

ПРИОРИТЕТНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ СТУДЕНТОВ В ЗОНАХ С ПОВЫШЕННОЙ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКОЙ

**Морозова Н.В., Коробова И.В, Мокина Е.С., Русяева М.Л.,
Королькова Д.С., Кабанова Л.Р., Поляков Л.П.**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Оренбургский государственный университет»**

Оренбургская область, обладая крупным многоотраслевым промышленным и топливно-энергетическим комплексом, занимает одно из первых мест среди регионов России по загрязнению окружающей природной среды. Мониторинг земель поселений производится с 1996 года в городах Оренбург, Бузулук, Орск. Начиная с 2001 года, работы проводятся также в городах Кувандык и Медногорск. За прошедший период работ в исследуемых городах области выявлена важная особенность – во всех городах по всем участкам наблюдались превышения концентраций тяжелых металлов, элементарный состав при этом варьировал в пространстве и времени. Это свидетельствует о большой зависимости содержания тяжелых металлов от различных факторов, обуславливающих попадание и выведение их из почв. В городах Предуралья – городах Оренбург и Бузулук и низкогорья Урала – городах Орск, Медногорск и Кувандык – доминируют различные элементы – загрязнители. Для города Оренбурга главный элемент-загрязнитель – свинец, затем цинк, никель и кадмий. Загрязнение города Бузулука также характеризуется доминированием свинца (рисунок 1). В 2009 году максимальное превышение составило 12,1 ПДК. В городе Кувандык загрязнение обусловлено повышенным содержанием свинца, никеля и кадмия (рисунок 1), при этом максимальное превышение установлено для подвижных форм свинца в 2,7 ПДК.

Соединения свинца известны своей высокой токсичностью [1, 2]. Индивидуальная восприимчивость к отравлению свинцом сильно различается, и одни и те же дозы свинца могут давать больший или меньший эффект для разных людей. Характерными симптомами отравления являются бледность лица, потеря внимания, плохой сон, склонность к частой смене настроения, повышенная раздражительность, агрессивность, быстрая утомляемость, а также металлический привкус во рту. Характерны расстройства пищеварения, потеря аппетита, острые боли в животе со спазмами абдоминальных мускулов («свинцовые колики»). Обычным является изменение состава крови – от ретикулоцитоза, анизоцитоза и микроцитоза до свинцовой анемии. На более поздних стадиях наблюдаются головная боль, головокружение, потеря ориентации и проблемы со зрением. Специфическое почернение («свинцовая линия») может появиться у основания десен. Возможен паралич («свинцовые судороги»), обычно затрагивающий в первую очередь пальцы и кисти рук. У детей может быть поврежден головной мозг, что может привести к слепоте или глухоте или даже ле-

тальному исходу. Повреждения коры больших полушарий возможны и у взрослых после получения больших доз свинца.

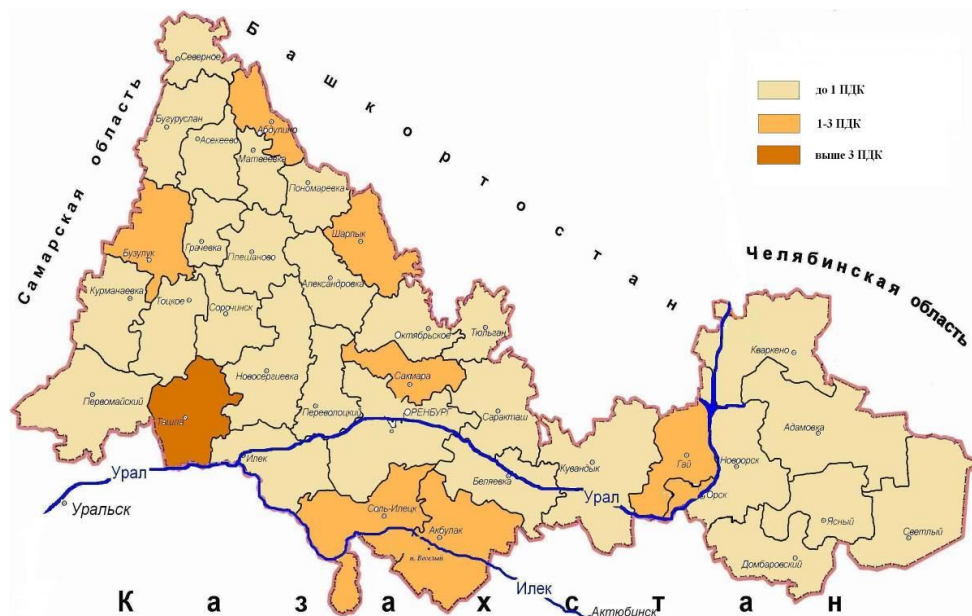


Рисунок 1 - Картографирование территории Оренбургской области по степени загрязнения питьевой воды свинцом

Свинец поступает в организм из загрязненного воздуха, почвы, пыли в жилых помещениях и на улице, продуктов питания, а также при недостаточном соблюдении правил личной гигиены. Оценка риска отравления свинцом, как правило, проводится на основании определения концентрации свинца в крови. Концентрация свинца в крови ниже 10 мкг/дл в России и в мире считается безопасной для здоровья ребенка, хотя даже поступление в организм небольших доз свинца в зависимости от продолжительности и интенсивности может сказаться на здоровье [3].

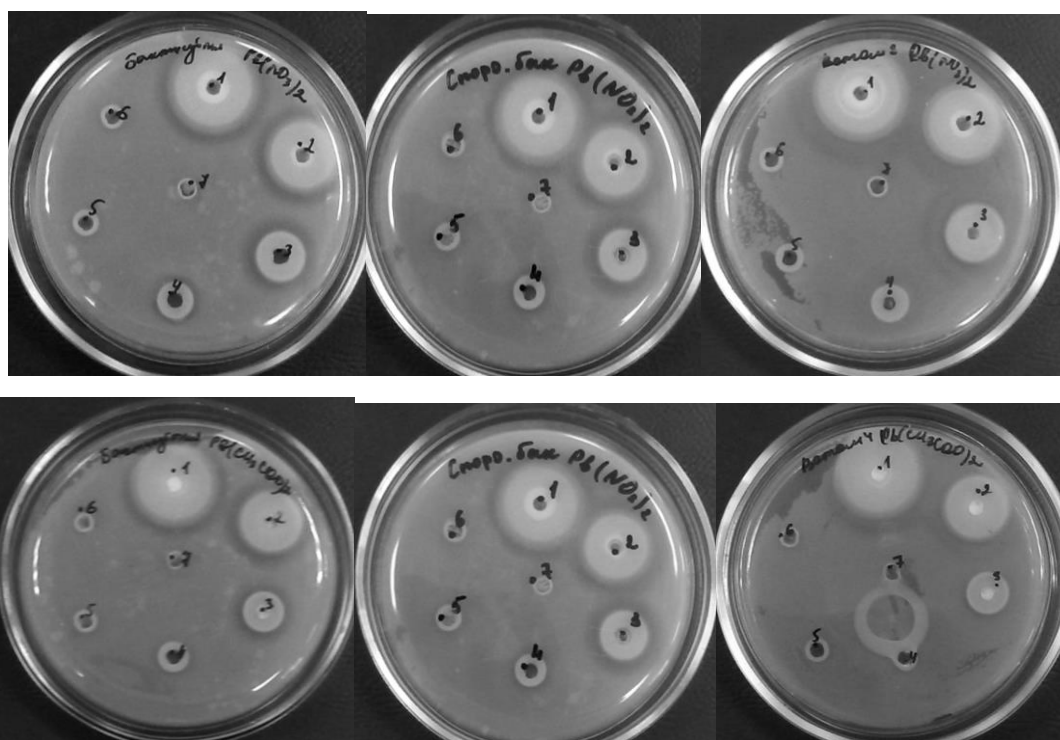
Известно, что способность концентрировать металлы, в том числе и тяжелые, очень широко распространена в природе среди различных организмов. Настоящими «рекордсменами» по извлечению тяжелых металлов из окружающей среды являются микроорганизмы. Накоплено множество данных, позволяющих считать, что микрофлора желудочно-кишечного тракта играет важную роль детоксикации отдельных эндогенных и экзогенных веществ, в регуляции сорбции и экскреции таких элементов, как Na, K, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu, Mn, Mo и другие [4].

Большой интерес вызывает изучение данной способности среди микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов. Пробиотики обладают такими свойствами как ярко выраженная антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, высокая ферментативная активность, иммуностимулирующее действие. Но помимо этого важным свойством является антитоксическое действие, проявляющееся в накоплении и активном выведении тяжелых металлов из организма. Из этого

следует, что оценка эффективности применения пробиотиков при отравлении тяжелыми металлами является актуальным вопросом исследования [5].

Выше изложенное является критерием для изучения влияния свинца на рост микроорганизмов (рисунок 2).

Для реализации поставленной задачи в качестве объектов исследования нами были использованы 6 пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*: Споробактерин (*B. subtilis* 534), Бактисубтил (*B. cereus* IP 5832), Ветом 1.1 (*B. subtilis* 10641), Ветом 2 (*B. licheniformis* 7038), Ветом 3 (*B. amyloliquefaciens* 10642), Ветом 4 (*B. amyloliquefaciens* 10643). В качестве регулирующих факторов в работе использовались различные соли (нитраты, хлориды, ацетаты и оксиды) свинца.



1

2

3

1 – *B. cereus* IP 5832, 2 – *B. subtilis* 534, 3 – *B. amyloliquefaciens* 10643

Рисунок 2 – Влияние $Pb(NO_3)_2$ и $Pb(CH_3COO)_2$ на рост исследуемых микроорганизмов

Для выполнения данного этапа работы использовали метод агаровых лунок, выбор данного метода объясняется тем, что он позволяет не только визуально но и качественно оценить влияние тяжелых металлов на рост исследуемых микроорганизмов.

Методика выполнения заключается в следующем: изучаемый микроорганизм высевали сплошным «газоном» на поверхность агаровой пластинки (1,5 % МПА) в чашке Петри. После этого, пробочным сверлом (диаметр 5 мм) вырезали агаровые блочки, при этом на одной чашке Петри можно разместить до 7 агаровых лунок в которые в последующем вносили исследуемые концентрации веществ для оценки их ингибирующего и субингибирующего эффекта. Чашки

помещали в термостат на 24 часа при температуре 37 °С (благоприятной для развития исследуемого тест-организма). После инкубирования производили визуальную оценку действия исследуемого металла на рост популяции. Отсутствие зон подавления роста свидетельствовало о отсутствии влияния либо соли в целом (как правило данное явление отмечалось у солей с низки уровнем диссоциации), либо определенной концентрации (именно такие концентрации в дальнейшем использовались в качестве рабочих). В том случае если исследуемое вещество обладало высокой активностью в отношении исследуемого микроорганизма регистрировали значительные зоны подавления роста вокруг лунки.

Было установлено, что высокие концентрации свинца не оказывают бактерицидного эффекта на пробиотические штаммы, однако основным отличием является то, что данный элемент в отличии от кадмия практически не влияет на рост, но при этом отмечается изменение не только макроморфологических характеристик культуры клеток вблизи лунки, но также изменяются и морфологические характеристики исследуемых микроорганизмов (таблица 1).

Таблица 1 – Оценка влияния солей свинца на рост бактерий рода *Bacillus*

	<i>B. licheniformis</i> 7048				
	1 Моль	0,5 Моль	0,25 Моль	0,125 Моль	0,063 Моль
Pb(NO ₃) ₂	31,0±1,00	27,3±0,33	20,3±0,67	15,7±0,33	7,0±1,45
Pb(CH ₃ COO) ₂	32,0±0,00	27,0±1,00	20,7±1,67	12,3±0,33	9,1±1,88
<i>B. cereus</i> 5832					
Pb(NO ₃) ₂	30,3±0,33	25,3±0,67	19,3±0,33	10,7±1,20	7,3±0,33
Pb(CH ₃ COO) ₂	32,3±0,33	22,3±1,45	14,0±1,53	9,7±0,33	7,7±0,33
<i>B. subtilis</i> 534					
Pb(NO ₃) ₂	30,0±0,00	26,0±0,58	17,0±0,58	9,7±0,33	7,0±0,58
Pb(CH ₃ COO) ₂	32,0±0,58	25,3±0,33	13,3±0,88	10,3±0,33	6,7±0,33
<i>B. amyloliquefaciens</i> 10642					
Pb(NO ₃) ₂	36,0±0,58	27,7±1,20	24,7±2,19	10,7±0,33	7,3±0,33
Pb(CH ₃ COO) ₂	38,7±0,33	30,3±0,88	23,3±0,88	10,3±0,33	7,0±0,58
<i>B. subtilis</i> 10641					
Pb(NO ₃) ₂	23,7±0,33	18,7±0,33	14,7±0,33	9,7±0,33	6,7±0,33
Pb(CH ₃ COO) ₂	23,3±0,33	19,3±0,33	13,0±0,58	9,7±0,33	6,7±0,33
<i>B. amyloliquefaciens</i> 10643					
Pb(NO ₃) ₂	37,3±1,45	30,3±0,88	20,0±2,89	10,7±0,33	6,7±0,33
Pb(CH ₃ COO) ₂	31,7±1,67	22,3±0,33	13,3±0,33	8,7±0,88	5,7±0,67

Полученные данные свидетельствуют о токсическом влиянии всех исследуемых солей свинца не зависимо от анионного компонента в отношении изучаемых пробиотических штаммов, что собственно подтверждает то что свинец по природе является токсичным металлом.

Наиболее выраженным токсическим эффектом в отношении исследуемых микроорганизмов обладает ацетат свинца. Однако значения зон подавления роста, которых, незначительно превысили значения нитрата свинца для изучаемых пробиотических штаммов

Далее было установлено, что в отношении нитрат свинца наименее резистентными оказались штаммы *B. amyloliquefaciens* 10643, а по отношению к ацетату свинца *B. amyloliquefaciens* 10642, соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о токсическом влиянии всех исследуемых солей свинца не зависимо от анионного компонента в отношении изучаемых пробиотических штаммов, что собственно подтверждает то что свинец по природе является токсичным металлом.

Наиболее выраженным токсическим эффектом в отношении исследуемых микроорганизмов обладает ацетат свинца. Однако значения зон подавления роста, которых, незначительно превысили значения нитрата свинца для изучаемых пробиотических штаммов.

Далее было установлено, что в отношении нитрат свинца наименее резистентными оказались штаммы *B. amyloliquefaciens* 10643, а по отношению к ацетату свинца *B. amyloliquefaciens* 10642, соответственно.

При изучении влияния катионов свинца с различными анионными компонентами было установлено, что в отношении всех исследуемых штаммов катионы свинца оказывают выраженное стимулирующее действие на рост (рисунок 3).

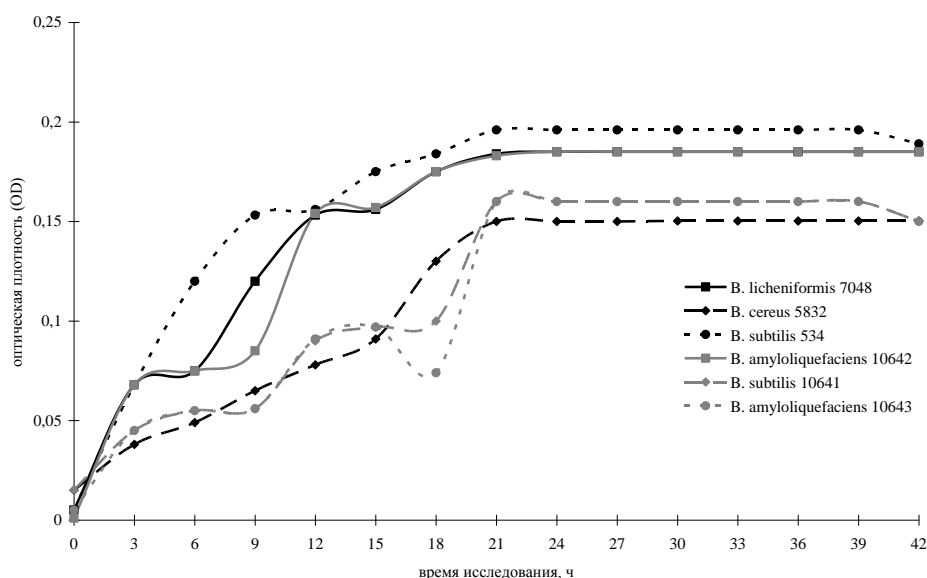


Рисунок 3 – Влияние $Pb(NO_3)_2$ на динамику роста исследуемых микроорганизмов

При этом максимальные значения роста популяции отмечаются у *B. subtilis* 534, а минимальные у *B. cereus* IP 5832, однако следует отметить, что время наступления стационарной фазы практически у всех микроорганизмов приходится на 21 час роста в периодической культуре.

Оценивая аккумуляционную способность микроорганизмами рода *Bacillus* катионов свинца из питательных субстратов (рисунок 4, 5, 6), можно констатировать, что данный элемент имеет наиболее высокие сорбционные характеристики, так как процент его накопления составляет более 50 %, при этом наиболее активно свинец аккумулирует *B. subtilis* 534 на долю которого приходится 66,3 %, в то время как минимальные значения были зарегистрированы для штамма *B. amyloliquefaciens* 10642 – 53,2 % соответственно.

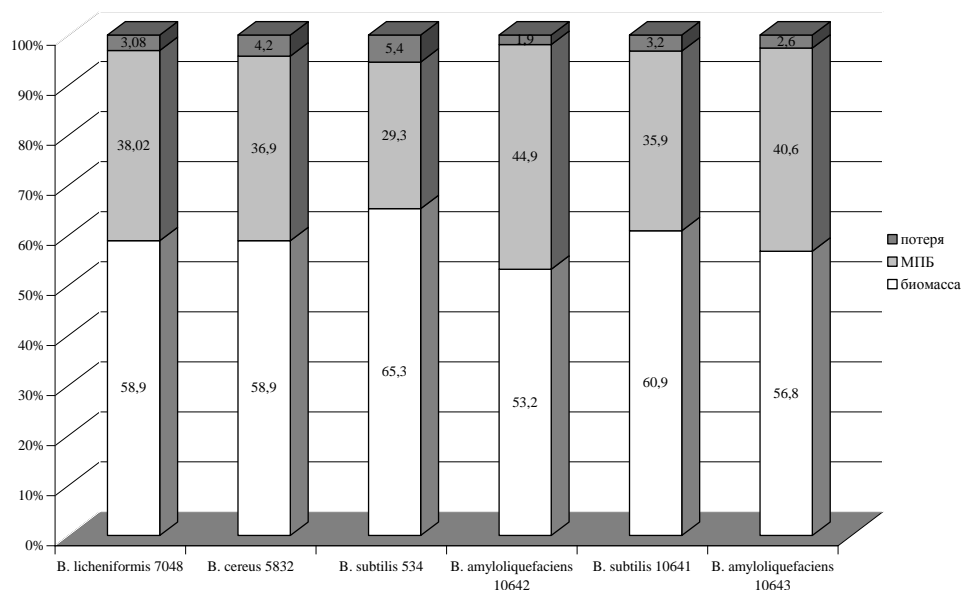


Рисунок 4 – Оценка биоаккумуляционной способности бактериями рода *Bacillus* катионов свинца из субстрата с добавлением $Pb(NO_3)_2$

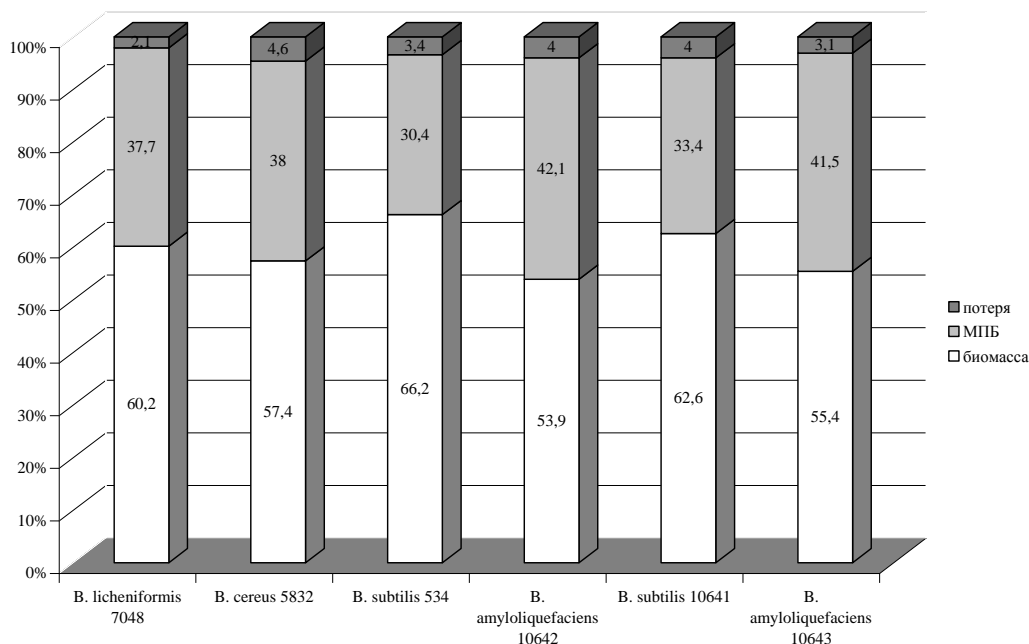


Рисунок 5 – Оценка биоаккумулирующей способности бактериями рода *Bacillus* катионов свинца из субстрата с добавлением $Pb(CH_3COO)_2$

Данное исследование на наш взгляд подтверждает не только данные полученные в ходе оценки влияния катионов свинца на рост микроорганизмов методом агаровых лунок, но и в ходе изучения влияния данного элемента на фазы роста, где для всех исследуемых штаммов данный элемент выступил в качестве «стимулятора роста».

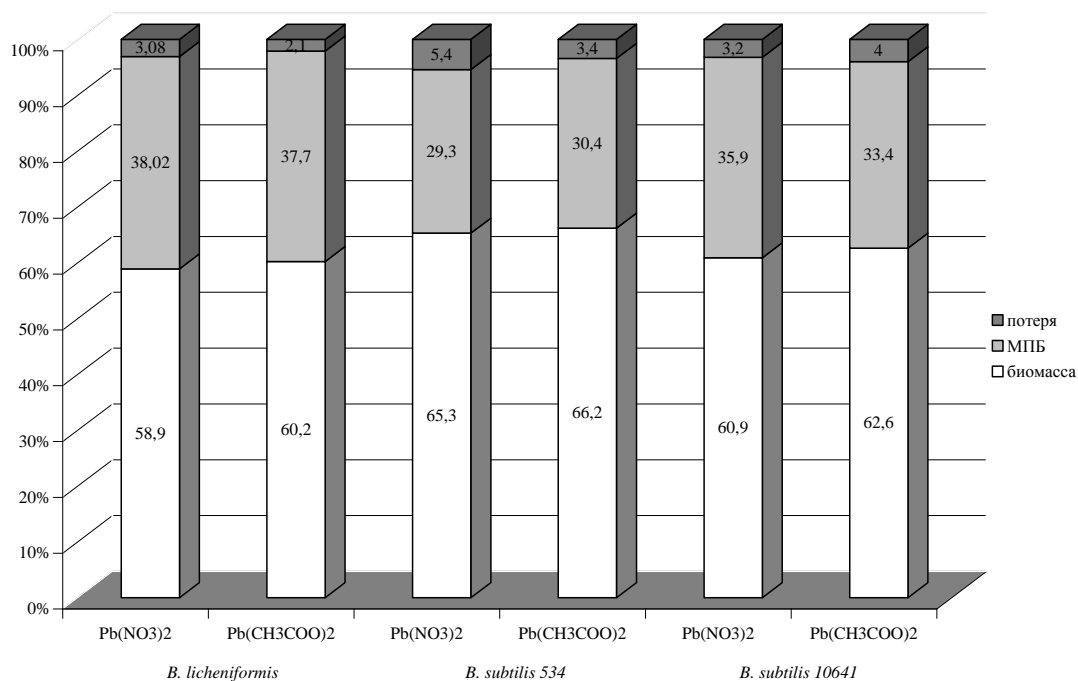


Рисунок 6 – Оценка биоаккумулирующей способности бактериями рода *Bacillus* катионов свинца из субстрата с добавлением $Pb(NO_3)_2$ и $Pb(CH_3COO)_2$

Сравнивая данные аккумуляции свинца (рисунок б) в зависимости от анионного компонента можно отметить, что как и в случае с изучением влияния других химических элементов прямая зависимость между значения накопления в присутствии различных солей свинца не выявлена, и расхождения значений находились в пределах незначительной погрешности.

Данные исследования проводились студентами при поддержке областного гранта № 28 «Изучение влияния анионного компонента солей тяжелых металлов на рост пробиотических штаммов микроорганизмов и их биоаккумулирующую способность».

Полученные в ходе экспериментов данные являются основой для изучения эффективности применения пробиотических препаратов при интоксикации свинцом и снижении его концентрации в окружающей среде.

Список литературы

1. Sizentsov, A. *The use of probiotic preparations on basis of bacteria of a genus Bacillus during intoxication of lead and zinc* / A. Sizentsov, O. Kvan, A. Vishnyakov, A. Babushkina, E. Drozdova // *Life Science Journal* 2014; 11 (10). <http://www.lifesciencesite.com>

2. Сальникова, Е.В. Оценка загрязненности Оренбургской области свинцом и кадмием и перспективы использования пробиотиков для снижения ксенобиотической нагрузки / Е.В. Сальникова, А.Н. Сизенцов // [Современные проблемы науки и образования](#). 2016 № 5

3. Сизенцов, А.Н. Применение пробиотических препаратов при интоксикации свинцом / Сизенцов А.Н. // [Вестник ветеринарии](#). 2012. Т. 63. № 4. С. 147-148.

4. Чубуков, В. Ф. Микробы запасают металлы / В.Ф. Чубуков // *Химия и Жизнь*. – 1982. – № 11. – С. 53-55.

5. Сизенцов, А.Н. Изучение биоаккумулирующей способности бактерий рода *Bacillus* в отношении ионов свинца в условиях *in vitro* и *in vivo* / А.Н. Сизенцов, Е.Ю. Исайкина, О.В. Кван, А.Е. Бабушкина // [Известия Оренбургского государственного аграрного университета](#). 2016. №. 2 (58) С. 186-188