

**Accumulative active association bacterial  
strains h-5-8 bacillus megatherium and h-5-2 bacillus cereus lead salts  
Omurgazieva Ch.<sup>1</sup>, Beishekeeva G.<sup>2</sup>, Kenenbaeva G.<sup>3</sup>**

**Аккумулятивная активность ассоциации штаммов бактерий h-5-8 bacillus  
megatherium и h-5-2 bacillus cereus соли свинца  
Омургазиева Ч. М.<sup>1</sup>, Бейшекеева Г. Ж.<sup>2</sup>, Кененбаева Г. М.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Омургазиева Чолпон Монолдоровна / Omurgazieva Cholpon - кандидат биологических наук, доцент,  
кафедра ботаники и физиологии растений, факультет биологии;

<sup>2</sup>Бейшекеева Гульмира Джумабаевна / Beishekeeva Gulmira - кандидат физико-математических наук, доцент,  
кафедра физики, факультет физики и электроники;

<sup>3</sup>Кененбаева Гулайым Мекшиовна / Kenenbaeva Gulayum - кандидат физико-математических наук, доцент,  
кафедра прикладной математики и информатики,

Кыргызский национальный университет имени Ж. Баласагына, г. Бишкек, Кыргызская Республика

**Аннотация:** для отбора особоустойчивых штаммов бактерий к повышенным концентрациям тяжелых металлов проводили опыты по выявлению степени аккумуляции соли свинца микроорганизмами в жидкой среде. Основное внимание мы уделяли двух выделенных штаммам H-5-8 *Bacillus megatherium* и H-5-2 *Bacillus cereus* как накопителям высоких концентраций и трансформаторам соли тяжелых металлов, в целях использования их в дальнейшем для биоремедиации окружающей среды от загрязнений.

**Abstract:** for the selection of bacterial strains osoboustoychivyh to elevated concentrations of heavy metals were carried out experiments to determine the extent of accumulation of micro-organisms lead salt in a liquid medium. We focus on two isolated strains H-5-8 *Bacillus megatherium* and H-5-2 *Bacillus cereus* as the storage of high concentrations of salts and heavy metals transformers, in order to use them in the future for the bioremediation of the environment from pollution.

**Ключевые слова:** штаммы бактерий, тяжелые металлы, высокие концентрации свинца, аккумулятивная активность.

**Keywords:** strains of bacteria, heavy metals, high levels of lead, accumulative activity.

Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами и радионуклидами – одна из важнейших экологических проблем конца XX – начала XXI веков. Как известно, многие тяжелые металлы представляют опасность для живых организмов благодаря своей токсичности и мутагенности, очистка окружающей среды от этих соединений в настоящее время становится все более актуальной.

Одним из наиболее перспективных способов признана биоремедиация – комплекс методов очистки почв, вод и атмосферы с использованием метаболического потенциала биологических объектов, в том числе почвенных микроорганизмов. Микробная деградация тяжелых металлов, радионуклидов и углеводородов составляет основу современной технологии биоремедиации загрязненных объектов окружающей среды. Преимущества биоремедиации как экономически выгодной, экологически безопасной и эстетически привлекательной биотехнологии восстановления загрязненных территорий показаны многими исследователями [1-13]. При этом целесообразно выявление эндемичных форм микроорганизмов для каждой техногенной провинции. Реализация такого метода очистки требует выделения специфических штаммов микроорганизмов, а также определение их редуционной активности в процессах биодеградации тяжелых металлов различного класса опасности.

С этой целью нами проводятся исследования способности почвенных микроорганизмов к биоаккумуляции и биодеградации тяжелых металлов (in vitro, лабораторное испытание).

Целью настоящего исследования явилось выявление аккумулялирующей 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* H5-8, *Bacillus cereus* H5-2 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-56 м, 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 Рb в 10, 25, 50 раз) 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<sup>0</sup>С. Через 2-3 суток подсчитывали количество колоний. Подсчет выросших колоний проводили по двум разведениям. Опыт проведен в 3-кратной повторности. Полученные результаты обрабатывали статистически (Б. М. Доспехов, 1979).

#### Результаты и обсуждение

Микроорганизмы устойчивые к высоким концентрациям тяжелых металлов, были выделены из образцов почв отобранных на территориях горнорудных промышленных комбинатов и урановых радиоактивных хвостохранилищах Северного Кыргызстана. Выделенные в нашей лаборатории штаммы бактерии были отселектированы по способности к росту при высоких концентрациях металлов ртути, свинца и кадмия превышающие ПДК в 1-25 раз.

Для отбора особоустойчивых штаммов бактерий к повышенным концентрациям тяжелых металлов проводили опыты по выявлению степени аккумуляции соли свинца микроорганизмами в жидкой среде. Основное внимание мы уделяли двум выделенным штаммам Н-5-8 *Bacillus megatherium* и Н-5-2 *Bacillus cereus* как накопителям высоких концентраций и трансформаторам 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 невредные 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 из 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 (6 ч) 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 12 ч достоверно не отличались, но более при высокой концентрации свинца (5мг/л) показатель ОП увеличивается, даже большей степени, чем в контроле (рис. 1.). Наибольшая скорость изменения роста клеток наблюдалась в 12 ч культивирования при концентрациях 1 и 2.5 мг/л, кроме 5 мг/л свинца. Это свидетельствует о неравенстве метаболического потенциала культивируемых клеток, ответственных за аккумуляцию металла, при всех концентрациях в течение этого срока культивирования. Следовательно, можно предположить, что количество метаболически активных клеток бактерий в среде культивирования не одинаково для всех вариантов опыта.

Рассматривая соотношение штаммов-деструкторов бактерий в паре *Bacillus megatherium* + *Bacillus cereus*, можно отметить, что в 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. megaterium</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. megaterium</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 с 24 часового периода численность штаммов Н5-2 при возрастающих концентрациях 1; 2,5; 5мг/л свинца увеличивается и составляет 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 6 ч до 12 ч культивирования рост штамма Н5-2 доминирует. Численность штаммов Н5-8 *Bacillus megaterium* в ассоциациях было наименьшем количестве, именно в присутствии высоком концентрации свинца в питательной среде первые 6 и 12 ч контакта. Вероятно, это связано с более интенсивным поглощением соли свинца клеткой штамма Н5-2, чем клетки штамма Н5-8 (табл. 1).

Таким образом, используемые штаммы Н5-8 *Bacillus megaterium*+Н5-2 *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.

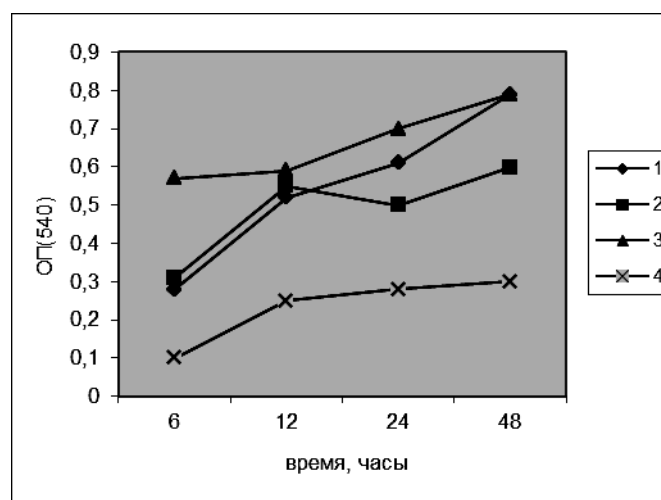


Рис. 1. Степень аккумулятивных способностей высоких концентраций свинца культурами *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* (Н5-8 + Н5-2). Обозначения: Концентрация соли свинца 1 - 1мг/л; 2 - 2,5 мг/л; 3 - 5 мг/л; 4 - контроль (без внесения металла)

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 Н5-8 *Bacillus megaterium*+ Н5-2 *Bacillus cereus* оптимальное для трансформации значение рН лежит в области 6,78-7,33, она равняется 1 мг/л Рв 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 аккумуляцию свинца ассоциациями культур *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* (Н-5-8+Н-5-2)

Концентрация соли свинца мг/л	Показатели рН среды через 6, 12, 24 и 48 ч. роста			
	6 ч.	12 ч.	24 ч.	48 ч.
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

**Выводы:** Таким образом, наибольшая скорость аккумуляции исследованных металлов биомассой ассоциациями штаммов наблюдается экспоненциальной и ранней стационарной фазах роста клеток.

### Литература

1. Методы общей микробиологии. Т. 1 / Под ред. Герхарда Ф. М.: Мир, 1983. 536 с.
2. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г.Звягинцева. М., 1980. 224 с.
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. 192 с.
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.
8. Gunther T., Dornberger U. and Fritsche W. (1996) Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33: 203–215.
9. Trindade P. V. O., Sobral L. G., Rizzo A. C. L., Leite S. G. F., Soriano A. U. Bioremediation of a weathered and recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study // *Chemosphere*, 2005. Vol. 58. P. 515-522.
10. Kechavarzi C. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated surface soil layers / Pettersson, K. Leeds-Harrison P., Ritchie L., Ledin S. // *Environ. Pollut.*, 2007. V. 145. № 1. P. 68-74.
11. Gerhardt P. Manual of methods for general bacteriology / P. Gerhardt et.al. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1981.
12. Gerhardt I., Liu Q., Lamas-Linares A. et al., 2011. Full-field implementation of a perfect eavesdropper on a quantum cryptography system. *Nat. Commun.* 2: 349.
13. Wang R., Li L. L., Cao Z. H., Zhao Q., Li M., Zhang L. Y., Hao Y. J., 2012. Molecular cloning and functional characterization of a novel apple MdCIPK6L gene reveals its involvement in multiple abiotic stress tolerance in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 79 (1-2). 123-135.
14. Karthikeyan V. J. Endothelial damage/dysfunction and hypertension in pregnancy / V. J. Karthikeyan, G. Y. Lip // *Front Biosci (Elite Ed)*, 2011. Vol. 3. P. 1100-1108.