

Биоаккумулирующая способность бактерий рода *Bacillus* в отношении ионов свинца в условиях *in vitro* и *in vivo*

А.Н. Сизенцов, к.б.н., О.В. Кван, к.б.н., А.Е. Бабушкина, аспирантка, ФГБОУ ВО Оренбургский ГУ; Е.Ю. Исайкина, к.б.н., ФГБОУ ВО Оренбургский ГАУ

Ежегодно возрастающий уровень техногенной нагрузки способствует повсеместному накоплению химических поллютантов. Одно из ведущих мест среди большого разнообразия веществ, загрязняющих окружающую среду, занимают тяжёлые металлы.

Высокий класс опасности загрязнения, обусловленный наличием в воде натрия, аммония, свинца, брома, бора, отмечен в 37 очагах. Опасный класс загрязнения по наличию в воде железа, марганца наблюдается в 8 областях. В остальных областях загрязнение выражается в повышении минерализации, жёсткости, содержании хлоридов, сульфатов и относится к умеренно опасному классу и категории веществ, класс опасности которых не определён [1].

Как элементы-следы некоторые тяжёлые металлы (медь, селен, цинк) необходимы для поддержания метаболизма человеческого организма. Однако при более высоких концентрациях они могут вести к губительным последствиям. Например, свинец, попадая в организм человека, вызывает свинцовую интоксикацию и в первую очередь нарушает деятельность нервной системы.

На сегодняшний день безоговорочно к числу токсичных относят только кадмий, свинец, ртуть и сурьму. Деятельность же значительной части тяжёлых металлов в биологических системах различна. Справедливо утверждение о том, что нет вредных веществ, есть вредные концентрации [2]. Роль ионов свинца как биогенного элемента не велика. Известно, что свинец участвует в обменных процессах костной ткани [3].

Интерес к микроорганизмам рода *Bacillus* в отношении их способности к накоплению ионов тяжёлых металлов возник в связи с данными, которые были получены на кафедре микробиологии Университета Порт-Харкорт в Нигерии. Там были проведены исследования по изучению аккумуляции бактерий тяжёлых металлов (кадмия, свинца, цинка и никеля) *Bacillus*, *Staphylococcus* и *Pseudomonas*, которые использовались в качестве сорбентов тяжёлых металлов в речной воде с целью её очистки. По результатам исследований, доля накопления тяжёлых металлов микроорганизмами *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus albus* и *Pseudomonas aeruginosa* после 24 час. воздействия составляла: 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. Наилучшим сорбентом оказался род *Bacillus* [6].

Способность к биоадсорбции тяжёлых металлов изучена для некоторых представителей рода *Bacillus*. Необходимо заметить, что входящие в состав пробиотических препаратов микроорганизмы рода *Bacillus* являются самоэлиминирующимися антагонистами. Они не только подавляют развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры, но и способны оказывать антиоксидантное действие, проявляющееся в активном выведении токсичных веществ из организма, в частности тяжёлых металлов [4, 5].

Исходя из вышеизложенного перед нами была поставлена цель — изучить биоаккумулирующую способность бактерий рода *Bacillus* в отношении ионов свинца в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы исследования. При проведении исследования были использованы три пробиотических препарата — Споробактерин жидкий, Бактисубтил и Биоспорин. Два препарата представлены монокультурами: Споробактерин жидкий, в котором основой является *Bacillus subtilis* 534, и Бактисубтил, основу которого составляет *Bacillus cereus* IP 5832. Биоспорин является бинарным препаратом, который имеет в своём составе *B. subtilis* 3 и *B. licheniformis*.

Исследования были выполнены на модели групп-аналогов лабораторных животных (крыс). В качестве токсиканта использовали соль тяжёлого металла — нитрат свинца ($Pb(NO_3)_2$). При выборе металла исходили из того, что он является наиболее опасным загрязнителем окружающей среды, в том числе и в Оренбургской области.

Исследование выполняли в два этапа. На первом изучали биоаккумулирующую способность бактерий рода *Bacillus* ионов свинца из питательных сред в эксперименте *in vitro*. На втором этапе исследование проводили в условиях экспериментально-биологической клиники (вивария) Оренбургского государственного университета на модели групп-аналогов лабораторных белых крыс линии Вистар. При распределении животных по группам придерживались общепринятых принципов подбора аналогов, сходных по возрасту (4-месячные крысы), физиологическому состоянию, которое оценивалось по двум параметрам — питанию и поведению, находившихся в пределах физиологической нормы животных, живой массе (200–250 г). Пол лабораторных животных не имел значения. Важное преимущество белых крыс, как лабораторных животных, заключается в том, что они довольно устойчивы к инфекционным заболеваниям и дают большой приплод. Вес белых крыс небольшой, разводить их и содержать в условиях вивария несложно, и это позволяет проводить над ними массовые опыты.

Нами было использовано 96 особей, из которых сформировали 8 групп животных — 5 контрольных и 3 опытных. Особи первой контрольной группы (K_1) получали основной рацион, второй (K_2) — основной рацион с добавлением сульфата свинца из расчёта 150 мг/кг веса тела, третьей (K_3) — основной рацион с добавлением Биоспорина, четвёртой (K_4) — основной рацион с добавлением Споробактерина, пятой (K_5) — основной рацион с добавлением Бактисубтила. Крысам опытных групп в основной рацион добавляли сульфат свинца и пробиотики Биоспорин (O_1), Споробактерин (O_2), Бактисубтил (O_3). Дозировки пробиотиков соответствовали аннотациям препаратов. Подопытные животные находились в одинаковых условиях содержания.

Соли тяжёлых металлов задавались в первые сутки эксперимента, а пробиотики — в 1–7-е сут. Взятие материала проводили с периодичностью в 7 сут. (фоновое исследование, 7-, 14- и 21-е сут.) путём убоя животных методом декапитации.

Для определения содержания ионов свинца в исследуемых образцах использовали атомно-абсорбционный метод. Данный метод основан на свойстве атомов химических элементов, образующихся при распылении зольных растворов в пламя ацетилен-воздух, поглощать свет определённой длины волны. В качестве атомно-абсорбционного спектрофотометра использовали прибор типа ААС-1 (ГДР) с набором спектральных ламп. Спектрофотометр атомно-абсорбционный представляет из себя автоматизированную систему, обеспечивающую пробоподачу и измерение атомной абсорбции. Произведён фирмой «Analytik Jena», г. Санкт-Петербург, Россия.

Результаты исследования. В ходе эксперимента *in vitro* было установлено, что концентрация соли свинца, расположенная в анализируемом диапазоне до концентрации 0,0025 М, оказывает бактерицидный эффект на данные штаммы, за исключением *B. cereus* IP 5832, для которого данный диапазон расположен до концентрации до 0,01 М.

Как известно, процесс накопления металлов микроорганизмами осуществляется в стационарной фазе роста. Процесс накопления связан с тем, что в данной фазе наблюдается истощение субстрата и накопление токсичных продуктов, что вынуждает бактерии к поиску других источников энергии и детоксикации среды обитания. В связи с этим следующим этапом нашей работы являлось определение фаз роста с целью выявления оптимального времени роста на периодической культуре, а также влияния солей тяжёлых металлов на динамику роста исследуемых микроорганизмов.

Определение оптимального времени роста на периодической культуре осуществляли путём культивирования исследуемых штаммов в периодической культуре на жидкой питательной среде и измерения оптической плотности каждые 3 часа, начиная с нулевого часа. Измерения проводили

до тех пор, пока не было получено не менее трёх приблизительно одинаковых значений оптической плотности, что свидетельствовало о наступлении стационарной фазы роста.

Полученные графики показали, что лаг-фаза у исследуемых штаммов длилась примерно 3 часа. Продолжительность экспоненциальной фазы роста для *B. cereus* IP 5832, *B. subtilis* 534 и *B. subtilis* 3 составляла 21 час культивирования, а для *B. licheniformis* — 24 часа. Наступление стационарной фазы для *B. cereus*, *B. subtilis* 534 и *B. subtilis* 3 наблюдалось через 24 часа культивирования, для *B. licheniformis* — через 27 часов.

В ходе проведённых исследований было установлено, что присутствие ионов свинца в питательной среде оказывает стимулирующее действие на рост всех исследуемых микроорганизмов.

При оценке биоаккумуляционной способности микроорганизмов в отношении ионов свинца было установлено, что наиболее активным из всех используемых культур был *B. subtilis* 534 (65,3%), на втором месте находился *B. subtilis* 3 (60,9%). Показатели накопления ионов свинца для штаммов *B. cereus* IP 5832 и *B. licheniformis* были ниже, чем у двух предыдущих штаммов, и составляли одинаковые значения (58,9%).

На втором этапе исследования нами была проанализирована способность бактерий рода *Bacillus* к биоаккумуляции и элиминации ионов свинца из организма экспериментальных животных. Для этого изучались следующие биологические материалы: костная и мышечная ткань, а также кожный покров.

В ходе проведённых исследований было установлено, что наибольшей аккумуляционной способностью по отношению к ионам свинца обладает костная ткань (табл.), причём у животных и контрольных, и опытных групп наблюдалось снижение концентрации ионов свинца на 14- и 21-е сут. опыта. Однако у крыс всех опытных групп отмечалась общая тенденция к снижению по сравнению с особями группы K_2 , которым задавали соли свинца. Так, на 7-е сут. количество ионов в шкуре экспериментальных животных опытных групп было ниже на 29,4% в группе O_1 (добавление свинца и Биоспорина), на 37,2% — в группе O_2 (добавление свинца и Споробактерина), на 20,0% — в группе O_3 (добавление свинца и Бактисубтила). В мышечной ткани крыс опытных групп разница составляла 27,1; 38,0 и 19,7%, в костной ткани — 25,2; 30,9 и 7,4% соответственно.

На 14- и 21-е сут. концентрация ионов свинца была ниже по отношению к контрольной в шкуре животных гр. O_1 на 40,3 и 56,5%, гр. O_2 — на 58,0 и 67,9%, гр. O_3 — на 33,7 и 47,6%; в мышечной ткани крыс гр. O_1 — на 36,4 и 41,2%, гр. O_2 — на 42,7 и 47,1%, гр. O_3 — на 31,8 и 35,8% соответственно, в костной ткани особей гр. O_1 — на 34,8 и 53,5%, гр. O_2 — на 47,1 и 61,5%, гр. O_3 — на 27,5 и 48,4% соответственно.

Определение концентрации ионов свинца в тканях лабораторных животных на различных сроках исследования, мг/кг ($X \pm Sx$)

Группа	Период исследования, сут.			
	1-е	через 7	через 14	через 21
Концентрация ионов металлов в шкуре				
K ₁	0,34±0,02	0,36±0,03	0,30±0,03	0,36±0,04
K ₂	0,37±0,01*	1,80±0,07	1,81±0,04*	1,68±0,03**
K ₃	0,39±0,04	0,37±0,05	0,33±0,04	0,43±0,02
K ₄	0,34±0,03	0,33±0,02	0,28±0,06	0,31±0,03
K ₅	0,40±0,01**	0,40±0,04	0,36±0,02	0,37±0,04
O ₁	0,50±0,02**	1,27±0,08	1,08±0,03**	0,73±0,04
O ₂	0,37±0,04	1,13±0,06	0,76±0,01*	0,54±0,03
O ₃	0,45±0,01*	1,44±0,03**	1,20±0,04	0,88±0,02*
Концентрация ионов металлов в мышечной ткани				
K ₁	0,85±0,02	0,99±0,04	0,94±0,04	0,95±0,02
K ₂	0,83±0,03	2,29±0,08	2,20±0,03***	1,87±0,04
K ₃	0,87±0,04	0,95±0,05	0,84±0,02**	0,89±0,04
K ₄	0,71±0,02	0,96±0,04	0,91±0,06	0,92±0,03*
K ₅	0,71±0,02	0,88±0,03	0,84±0,03	0,84±0,03
O ₁	0,81±0,06	1,67±0,07	1,40±0,04	1,10±0,04
O ₂	0,84±0,05	1,42±0,02**	1,26±0,05	0,99±0,04
O ₃	0,82±0,02**	1,84±0,04	1,50±0,03	1,20±0,02**
Концентрация ионов металлов в костной ткани				
K ₁	1,03±0,03	1,03±0,05	1,04±0,04	0,96±0,03
K ₂	1,04±0,06	2,98±0,07	2,76±0,08	2,73±0,05
K ₃	0,94±0,03	0,84±0,02	0,94±0,04*	0,91±0,02
K ₄	1,06±0,04	0,91±0,03*	0,86±0,05	0,95±0,02*
K ₅	0,94±0,04	0,87±0,02*	0,99±0,03**	0,93±0,03
O ₁	1,06±0,06	2,23±0,06	1,80±0,07	1,27±0,06
O ₂	1,04±0,05	2,06±0,04*	1,46±0,05	1,05±0,04
O ₃	0,93±0,03	2,76±0,08	2,00±0,06	1,41±0,06

Примечание: * – P<0,5; ** – P<0,05; *** – P<0,005

Таким образом, наиболее высокой аккумулярующей способностью обладает *B. subtilis* 534, входящий в состав препарата Споробактерин, который снижает концентрацию ионов свинца в среднем на 58,9% (гр. O₂), аналогичный показатель в группах O₁ и O₃ составил 50,7 и 44,5% соответственно.

Вывод. В результате проведённых исследований было установлено, что наиболее активно свинец накапливается в костной ткани. Максимум выведения свинца из организма лабораторных животных при применении пробиотических препаратов зарегистрирован на 7-е сут. эксперимента. Затем происходит незначительное снижение количества выведенного свинца. При этом наиболее эффективным оказался пробиотический препарат Споробактерин, а менее эффективным – Бактисубтил.

Литература

1. Государственный доклад о состоянии и об охране окружающей среды Оренбургской области в 2010 году / гл. ред. Ю.И. Калужный, А.Б. Сагитов. Оренбург, 2011. С. 53–54.
2. Будников Г.К. Тяжёлые металлы в экологическом мониторинге водных систем // Соровский образовательный журнал. 2000. № 5. С. 23–29.
3. Милаева Е.Р. Металлы в бимолекулярной химии [Электронный ресурс]. URL: <http://www.chem.msu.ru> (дата обращения 05.12.09).
4. Сизенцов А.Н., Карпова Г.В., Исайкина Е.Ю. Изучение биоаккумуляционной способности бактерий рода *Bacillus* в отношении ионов кадмия в условиях *in vitro* и *in vivo* // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. 2016. № 1. С. 172–173.
5. Сизенцов А.Н. Эффективность применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при лечении экспериментальной интоксикации медью / А.Н. Сизенцов, Е.Ю. Исайкина, О.В. Кван, Е.А. Сизова // Научное обозрение. Биологические науки. 2015. № 1. С. 145–146.
6. Green-Ruiz C. Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. from a tropical estuary // Bioresource Technology. 2006. V. 97. № 10. P. 1907–1911.