

УДК 579.864.1:615.331

С.О. Старовойтова, Л.Б. Орябінська,
В.Ю. Горчаков**МОЛОЧНОКИСЛІ БАКТЕРІЇ – БІОСОРБЕНТИ
ВАЖКИХ МЕТАЛІВ****Вступ**

Сьогодні важкі метали посідають одне з перших місць серед техногенних забруднювачів навколишнього середовища. Потужним джерелами забруднення всіх компонентів довкілля є крупні індустріально розвинені агломерації [1–5]. Європейське економічне співтовариство передбачає поділ металів за їх токсичністю на дві групи:

- “чорний список” – найтоксичніші метали і речовини (кадмій та його сполуки);
- “сірий список” – цинк, мідь, кобальт, нікель, хром, свинець, а також їх сполуки [5].

Несприятливий вплив різноманітних важких металів призводить до збільшення рівня смертності, захворюваності, погіршення фізичного розвитку та подальшого поширення преморбідних станів [4, 6, 7].

У багатьох публікаціях експериментально доведено, що бактерії, дріжджі, гриби і водорості здатні виводити важкі метали і радіонукліди з водних розчинів та ґрунтів у достатньо великих кількостях [8–13].

Здатність мікроорганізмів сорбувати метали залежить від характеристик їх клітинної стінки. Карбоксильна, гідроксильна, сульфатна, фосфатна та амінна функціональні групи визначають заряд клітинної стінки. Ці негативно заряджені групи залежно від умов культивування по-різному дисоційовані та визначають поведінку клітинної стінки як катіоніту. Про природу сорбції металів клітинними стінками мікроорганізмів існують суперечливі свідчення [14, 15]. Деякі автори наполягають, що сорбція металів здійснюється певними ділянками ліпополісахаридів клітинної стінки або специфічними хелатними сполуками сидерофорами. Інші ж стверджують, що сорбція металів визначається наявністю білків у клітинній стінці або поліфосфатами [16, 17].

У зв'язку з несприятливими екологічними умовами, що склалися на території України після Чорнобильської трагедії, і внаслідок техногенної діяльності, зросла потреба в препаратах, які здатні виводити з організму людини важкі

метали та радіонукліди, що накопичуються. Такими препаратами можуть стати пробіотики на основі бактерій – біосорбентів важких металів, які поряд із терапевтичними властивостями проявлятимуть і здатність виводити важкі метали з організму.

Постановка задачі

Мета даної статті – дослідження мікроелементного складу молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* та розробленого композиційного препарату на їх основі, а також їх здатності сорбувати важкі метали з розчинів.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження було вибрано бактерії роду *Lactobacillus* з музею культур кафедри промислової біотехнології НТУУ “КПІ”: *L. plantarum* (лактобактерин) – штам порівняння, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 ВКПМ-В-5788, *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, *L. rhamnosus* LB3 ІМВ В-7038, *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* V® і розроблений на їх основі композиційний препарат, в якому міститься п'ять штамів-симбіонтів у співвідношенні 1:2:1:1:1.

Дослідження мікроелементного складу лактобактерій проводили рентгенофлуоресцентним методом на портативному енергодисперсійному рентгенофлуоресцентному спектрометрі “Elvax” виробництва підприємства “Елватех” (Україна). Цей спектрометр дозволяє здійснювати кількісний аналіз різноманітних зразків: твердих, порошкоподібних, а також рідких, осаджених на поверхні або на фільтрі. Діапазон елементів, які визначаються, сягає від сірки до урану. В цей діапазон потрапляють основні есенціальні елементи (калій, кальцій, цинк, селен, мідь, залізо, марганець та ін.), а також елементи, що чинять шкідливий вплив на організм хазяїна (свинець, кадмій, миш'як, стронцій, сурма, ртуть та інші важкі метали). Границя виявлення елементів у зразку – 0,1–1 мкг/г.

Для проведення рентгенофлуоресцентного аналізу дводобові культури лактобактерій тричі відмивали від поживного середовища центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хв. Отриману біомасу висушували і таблетували, після чого визначали мікроелементний склад. Отримані зразки використовували як контроль при дослідженні здатності лактобактерій адсорбувати важкі метали.

Дослідження адсорбції важких металів лактобактеріями аналогічно проводили методом рентгенофлуоресцентного аналізу. В досліді використовували живі і мертві клітини лактобактерій, які отримували кип'ятінням живих клітин.

При виборі концентрації лактобактерій виходили з разової дози комерційного препарату "лактобактерин" – препарату порівняння та умов його застосування. Рекомендованою разовою дозою лактобактерину для дорослих було 10 доз (одна доза дорівнює $2 \cdot 10^9$ кл/мл), що відповідає $2 \cdot 10^{10}$ кл/мл. Препарат розчиняли у воді з розрахунку 1 доза на 5мл та приймали натщесерце, запиваючи склянкою молока [18]. Виходячи з того, що склянка молока – 200мл та в шлунку натщесерце міститься 20–30мл рідкого вмісту [19], для досліді брали концентрацію лактобактерій $2 \cdot 10^{10}$ в 250мл розчину відповідного металу.

У досліді використовували розчини важких металів у концентраціях, які відповідають гранично допустимій концентрації (ГДК) металу у воді, подвійній ГДК тощо (табл. 1).

Таблиця 1. Гранично допустимі концентрації важких металів у питній воді [20, 21]

| Найменування металу | Норматив, мг/л |
|---------------------|----------------|
| Кадмій | 0,003 |
| Свинець | 0,03 |
| Мідь | 2,0 |

Клітини лактобактерій культивували в розчинах з відповідними металами при 37°C протягом 2, 4, 8 і 24 год для встановлення оптимального часу вилучення максимальної кількості іонів металів з розчину клітинами лактобактерій. Час інкубації 24 год було вибрано в припущенні, що досліджені лактобактерії мають транзиторийний ефект і виходять із макроорганізму.

По закінченні інкубації біомасу вилучали центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 30 хв та проводили рентгенофлуоресцентний аналіз.

Результати та їх обговорення

Багато хімічних елементів (так званих мікроелементів) є складовою частиною фізіологічної системи регуляції життєвих функцій організму людини. Мікроелементи в певних дозах необхідні для функціонування організму, однак їх надлишок викликає різноманітні захворювання або ураження всього організму. Залежно від активності хімічних елементів і чутливості організму вирізняють есенціальні і токсичні діапазони,

а за характером впливу на організм людини – есенціальні, умовно есенціальні, токсичні та потенційно токсичні хімічні елементи.

До есенціальних належать життєво необхідні елементи, без яких організм не може функціонувати. Їх роль полягає в пригніченні або активації дії низки ферментів. До групи есенціальних елементів належать хром, марганець, залізо, кобальт, мідь, цинк, селен, молібден і йод. Умовно есенціальними є такі елементи, дефіцит яких у добовому раціоні спричиняє негативні зміни в стані здоров'я. Це – літій, бор, фтор, кремній, ванадій, нікель, миш'як і бром [22]. Добову потребу організму людини в елементах наведено в табл. 2.

Таблиця 2. Добова потреба організму людини в макрота мікроелементах

| Елементи | Добова потреба, г | Елементи | Добова потреба, мг |
|--|-------------------|--|--------------------|
| Макроелементи (добові потреби > 100 мг) | | Мікроелементи (добові потреби < 100 мг) | |
| Na | 1,1–1,3 | Fe | 10 |
| K | 1,9–5,6 | Zn | 15 |
| Ca | 0,8 | Mn | 2–5 |
| Mg | 0,35 | Cu | 2–3 |
| Cl | 1,7–5,1 | Co | Следи |
| P | 0,8 | Cr | 0,05–0,2 |
| S | 0,2 | Mo | 0,15–0,5 |
| | | Se | 0,05–0,2 |
| | | F | 0,15 |

Оскільки молочнокислі бактерії як пробіотики застосовуються *per os*, то вони можуть виступати екзогенним джерелом макро- і мікроелементів для організму людини, тому цікаво було встановити мікроелементний склад досліджених штамів та композиції лактобактерій – перспективної основи нового пробіотичного препарату з унікальною властивістю виведення з організму людини важких металів (табл. 3).

Дослідження мікроелементного складу лактобактерій показало, що різні види і штами бактерій роду *Lactobacillus* відрізняються між собою за кількісним вмістом елементів у клітинах, але їх якісний склад повністю збігається. Порівняно великий вміст сірки і калію в клітинах лактобактерій може пояснюватися їх сорбцією з поживного середовища в процесі культивування бактерій. Клітини досліджених штамів лактобактерій містили в своєму складі 24 елементи, більшу частину яких становили саме есенціальні елементи.

Таблиця 3. Мікроелементний склад молочнокислих бактерій представників роду *Lactobacillus* і їх композиції

| Мікроелемент | Штами лактобактерій | | | | | | |
|--------------|--|-------------------------|---|--|------------------------|-----------------------|-----------------------------|
| | <i>L. plantarum</i> лактобактерин | <i>L. rhamnosus</i> LB3 | <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> LB86 | <i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> DSM20074 | <i>L. rhamnosus</i> V® | <i>L. acidophilus</i> | Композиція лактобактерій |
| | Концентрація елемента, 10^{-2} мкг/2 · 10 ¹⁰ клітин | | | | | | |
| Ca | 3,691 ± 2,803 | 1,019 ± 0,524 | 3,092 ± 1,488 | 1,248 ± 0,585 | 3,620 ± 1,269 | 0,672 ± 0,430 | 0,577 ± 0,397 |
| Mn | 1,711 ± 0,463 | 1,510 ± 0,211 | 1,332 ± 0,437 | 1,311 ± 0,181 | 1,960 ± 0,243 | 1,939 ± 0,242 | 1,742 ± 0,258 |
| Fe | 0,565 ± 0,073 | 0,115 ± 0,033 | 5,054 ± 0,220 | 0,801 ± 0,087 | 5,635 ± 0,232 | 1,317 ± 0,112 | 2,237 ± 0,146 |
| Sr | 0,267 ± 0,038 | 0,040 ± 0,015 | 0,053 ± 0,017 | 0,047 ± 0,016 | 0,047 ± 0,016 | 0,033 ± 0,013 | 0,040 ± 0,015 |
| Ag | 0,010 ± 0,007 | 0,026 ± 0,011 | 0,023 ± 0,010 | 0,044 ± 0,014 | 0,018 ± 0,009 | 0,038 ± 0,013 | 0,014 ± 0,008 |
| Cd | 0,126 ± 0,041 | 0,079 ± 0,033 | 0,196 ± 0,052 | 0,281 ± 0,062 | 0,076 ± 0,032 | 0,126 ± 0,041 | 0,111 ± 0,039 |
| Sn | 0,080 ± 0,031 | 0,059 ± 0,027 | 0,088 ± 0,046 | 0,195 ± 0,048 | 0,088 ± 0,032 | 0,072 ± 0,029 | 0,124 ± 0,039 |
| I | 0,132 ± 0,053 | 0,052 ± 0,027 | 0,106 ± 0,046 | 0,035 ± 0,019 | 0,000 | 0,036 ± 0,020 | 0,136 ± 0,055 |
| Ba | 0,194 ± 0,108 | 0,145 ± 0,093 | 0,225 ± 0,117 | 0,245 ± 0,123 | 0,187 ± 0,106 | 0,382 ± 0,152 | 0,180 ± 0,104 |
| S | 40,235 ± 18,720 | 45,330 ± 18,199 | 45,139 ± 19,933 | 39,894 ± 14,855 | 34,168 ± 12,159 | 37,599 ± 12,333 | 38,521 ± 12,340 |
| Cl | 8,099 ± 2,360 | 9,704 ± 2,868 | 7,016 ± 2,447 | 37,924 ± 5,682 | 5,262 ± 2,109 | 2,631 ± 1,492 | 7,893 ± 2,599 |
| K | 53,899 ± 5,251 | 16,809 ± 5,019 | 24,853 ± 2,857 | 71,574 ± 4,849 | 30,030 ± 5,818 | 55,574 ± 4,274 | 20,020 ± 2,566 |
| Ti | 0,037 ± 0,042 | 0,382 ± 0,140 | 0,383 ± 0,140 | 0,383 ± 0,140 | 0,036 ± 0,045 | 0,066 ± 0,057 | 0,101 ± 0,072 |
| Cr | 0,325 ± 0,057 | 0,075 ± 0,027 | 0,369 ± 0,061 | 0,152 ± 0,039 | 0,151 ± 0,039 | 0,029 ± 0,017 | 0,553 ± 0,074 |
| Co | 0,025 ± 0,015 | 0,015 ± 0,012 | 0,060 ± 0,024 | 0,028 ± 0,016 | 0,071 ± 0,025 | 0,034 ± 0,018 | 0,062 ± 0,024 |
| Ni | 0,427 ± 0,057 | 0,776 ± 0,077 | 0,341 ± 0,051 | 0,282 ± 0,046 | 0,965 ± 0,086 | 0,538 ± 0,064 | 7,005 ± 0,230 |
| Cu | 0,027 ± 0,014 | 0,018 ± 0,012 | 0,035 ± 0,017 | 0,053 ± 0,020 | 0,053 ± 0,020 | 0,018 ± 0,012 | 0,184 ± 0,038 |
| Zn | 1,135 ± 0,100 | 0,424 ± 0,061 | 0,982 ± 0,093 | 0,719 ± 0,080 | 1,478 ± 0,114 | 2,066 ± 0,135 | 1,489 ± 0,115 |
| Pb | 0,045 ± 0,015 | 0,060 ± 0,017 | 0,052 ± 0,016 | 0,052 ± 0,016 | 0,068 ± 0,018 | 0,067 ± 0,018 | 0,037 ± 0,013 |
| Se | 0,035 ± 0,014 | 0,002 ± 0,004 | 0,028 ± 0,012 | 0,015 ± 0,009 | 0,002 ± 0,004 | 0,009 ± 0,007 | 0,035 ± 0,014 |
| Br | 0,197 ± 0,031 | 0,107 ± 0,023 | 0,018 ± 0,009 | 0,101 ± 0,022 | 0,107 ± 0,023 | 0,125 ± 0,025 | 0,083 ± 0,020 |
| Rb | 0,197 ± 0,032 | 0,038 ± 0,014 | 0,000 | 0,032 ± 0,013 | 0,032 ± 0,013 | 0,057 ± 0,017 | 0,006 ± 0,006 |
| Zr | 0,006 ± 0,006 | 0,042 ± 0,015 | 0,042 ± 0,015 | 0,028 ± 0,012 | 0,043 ± 0,015 | 0,084 ± 0,021 | 0,014 ± 0,009 |
| Mo | 0,083 ± 0,022 | 0,006 ± 0,006 | 0,075 ± 0,021 | 0,008 ± 0,007 | 0,024 ± 0,012 | 0,007 ± 0,006 | 0,060 ± 0,018 |

З табл. 3 видно, що лактобактерії при застосуванні їх *per os* як пробіотичних препаратів, препаратів функціонального призначення або харчових добавок можуть частково забезпечувати макроорганізм необхідними елементами і тим самим покращувати стан здоров'я організму в цілому.

Оскільки частина лактобактерій при застосуванні *per os* гине, проходячи в агресивних умовах шлунково-кишкового тракту, цікаво було перевірити мікроелементний склад і мертвих клітин бактерій. Для цього суспензію живих клітин лактобактерій обробляли кип'ятінням і визначали мікроелементний склад. Отримані дані наведено в табл. 4, з якої видно, що концентрація деяких елементів у суспензії мертвих клітин перевищує концентрацію суспензії живих. Це може пояснюватися тим, що загибель клітин супроводжується порушенням цілісності їх цитоплазматичної мембрани, деструкцією клітинної стінки, що може приводити до натягування клітинами лактобактерій різноманітних речовин, в тому числі й мікроелементів із зовнішнього середовища. Цікавим був і той факт, що в суспензії мертвих клітин було виявлено два додаткових елементи, яких не спостерігалось у суспензії живих клітин, а саме ванадій – $0,027 \pm 0,025$ мкг і золото – $0,006 \pm 0,006$ мкг, але отримані значення не були достовірними.

Таблиця 4. Порівняння мікроелементного складу живих і мертвих клітин *L. plantarum* (лактобактерин)

| Елемент | Живі клітини | Мертві клітини |
|---------|--|---------------------|
| | Концентрація елемента, 10^{-2} мкг/ $2 \cdot 10^{10}$ клітин | |
| S | $32,812 \pm 18,279$ | $41,917 \pm 20,399$ |
| Cl | $5,262 \pm 2,109$ | $23,773 \pm 4,493$ |
| K | $35,521 \pm 3,416$ | $53,069 \pm 4,172$ |
| Ca | $3,455 \pm 0,971$ | $1,437 \pm 0,629$ |
| Cr | $0,151 \pm 0,039$ | $0,227 \pm 0,048$ |
| Mn | $3,311 \pm 0,234$ | $2,720 \pm 0,164$ |
| Fe | $5,747 \pm 0,234$ | $3,697 \pm 0,188$ |
| Ni | $1,229 \pm 0,097$ | $0,520 \pm 0,063$ |
| Cu | $0,203 \pm 0,040$ | $0,035 \pm 0,017$ |
| Zn | $0,648 \pm 0,076$ | $0,616 \pm 0,074$ |
| Se | $0,006 \pm 0,006$ | $0,002 \pm 0,004$ |
| Br | $0,041 \pm 0,014$ | $0,053 \pm 0,016$ |

Кінець табл. 4

| Елемент | Живі клітини | Мертві клітини |
|---------|--|-------------------|
| | Концентрація елемента, 10^{-2} мкг/ $2 \cdot 10^{10}$ клітин | |
| Rb | $0,057 \pm 0,017$ | $0,025 \pm 0,011$ |
| Sr | $0,060 \pm 0,018$ | $0,066 \pm 0,019$ |
| Zr | $0,042 \pm 0,015$ | $0,035 \pm 0,014$ |
| Cd | $0,312 \pm 0,065$ | $0,251 \pm 0,058$ |
| Pb | $0,135 \pm 0,025$ | $0,090 \pm 0,021$ |
| Ba | $0,338 \pm 0,143$ | $0,323 \pm 0,140$ |
| Ti | $0,164 \pm 0,091$ | $0,109 \pm 0,075$ |
| Mo | $0,051 \pm 0,017$ | $0,065 \pm 0,019$ |
| V | 0,000 | $0,027 \pm 0,025$ |
| Au | 0,000 | $0,006 \pm 0,006$ |

Враховуючи багато доказів здатності бактерій, грибів і дріжджів сорбувати важкі метали, було цікаво перевірити наявність такої здатності і в лактобактерій. До дослідів з визначення здатності лактобактерій сорбувати важкі метали було залучено три метали: кадмій, свинець і мідь. При їх виборі враховували такі фактори:

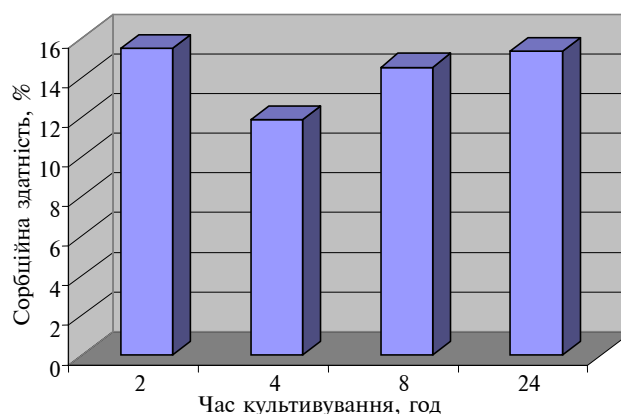
- **кадмій** – срібляво-білий ковкий метал – елементарна генетична отрута, яка сильно руйнує структури ДНК. Він належить до найнебезпечніших з усіх металевих забруднювачів їжі та напоїв – не лише через високу токсичність, але й через велике поширення та використання в сучасній промисловості. Кадмій потрапляє до організму з їжею і напоями, багато його потрапляє в організм і під час паління. При викурюванні 20 сигарет всмоктується $0,5\text{--}2$ мкг кадмію. Кадмій транспортується кров'ю, накопичується в печінці та нирках. Напівперіод його біологічного життя дуже великий – близько 40 років. Він може викликати нудоту, блювоту, спазми в животі та головний біль. В тяжких випадках може повинитись діарея і шок, порушується мінеральний склад суглобів, кісток та вражаються нирки [23];

- **свинець** – у багатьох будинках старої застройки до цих пір застосовуються свинцеві водопровідні труби (вони дуже довговічні), а там, де їх бракувало, найчастіше використовувались свинцеві зварювальні шви. Вода з підвищеною концентрацією свинцю залежно від дози та часу його потрапляння може спричинити гострі або хронічні отруєння. Гостре отруєння розвивається при одноразовому потрапленні свинцю в

таких дозах: для дорослих – 100–120 мг/мл води, а для дітей – 80–100 мг/мл води. При гострому отруєнні може статися летальний кінець. Хронічне отруєння розвивається при постійному вживанні свинцю в малих дозах. Свинець має властивість накопичуватися в тканинах організму, і симптоматика отруєння з'являється при досягненні концентрації свинцю в крові 40–60 мг/100 мл. Проявляється воно ознаками ураження центральної та периферійної нервової системи, кишечнику, нирок. Свинець відкладається практично в усіх органах та тканинах (особливо багато у волоссі, нігтях, слизовій оболонці ясен). Механізм дії свинцю на організм полягає в тому, що він блокує ферменти, які беруть участь у синтезі гемоглобіну, в результаті чого червоні кров'яні тільця втрачають здатність переносити кисень, розвивається анемія та хронічна недостатність кисню. Особливо чутливі до впливу свинцю діти. Свинець блокує утворення попередника вітаміну *D*, необхідного для відкладення кальцію в кістках, порушення обміну кальцію призводить до розвитку рахіту. Шкідлива дія свинцю на нервову систему призводить до затримки фізичного та розумового розвитку, зниженню інтелектуальних здібностей, ураженню слухового нерва та зниженню гостроти слуху тощо. Вживання води з високим вмістом свинцю вагітними жінками підвищує ризик завчасних пологів та ризик розвитку вроджених вад у плода [24];

- **мідь** – є в усіх харчових продуктах та всмоктується через шлунково-кишковий тракт. Вона необхідна організму для нормального обміну речовин. За рекомендаціями ВОЗ, норми потрапляння в організм повинні бути такими: для дорослих – 30 мг/кг ваги, для підлітків – 40 мг/кг та для немовлят – 80 мг/кг. На інтоксикацію міддю вказує підвищення проникності мембран мітохондрій, некроз легених альвеол різного ступеня, зниження бактерицидної активності сироватки крові, неспецифічна гіперкупремія, подразнення верхніх дихальних шляхів, гепатотоксичні функціональні розлади. Інтоксикація призводить до ураження периферійної нервової системи, церебрального ангіоневрозу, гастритів, виразкової хвороби, аутоімунних розладів, хвороб печінки, нирок і ЛОР-органів [4].

Спочатку нами було перевірено вплив на сорбційну здатність лактобактерій стану їх клітин (живі, мертві), концентрації важкого металу в розчині та часу культивування клітин у розчині при наявності відповідного металу (2, 4, 8 та 24 год). Отримані дані показали, що здатність досліджених штамів лактобактерій сорбувати метали не залежить ані від стану клітин, ані від часу експозиції їх з металами (рисунок).



Залежність сорбційної здатності композиції лактобактерій від часу експозиції з розчином, що містив 200 ГДК кадмію

Оскільки сорбційна здатність молочнокислих бактерій щодо важких металів не залежала від часу експозиції в подальших дослідах, для простоти виконання вирішено було використувати час експозиції, який дорівнює 2 год.

У табл. 5 показано дозозалежний ефект концентрації металів та сорбційної здатності лактобактерій.

З таблиці видно, що композиція лактобактерій, яка містить 5 штамів-симбіонтів бактерій роду *Lactobacillus*, мала найкращу сорбційну здатність та характеризується найнижчим показником накопичення відносно важких металів у досліджених концентраціях, ніж окремі штами. Слід зазначити, що штам порівняння *L. plantarum* (лактобактерин) майже не проявив здатності сорбувати важкі метали в умовах даного дослідження. Цікаво відзначити, що різні штами лактобактерій по-різному здатні були сорбувати досліджені метали. Так, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* LB86 мав позитивні сорбційні показники щодо свинцю та міді в концентрації 2ГДК 46,50 і 30,155% та накопичення цих металів у клітинах бактерій відносно контролю становило 636,54 і 17331,43%, відповідно, але штам зовсім не мав здатності сорбувати кадмій у тій самій концентрації. Аналогічна картина спостерігалася і для штаму *L. delbrueckii subsp. delbrueckii* DSM20074, який був здатний сорбувати свинець та мідь із розчинів на рівні 30,17 і 19,54% з накопиченням їх у клітинах бактерій порівняно з контролем, який дорівнює 448,08 і 7473,58%, відповідно, але не сорбував кадмій. Для інших штамів навпаки спостерігалася здатність сорбувати мідь та кадмій: *L. acidophilus* – 20,245 та 14,67%, *L. rhamnosus* LB3 – 13,95 та 12,67%, відповідно. Лише два штами виявилися строго специфічними у своїй сорбційній здатності відносно іонів міді: *L. plantarum* (лактобактерин) – 3,00%

(накопичення іонів у клітинах бактерій становило 395,57%) та *L. rhamnosus* V[®] – 6,455% з накопиченням 2535,85%. Отримані дані підтверджуються літературними даними, за якими деякі сорбенти здатні сорбувати великий спектр металів у той час як інші є строго специфічними відносно одного металу [5].

Дослідження останніх десятиліть підтвердили головну роль іонообмінних процесів у сорбції металів. Були встановлені основні іонообмінні сайти, кожен з яких може бути головним: ацетамідна група хітинів, полісахаридні групи грибів, аміногрупи та фосфатні групи нуклеїнових кислот, аміно- та амідогрупи, сульфогідрильні та карбоксильні групи білків [5, 25].

Механізм сорбції міді добре вивчено для дріжджів. Мідь виступає кофактором для низки ферментів – Cu, Zn-супероксиддисмутази, лізілоксидази, дорамін-β-гідроксилази, аскорбатоксидази, галактозидази та цитохром *c*-оксидази. Але у великих концентраціях цей іон токсичний для мікроорганізмів. Токсичність міді проявляється завдяки взаємодії між іонами міді та нуклеїновими кислотами, а також ферментами. Але основним механізмом дії є руйнування цілісності цитоплазматичної мембрани [26, 27].

Оскільки лише композиція лактобактерій виявила здатність до сорбції всіх взятих у дослід металів при концентрації їх у середовищі 2 ГДК, на-

ми було продовжено дослідження вищих концентрацій металів саме на ній (див. табл. 5). Отримані результати показали, що максимальна сорбційна здатність композиції лактобактерій для кадмію спостерігається при концентрації його в середовищі в межах 20 ГДК – 86,33%, вищі концентрації цього металу в розчині гірше сорбуються розробленою композицією лактобактерій, але все одно на достатньо високому рівні. Так, при 100 ГДК сорбційна здатність композиції лактобактерій становить 30,34%, при 200 ГДК – 25,33% і трохи нижче при 300 ГДК – 16,84%, що майже відповідає її сорбційній здатності при концентрації кадмію в середовищі 2 ГДК – 16,17%.

Механізм сорбції цинку та кадмію пов'язаний з тим, що катіонна сорбція може супроводжуватися виходом іонів калію для врівноваження іонного балансу в клітині, де відбувається стехіометричний обмін іонів кадмію та калію. Вихід іонів калію, як правило, асоціюється з руйнуванням клітинної стінки та втратою клітиною життєздатності [28, 29]. Вхід катіонів цинку та кадмію в клітини супроводжується виходом двох іонів калію для кожного окремо взятого двовалентного катіона. При цьому вихід іонів калію не впливає на підвищення рівня зв'язаного кадмію. Але детальніше механізм цих обмінних систем поки не з'ясовано [30, 31].

Таблиця 5. Залежність здатності молочнокислих бактерій сорбувати важкі метали від концентрації відповідних металів

| Штами лактобактерій | Концентрація важких металів у розчинах культивування | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|--------|----------|----------|----------|--------|-----------|--------|------------|---------|------------|---------|------------|---------|
| | 2 ГДК Pb | | 2 ГДК Cu | | 2 ГДК Cd | | 20 ГДК Cd | | 100 ГДК Cd | | 200 ГДК Cd | | 300 ГДК Cd | |
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Композиція лактобактерій | 27,67 | 548,65 | 32,87 | 3672,28 | 16,17 | 187,39 | 86,33 | 364,29 | 30,34 | 3327,30 | 25,33 | 4177,30 | 16,84 | 7995,19 |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> LB86 | 46,50 | 636,54 | 30,155 | 17331,43 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> DSM20074 | 30,17 | 448,08 | 19,54 | 7473,58 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. acidophilus</i> | 0,00 | 0,00 | 20,245 | 22594,44 | 14,67 | 196,20 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. rhamnosus</i> V [®] | 0,00 | 0,00 | 6,455 | 2535,85 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. rhamnosus</i> LB3 | 0,00 | 0,00 | 13,95 | 11594,44 | 12,67 | 331,58 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. plantarum</i> (лактобактерин) | 0,00 | 0,00 | 3,00 | 395,57 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |

Примітка. 1 – сорбційна здатність – відсоток адсорбованих іонів відповідного металу клітинами бактерій за винятком кількості іонів металів, що знаходяться в структурі клітини відносно внесеної концентрації іонів металу до розчину; 2 – накопичення металів у клітинах бактерій – відсоток концентрації відповідного металу, що міститься в клітині після адсорбції, щодо початкової кількості іонів цього металу в складі клітини; н/в – не визначали.

Отримані в ході проведення роботи дані також свідчать про зниження концентрації іонів калію в клітинах лактобактерій, здатних сорбувати іони кадмію. Так, для клітин *L. acidophilus* накопичення 196,20% кадмію супроводжувалося зниженням концентрації іонів калію на 64,37%, а при накопиченні *L. rhamnosus* LB3 11594,44% кадмію концентрація іонів калію в клітинах знижувалася на 51,66%, натомість сорбція клітинами композиції лактобактерій іонів кадмію до 187,39% супроводжувалася зниженням вмісту калію в клітинах лише на 4,53%, що свідчить про резерв накопичувальної здатності, та іонів калію в клітинах композиційного препарату на основі лактобактерій для подальшого накопичення іонів кадмію. І дійсно, при підвищенні концентрації іонів кадмію в клітинах композиції лактобактерій вміст іонів калію продовжував знижуватися. Накопичення клітинами композиційного препарату на основі лактобактерій таких кількостей кадмію: 364,29% (при 20 ГДК Cd), 3327,30% (при 100 ГДК Cd), 4177,30% (при 200 ГДК Cd) та 7995,19% (при 300 ГДК Cd) супроводжувалося зниженням вмісту іонів калію на 14,44, 64,44, 59,40 та 66%, відповідно (табл. 6). У бактерій, що не проявили здатності сорбувати кадмій, зниження концентрації іонів калію в клітинах не спостерігалось.

Таблиця вказує на можливість використання розробленого композиційного препарату на основі лактобактерій як пробіотичний препарат із здатністю до біосорбції та виведення важких металів з організму людини.

Висновки

1. Дослідження мікроелементного складу лактобактерій показало їх багатоелементний склад. Клітини бактерій містили 24 різноманітні елементи, причому їх якісний склад був однаковим незалежно від виду та штаму бактерій, а кількісний склад варіював залежно від приналежності бактерій до того чи іншого штаму або виду.

2. У статті показано можливість використання молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* як потенційних біосорбентів важких металів.

3. Сорбція важких металів дослідженими штамми молочнокислих бактерій та композицією лактобактерій виявилася не залежною ані від часу, ані стану клітин (живі, мертві), але залежна від концентрації важких металів у середовищі культивування.

4. Отримані дані свідчать про штамозалежну здатність до сорбції важких металів із розчинів у бактерій роду *Lactobacillus*.

5. Найкращу сорбційну здатність щодо важких металів проявила композиція лактобактерій, на основі якої в перспективі планується створити новий вітчизняний ефективний пробіотичний препарат з унікальною властивістю сорбції важких металів з організму людини, що на даний момент є досить актуальним, враховуючи несприятливі екологічні умови навколишнього середовища.

Таблиця 6. Залежність накопичення іонів важких металів від їх початкової концентрації

| Штами лактобактерій | Концентрація важких металів у розчинах культивування | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|------|----------|------|----------|-------|-----------|-------|------------|-------|------------|-------|------------|-------|
| | 2 ГДК Pb | | 2 ГДК Cu | | 2 ГДК Cd | | 20 ГДК Cd | | 100 ГДК Cd | | 200 ГДК Cd | | 300 ГДК Cd | |
| | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| Композиція лактобактерій | 548,65 | 0,00 | 3672,28 | 0,00 | 187,39 | 4,53 | 364,29 | 14,44 | 3327,30 | 64,44 | 4177,30 | 59,04 | 7995,19 | 66,60 |
| <i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> LB86 | 636,54 | 0,00 | 17331,43 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. delbrueckii subsp. delbrueckii</i> DSM20074 | 448,08 | 0,00 | 7473,58 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. acidophilus</i> | 0,00 | 0,00 | 22594,44 | 0,00 | 196,20 | 64,37 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. rhamnosus</i> V® | 0,00 | 0,00 | 2535,85 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. rhamnosus</i> LB3 | 0,00 | 0,00 | 11594,44 | 0,00 | 331,58 | 51,66 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |
| <i>L. plantarum</i> (лактобактерин) | 0,00 | 0,00 | 395,57 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в | н/в |

Примітка. 1 – накопичення металів у клітинах бактерій – відсоток концентрації відповідного металу, що знаходиться в клітині після адсорбції, відносно початкової кількості іонів цього металу в складі клітини; 2 – відсоток іонів калію, що вийшли з клітини бактерій, по відношенню до вихідної їх кількості в клітині; н/в – не визначали.

С.А. Старовойтова, Л.Б. Орябинская,
В.Ю. Горчаков

МОЛОЧНОКИСЛЫЕ БАКТЕРИИ – БИОСОРБЕНТЫ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ

Исследован микроэлементный состав и способность молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus* и их композиции к адсорбции тяжелых металлов. Показана схожесть качественного элементного состава клеток лактобактерий и различие его количественного состава в зависимости от вида и штамма лактобактерий. Исследование способности лактобактерий адсорбировать тяжелые металлы показало независимость этого процесса от времени экспозиции и состояния клеток (живые, мертвые). Адсорбционная способность бактерий зависела от концентрации соответствующего металла в среде культивирования. Установлена достаточно высокая способность адсорбировать тяжелые металлы разработанной композицией лактобактерий, что позволяет в дальнейшем прогнозировать ее использование, как эффективного биосорбента тяжелых металлов из организма человека.

S.O. Starovoitova, L.B. Oryabinskaya,
V.Yu. Gorchakov

LACTIC ACID BACTERIA AS BIOSORBENTS OF HEAVY METALS

The paper under consideration examines the microelement structure and lactic acid bacteria ability of genus *Lactobacillus* and their compositions to adsorb heavy metals. We highlight the same qualitative element structure of lactic acid bacteria cells and distinction of its quantitative structure, depending on the kind and strain of lactic acid bacteria. Besides, the research results of lactic acid bacteria ability to adsorb heavy metals show this process independence from the exposition time and cells condition (both alive and dead). Specifically, the adsorption ability of bacteria depends on the concentration of the applicable metal in the cultivation environment. This dashes hope that a high ability of the proposed lactic acid bacteria composition to adsorb heavy metals can be a highly effective biosorbent of heavy metals from the human organism.

1. *Алехина Т.Н., Бобко А.А., Малахов И.Н.* Тяжелые металлы в донных осадках рек промышленных регионов // Довкілля і здоров'я. – 2007. – № 3. – С. 9–13.
2. *Талакина Ю.Н., Сергеева Л.А., Давидова С.Ф., Пидоренко А.И.* Гигиенические аспекты содержания соединений тяжелых металлов в почве и воде: состояние проблемы, перспективы дальнейших исследований (обзор) // Там же. – С. 13–19.
3. *Рублевская Н.И.* Загрязнение атмосферного воздуха городов тяжелыми металлами // Там же. – С. 20–22.
4. *Гребняк М.П., Гребняк В.П., Єрмаченко О.Б., Павлович Л.В.* Забруднення ґрунту хімічними елементами: фактори ризику, негативний вплив на здоров'я // Там же. – С. 22–28.
5. *Подгорский В.С., Касаткина Т.П., Лозовая О.Г.* Дрожжи – биосорбенты тяжелых металлов // Мікробіол. журн. – 2004. – 66, № 1. – С. 91–103.
6. *Children's environmental and health action plan for Europe.* Ministerial document. WHO Regional Office for Europe. – Copenhagen, 2004. – P. 1–8.
7. *Axelford D., Davis D.L., Hajek R.A.* It's time to rethink dose: the case for combining cancer, and birth and developmental defects // Environ. Health Perspect. – 2001. – 109, N 2. – P. 246–249.
8. *Solozhenkin P.M., Nebera V.P., Zouboulis A.I., Matis K.A.* Metal ion extraction by microorganism biomass and sorption on flotation // J. of Mining Science. – 2003. – 39, N 1. – P. 78–86.
9. *Hadi B., Margaritis A., Berruti F., Bergougnou M.* Kinetics and equilibrium of Cadmium biosorption by yeast cells *S. cerevisiae* and *K. Fragilis* // Inter. J. of Chem. Reaction Eng. – 2003. – 1. – P. 1–16.
10. *Martin-Dupont F., Gloaguen V., Granet R. et al.* Heavy metal adsorption by crude coniferous barks: a modeling study // J. Environ. Sci. Health. – 2002. – 6. – P. 1063–1073.
11. *Göksungur Y., Üren S., Güvenç U.* Biosorption of Copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass // Turk. J. Biol. – 2003. – 27. – P. 23–29.
12. *Marques P.A., Pinheiro H.M., Teixeira J.A., Rosa M.F.* Removal efficiency of Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ by waste brewery biomass: pH and cation association effects // Desalination. – 1999. – 124. – P. 137–144.
13. *Ившина И.Б., Пешкур Т.А., Коробов В.П.* Эффективное извлечение цезия клетками бактерий рода *Rhodococcus* // Микробиология. – 2002. – 71, № 3. – С. 418–423.
14. *McEldowney S.* Microbial biosorption of radionuclides in liquid effluent treatment // Appl. Biochem. and Biotechnol. – 1990. – P. 159–179.
15. *McEldowney S., Hardman D.L., Waite S.* Pollution: ecology and biotreatment. – London: Longman Group UK Limited, 1993. – 322 p.

16. Давидова Е.Г., Каспарова С.Г. О природе сорбции металлов клеточными стенками дрожжей // Микробиология. – 1992. – **61**, № 6. – С. 1018–1022.
17. Jazgan A., Ozcengiz G. Subcellular distribution of accumulated heavy metals in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* // Biotechnol. Lett. – 1994. – **16**, N 8. – P. 871–874.
18. Инструкция по применению препарата “Лактобактерин сухой” № 94.161.278 от 18.07.2002. МЗ РФ. Государственный научно-исследовательский институт стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича.
19. Справочник фельдшера / Под ред. А.Н. Шабанова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 1983. – 432 с.
20. ГОСТ 2874–82. Вода питьевая. Гигиенические требования и контроль за качеством.
21. World Health Organization. Guidelines For drinking water quality [electronic resource]: incorporating first addendum. Recommendations. – 2006. – **1**. – P. 1–595.
22. Кольман Я., Рём К.-Г. Наглядная биохимия / Пер. с нем. – М.: Мир, 2000. – 469 с.
23. Юфит С. Токсичные металлы – ne quid nimis // Экологический журнал “Волна”. – 2000. – № 22(1). – С. 1–3.
24. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. International programme on chemical safety. – Geneva, 1996. – P. 1–15.
25. Pirog T.P. Role of *Acinetobacter sp.* exopolysaccharides in protection against heavy metal ions // Microbiology. – 1997. – **66**, N 3. – P. 284–288.
26. Kosman D.J. Transition metal ion uptake in yeasts and filamentous fungi // Metal ions in fungi. – N.-Y., 1994. – 507 p.
27. Walker M.G. Yeast physiology and biotechnology. – N.-Y.; Toronto: John Wiley and Sons, 1998. – 350 p.
28. Gadd G.M., Mowll J.L. The relationship between cadmium uptake, potassium release and viability in *Saccharomyces cerevisiae* // FEMS Microbiol. Lett. – 1983. – **16**. – P. 45–48.
29. Gadd G.M. Green means clean: biomass and metal accumulation // Trends. Biotechnol. – 1989. – **7**, N12. – P. 325–326.
30. Мельникова В.А., Баснакьян И.А., Ермолов В.В. Лимитирование и ингибирование жизнедеятельности микроорганизмов ионами металлов // ЖМЭИ. – 1991. – № 6. – С. 80–84.
31. Eilam Y. The effect of potassium ionophores and potassium on cellular calcium in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* // J. Gen. Microbiol. – 1982. – **128**. – P. 2611–2614.

Рекомендована Радою
факультету біотехнології і біотехніки
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції
26 жовтня 2007 року