

ВНЕДРЕНИЕ В УЧЕБНЫЙ ПРОЦЕСС ТЕОРИТИЧЕСКИХ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ ПО ИЗУЧЕНИЮ СПОСОБНОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ К БИОАККУМУЛЯЦИИ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Чичерина В.Р., Сизенцов А.Н.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», г. Оренбург

Так же как и другим организмам, всем микроорганизмам в качестве компонентов питания необходимы те или иные тяжелые металлы, например такие, как кобальт, марганец, железо, медь, цинк.

Существуют два варианта локализации ионов металлов, так одни элементы, такие как медь, связываются в основном с клеточной поверхностью, другие же элементы, например ртуть и железо, проникают внутрь клетки.

Существуют бактерии и грибы, которые вырабатывают специальные хелатообразующие вещества, облегчающие проникновение железа в клетку при нейтральных значениях рН. Это проникновение происходит в результате активного транспорта хелатного железа и распада хелата после его переноса через плазматическую мембрану. Даже токсичный ион арсената может проникнуть в клетку путем активного транспорта, как в случае *Sacharomyces cerevisiae* [1].

Накопление металлов клетками микроорганизмов носит двухфазный характер. Начальная фаза не зависит от энергетического состояния клетки и обусловлена сорбцией металлов компонентами клеточной стенки, среди которых особенно активны как сорбенты хитин и хитозан. Последующая же, более медленная фаза – энергезависимое внутриклеточное накопление, происходящее с участием мембранных переносчиков ионов [2].

Микроорганизмы накапливают металлы по разным причинам. Известно, что микроорганизмы могут использовать металлы в качестве источников микроэлементов, энергии или акцепторов электронов. При окислении восстановленных соединений металлов, по крайней мере, некоторые микроорганизмы могут извлекать полезную энергию и восстанавливающую способность. При восстановлении окисленных соединений металлов ряд микробов осуществляет процесс, который является, по-видимому, своеобразной формой дыхания.

Так же предполагается, что накопление ионов тяжелых металлов микроорганизмами является способом их детоксикации, которое осуществляется путем специфического связывания металла с особыми полимерами, синтез которых может индуцироваться тяжелыми металлами, когда они выступают в роли стрессовых факторов. В результате окислительно-восстановительных процессов микроорганизмы переводят металлы из ионной формы в металлическую, образуя комплексы с органическими и неорганическими соединениями. Это отчасти напоминает механизм самозащиты, выработанный некоторыми морскими водорослями, которые умеют обезвреживать токсичные соединения мышьяка, связывая их с

промежуточными продуктами фотосинтеза и откладывая в клеточных мембранах в виде безвредных производных. Такое же положение и здесь: металл, отложенный в клеточной стенке в кристаллическом виде или в виде плохо растворимых соединений, оказывается безвредным для бактерии.

Способность микроорганизмов аккумулировать тяжелые металлы играет важную роль и в экологических взаимоотношениях микроорганизмов. Примером может служить обитающая в Атлантике, у берегов Флориды, цианобактерия *Gomphosphaeria aponia*. Для своей жизнедеятельности она нуждается в железе, которое запасается на «черный день» откладывая в виде гидроокисей на своей клеточной оболочке. Такая способность дает ей преимущество перед живущей в тех же водах нитчатой водорослью *Gymnodinium breve*, которая нуждается в железе, но накапливать его в достаточном количестве не может. Поэтому размножение цианобактерий приводит к массовой гибели их конкурентов.

Говоря о способности к накоплению тяжелых металлов нужно сказать что, микроорганизмы являются настоящими рекордсменами по извлечению металлов из окружающей среды. В природных условиях встречается большое количество микроорганизмов, которые адсорбируют от 30 до 40 % ионов тяжелых металлов на своей поверхности.

Так, бактерии рода *Zooglea*, например, штамм *Z. ramigera* способен аккумулировать до 170 мг ионов меди на 1 г сухой биомассы, ионов никеля – до 16,3 мг/г, ионов кадмия – до 16,3 мг/г и ионов хрома до 25 мг/г сухой биомассы [3].

Первую группу составляют металлы, аккумуляция и трансформация которых происходит на клеточной стенке – это железо, марганец, медь, свинец. Для таких элементов, как цинк, никель, серебро, показаны не только активная биосорбция, но и биогенная минерализация металлов (формирование агрегатов, литификация клеточной стенки).

В другую группу входят те металлы, аккумуляция которых происходит главным образом во внутриклеточном пространстве, к таким в первую очередь относятся ртуть и кобальт [4].

Микробная аккумуляция металлов является ключевым моментом в геохимической и биологической рециркуляции этих элементов. Положительные эффекты аккумуляции заключается в детоксикации металлов в окружающей среде с последующей выгодой для более чувствительных видов. Отрицательное воздействие заключается в передаче металлов на более высокие трофические уровни, что может привести к увеличению ядовитых эффектов этих элементов.

В настоящее время наибольший интерес по способности аккумулировать металлы вызывают бактерии рода *Bacillus*.

Интерес к микроорганизмам рода *Bacillus* в отношении их способности к накоплению ионов тяжелых металлов возник в связи с данными, которые были получены на кафедре микробиологии Университета Порт-Харкорт в Нигерии, где были проведены исследования по изучению аккумуляции бактерий

тяжелых металлов (кадмия, свинца, цинка и никеля) тремя видами бактерий (*Bacillus*, *Staphylococcus* и *Pseudomonas*), которые использовались в качестве сорбентов тяжелых металлов в речной воде с целью их очистки. По результатам исследований доля накопления тяжелых металлов микроорганизмами *B.subtilis*, *S. albus* и *P.aeruginosa* после 24 часов воздействия составила: никеля – до 68,6 %, 58,4 % и 28,3 %; свинца – до 94,5 %, 85,7 % и 90,8 %; цинка – до 91,6 %, 68,1 % и 52,9 %; кадмия – до 71,6 %, 72,1 % и 77,0 % соответственно. Таким образом, наилучшим сорбентом оказался род *Bacillus* [5].

Из исследований многих ученых известно, что способность грамположительных бактерий накапливать гораздо большее количество тяжелых металлов, чем грамотрицательные клетки, обусловлена наличием у первых тейхоевых кислот связанных с пептидгликаном, карбоксильные группы которых являются ключевыми компонентами для поглощения металлов.

Интересные данные были опубликованы группа канадских ученых под руководством Т. Бевериджа о бактерии, известной под названием сенной палочки (*Bacillus subtilis*). При выращивании этой бактерии в растворе хлористого золота на ее стенках образуются микрокристаллы чистого металлического золота. Выяснилось, что накопление металла происходит в два этапа. Сначала катионы золота, находящиеся в растворе, взаимодействуют с отрицательно заряженными группами макромолекул, входящих в состав клеточной стенки бактерии (с фосфатными группами фосфорилированных полисахаридов или с карбоксильными группами пептидогликана). При этом возникают своеобразные ядра кристаллизации, на которых затем быстро осаждается металл из раствора.

Кроме ионов золота, сенная палочка может извлекать из раствора ионы таких металлов как: кадмий, накапливая его в концентрации до 9,5 моль/г биомассы; цинк в концентрации до 5,0 моль/г; медь в концентрации до 6,4 моль/г биомассы, свинец в концентрации до 1,6 моль/г и еще около 30 металлов [6, 7, 8].

Способность накапливать ионы таких металлов как свинец, медь, кадмий и цинк обнаружена также у *B.sphaericus* и *B.cereus*. Так, *B.sphaericus* накапливает ионы свинца, меди, кадмия и цинка в концентрациях до 0,76, 5,6, 4,3 и 11,8 моль/г сухой биомассы соответственно, а *B.cereus* накапливает данные металлы в концентрации до 1,1, 5,9, 8,0 и 4,6 моль/г сухой биомассы соответственно [6, 7].

Bacillus coagulans сорбирует ионы свинца и хрома, и является альтернативой традиционной физике в удалении токсичных металлов из сточных вод и подземных источников. Данный штамм способен сокращать содержание ионов свинца и хрома на 65 и 48 % соответственно при изначальной общей концентрации 500 мг/л [9].

Также известна способность к удалению ионов свинца, хрома, марганца, цинка, меди и никеля из водного раствора для *Bacillus circulans*. Накопление максимального количества металлов в клетках *B.circulans* достигается, когда

бактерии в периодической культуре находились в конце лог и начале стационарной фазы роста. Максимальное накопление металлов происходит на 72 и 96 часы инкубации микроорганизма и составляет соответственно 65 %, 48 %, 70 %, 68 %, 65 % и 45 % соответственно [10, 11].

Особый интерес к изучению способности бактерий рода *Bacillus* к накоплению металлов так же вызван тем, что некоторые из них являются основой для создания пробиотических препаратов.

В отношении кишечного тракта человека виды *Bacillus* являются аллохтонными микроорганизмами, которые попадают туда в результате либо случайного поедания, либо осознанного употребления в пищу ферментированных продуктов питания.

Несмотря на то, что представители *Bacillus* в норме не колонизируют кишечный тракт у человека и не являются его обитателями, тем не менее, существует более двух десятков пробиотических препаратов, полученных на основе таких видов как *B.coagulans*, *B.subtilis*, *B.clausii*, *B.cereus*, *B.toyoi*, *B.licheniformis*, *B.mesentericus*, *B.polymyxa* и др. [12].

Пробиотики на основе микроорганизмов рода *Bacillus* оказывают при естественном способе введения положительное влияние на физиологические, биохимические, иммунные реакции организма хозяина за счет оптимизации и стабилизации функции микробиоценоза кишечника, оказывают противоаллергенное действие [13].

Важным является то, что входящие в состав пробиотических препаратов микроорганизмы рода *Bacillus*, являются самоэлеминирующимися антагонистами, они подавляют развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры, а также способны оказывать антитоксическое действие, проявляющимся в активном выведении токсичных веществ из организма, в частности тяжелых металлов [12].

В связи с этим изучение способности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотиков, к накоплению тяжелых металлов является важным с целью оценить эффективность применения пробиотиков на их основе при отравлении тяжелыми металлами. В дальнейшем это может послужить основой для совершенствования пробиотических препаратов для лечения и профилактики кишечных инфекций при одновременном удалении из организма токсичных веществ, в частности тяжелых металлов.

Исходя из выше изложенного перед нами была поставлена следующая цель: изучение способности бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотических препаратов, к накоплению тяжелых металлов в условиях *in vitro*.

Для изучения способности пробиотических препаратов в биоаккумуляции тяжелых металлов в работе использовались три пробиотических препарата: «Споробактерин жидкий», «Биоспорин» и «Бактисубтил». Основу выбранных препаратов составляют бактерии рода *Bacillus*.

В качестве регулирующих факторов в работе использовались соли тяжелых металлов: сульфат железа, сульфат цинка, нитрат свинца, сульфат марганца, семиводный сульфат кобальта и восьмиводный сульфат кадмия.

При выборе таких металлов как свинец, кадмий и кобальт исходили из того, что они являются наиболее распространенными (в случае свинца) и наиболее опасными (в случае всех металлов) загрязнителями окружающей среды. Выбор остальных был связан с тем, что они находились в одном ряду или в одном порядке со свинцом, кобальтом и кадмием, а также косвенно тем, что в повышенных концентрациях способны давать токсический эффект.

Для решения поставленной цели нами использовались следующие методы исследования: метод последовательных разведений был использован для определения минимальных подавляющих концентраций солей тяжелых металлов на рост бактерий рода *Bacillus*; фотоэлектроколориметрический метод использовался для определения оптической плотности бактериальной суспензии с целью дальнейшего построения кривой роста в периодической культуре [14]; атомно-абсорбционный метод для определения содержания исследуемых тяжелых металлов в биомассе [15].

В ходе исследования на определение жизнеспособности исследуемых штаммов в присутствии различных концентраций солей используемых металлов было установлено, что самым чувствительным штаммом из четырех является *B.cereus*. Также опыт показал, что наименее токсичным металлов из всех исследуемых является свинец, а наиболее токсичным является кадмий.

При определении влияния солей тяжелых металлов на динамику роста исследуемых штаммов было установлено, что их действие на время наступления и продолжительность фаз роста неоднозначно.

Так, присутствие ионов свинца и железа оказывает стимулирующее действие на рост всех исследуемых микроорганизмов, а присутствие ионов кобальта и кадмия угнетает их рост. Присутствие ионов цинка и марганца не оказывает влияния на динамику роста исследуемых штаммов, исключение составляет лишь *B.licheniformis* для которого цинк является стимулятором роста.

Изучение способности к накоплению ионов тяжелых металлов показало, что из данной группы солей тяжелых металлов всеми исследуемыми культурами только 3 металла интенсивно извлекаются из культуральной жидкости. Наиболее активно аккумулируется свинец, на втором месте находится цинк, на третьем месте железо. Исключение составляет *B.subtilis* 534 для которого на втором месте железо, а на третьем цинк. Три остальных металла практически не накапливаются данными микроорганизмами. Исключение составляют *B.cereus* в отношении ионов марганца, процент накопления составляет 23,97 и *B.licheniformis* в отношении ионов кобальта, процент накопления составляет 22,35.

Также из полученных данных следует, что лучшим биосорбентом ионов свинца и железа является штамм *B.subtilis* 534. Лучшие значения по накоплению ионов цинка отмечаются для штамма *B.subtilis* 3, по накоплению

марганца для *V.cereus*, а по накоплению кобальта для *V.licheniformis*. Значительных различий в значениях накопления ионов кадмия между исследуемыми штаммами не наблюдается.

Из определения способности к избирательному накоплению установлено, что все исследуемые микроорганизмы из используемых металлов избирательно аккумулируют свинец и практически не накапливают кобальт, кадмий и марганец.

В результате изучения влияния солей используемых металлов на антибиотикопродуктивность исследуемых штаммов было выяснено, что только один из анализируемых металлов (свинец) оказывает положительное влияние на антибиотикопродуктивности исследуемых микроорганизмов, ионы остальных металлов угнетают ее.

Таким образом, в результате проведенной работы можно сделать вывод, что бактерии рода *Bacillus* являются хорошими биосорбентами в отношении некоторых металлов и являются основой для совершенствования пробиотических препаратов, которые будут направлены не только на лечение и профилактику кишечных инфекций, но и на удаление из организма различных токсикантов, в частности тяжелых металлов.

Полученные в эксперименте данные используются в образовательном процессе при изучении дисциплины «Введение в биотехнологию» в разделах медицинской, ветеринарной и экологической биотехнологии. А также являются основой для проведения научных исследований студентами направления подготовки 06.03.01 и 06.04.01 Биология.

Список литературы

1. Кочубеев, В. К. Жизнь микробов в присутствии тяжелых металлов, мышьяка и сурьмы [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://microbes-extremal.ru>. – 29.11.09
2. Paules, I. T. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport protein / I. T. Paules, M. Saier // *Journal of Membrane Biology*. – 2004. – V. 156 – № 5. – P. 99-103.
3. Верховцева, Н. В. Образование бактериями магнетина и магнитотаксис / Н. В. Верховцева // *Успехи микробиологии*. – 2002. – Т. 25. – № 5. – С. 51-59.
4. Claudio, D. M. Copper accumulation by bacteria and transfer to scallop larvae / D. M. Claudio, R. Rojasa // *Marine Pollution Bulletin*. – 2006. – V. 52. – № 3. – P. 293-300.
5. Green-Ruiz, C. Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary / C. Green-Ruiz // *Bioresource Technology*. – 2006. – V. 97. – № 10. – P. 1907-1911.
6. Montes, D. Removal of mercury (II) from aqueous solutions of non-viable cells of *Bacillus* sp. / D. Montes // *Biotechnology*. – 2006. – V. 97. – № 7. – P. 1907-1911.

7. Waihung, Lo *Biosorption and desorption of copper (II) ions by Bacillus sp.* / Lo Waihung, N. Mei Lau, H. F. Peter // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2007. – V. 107. – № 3. – P. 581-591.
8. Costa, A. C. *Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by Bacillus sp., B.cereus, B.sphaericus and B.subtilis* / A. C. Costa, F. P. Duta // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2001. – P. 32. – № 1. – P. 159-175.
9. Quintelas, C. *Biosorption of Cr(VI) by a Bacillus coagulans biofilm supported on granular activated carbon (GAC)* / C. Quintelas, B. Fernandes, J. Castro // *Chemical Engineering Journal*. – 2008. – V. 136. – № 3. – P. 195-203.
10. Khanafari, A. *Removal of Lead and Chromium from Aqueous Solution by Bacillus circulans* / A. Khanafari, S. Eshghdoost, A. Mashinchian // *Iranian Journal of Environmental Health, Science and Engineering*. – 2008. V. 5. – № 3. – P. 195-200.
11. Yilmaz, E. *Ince Metal tolerance and biosorption capacity of Bacillus circulans strain EB1* / E. Ince Yilmaz // *Research in Microbiology*. – 2003. – V. 154. – № 6. – P. 409-415.
12. Похиленко, В. Д. *Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.cbsafety.ru/rus/saf*. – 6.12.09.
13. Смирнов, В. В. *Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты* / В. В. Смирнов // *Медицинская картотека ТГУ*. – 2001. – № 8. – С. 15-18.
14. Сизенцов А.Н. *Влияние тяжелых металлов на рост пробиотических штаммов E. coli M 17, E. faecium, L. acidophilus, L. Vulgaricus LB 51 и бактерий рода Bacillus в условиях in vitro* / А.Н. Сизенцов, Э.М. Нугаманова, С.А. Пешков // [Вестник Оренбургского государственного университета](#). 2011. № 12 (131). С. 358-360.
15. Сизенцов А.Н. *Аккумуляция тяжелых металлов пробиотическими препаратами на основе бактерий рода Bacillus в условиях in vitro* / А.Н. Сизенцов, Т.А. Гальченко, Ю.И. Мартынович // [Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана](#). 2013. № 216. С. 303-307.