьмы //Жизнь микробов в экстремальных условиях /Под ред. Д.Кашнер. - М.: Мир. – 1981.- С.440-469.
5. Христофорова Н.К. Биоиндикация и мониторинг загрязнения морских вод тяжелыми металлами. - Л.: Наука, 1984. - 192с.
6. Ховрычев М.Н., Семенова А.М.,Работнова И.Л. Действие ионов цинка на *Candida utilis* //Микробиология. – 1980. – Вып.1. - Т.49. С.59-63.
7. Ховрычев М.Н., Федорова Т.А., Работнова И.Л. О влиянии ионов меди на рост *Candida utilis* в непрерывной культуре //Микробиология. -1974.- Вып.1. - Т.43. - С.99-102.