

(19) **KG** (11) **815** (13) **C1** (46) **30.09.2005**

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНСТВО
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

(51)⁷ C12N 1/02

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя (владельца)

(21) 20040053.1

(22) 16.06.2004

(46) 30.09.2005, Бюл №9

(76) Доолоткельдиева Т., Омургазиева Ч.М. (KG)

(56) Патент WO, A1, №1590957, кл. C12N 15/09, 2000

(54) **Штаммы бактерий *Bacillus megatherium* H5-8 и *Bacillus cereus* H5-2 (в ассоциациях) для деструкции тяжелых металлов природной среды**

(57) Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии, может быть использовано в производстве препаратов для устранения загрязнения тяжелыми металлами почв и водной среды и представляет собой новые штаммы спорообразующих бактерий. Задача данного изобретения состоит в создании высокоэффективного биопрепарата на основе ассоциации бактерий, способных проводить активный процесс поглощения металлов в различных почвогрунтах и создавать условия для рекультивации почв. Задача решается использованием полученных новых штаммов *Bacillus megatherium* H5-8 и *Bacillus cereus* H5-2 в ассоциациях как биодеструкторов загрязненных тяжелыми металлами природных сред. Предлагаемый способ является экологически безопасной очисткой окружающей среды от загрязнения тяжелыми металлами с помощью биопрепаратов, созданных на основе естественной микрофлоры, присутствующей в воде или почве. После завершения очистки, избыточная масса вносимых в окружающую среду микроорганизмов отмирает и превращается в легкоусвояемые растениями органические вещества. 5 пр., 4 табл.

Изобретение относится к микробиологической промышленности и биотехнологии, может быть использовано в производстве препаратов для устранения загрязнения тяжелыми металлами почв и водной среды и представляет собой новые штаммы спорообразующих бактерий.

Известен штамм из рода *Bacillus*, который предложен как агент для биологической борьбы с грибными болезнями с/х растений (Патент US, А, №6033659, кл А01N 63/00, 1998). Область применения этого штамма ограничивается в биологической защите сельхозрастений. Известен другой штамм из рода *Bacillus*, предложенный в качестве средств, для уменьшения концентрации нитратов в почве (Патент EP, A1, №1142988 7, кл. C12N 1/20, 2002), которые пригодны для улучшения свойств почв, ферментативной

обработки органических отходов. Этот штамм также в отличие от наших штаммов предназначен для очистки почв от нитратов, а не от тяжелых металлов. Наиболее близким по действию описываемых штаммов является способ и устройство для экологически безопасной очистки или обработки вредных веществ с использованием микроорганизмов (Патент WO, A1, №1590957, кл. C12N 15/09, 2000). Однако один из используемых штаммов является анаэробной (*Clostridium butiricum*) бактерией, тогда как предлагаемые нами оба штамма относятся к аэробам и факультативным аэробам, тем самым отличается по метаболизму и деструктивной активностью.

Задача данного изобретения состоит в создании высокоэффективного биопрепарата на основе ассоциаций бактерий, способных проводить активный процесс поглощения металлов в различных почвогрунтах и создавать условия для рекультивации почв.

Задача решается использованием полученных новых штаммов - *Bacillus megatherium* H5-8 и *Bacillus cereus* H5-2 в ассоциациях как биодеструкторов загрязненных тяжелыми металлами природных сред.

Эти штаммы были выделены из загрязненных тяжелыми металлами почв на территории Ак-Тюзской обогатительной фабрики, Кичи-Кеминского района.

Выделение штаммов рода *Bacillus* проводят методом выделения почвенных микроорганизмов на твердых питательных средах, для чего тщательно перемешанную почву раскладывают на стерильное стекло ровным слоем, отбирают средний образец (для этого почву берут шпателем из разных мест) и отвешивают 10 г почвы. Затем взвешенную почву помещают в стерильную фарфоровую чашечку, увлажняют до пастообразного состояния и 5 мин растирают пальцем в резиновой перчатке и переносят в колбу со 100 мл стерильной воды, затем ее в течение 10 мин взбалтывают на качалке. Посев проводят из разведения 1:10 000 методом глубинного посева в мясопептонный агар. Выделенные штаммы хранятся в лабораторной коллекции под номерами H5-8 (*Bacillus megatherium*) и H5-2 (*B. cereus*).

Выделенные штаммы - деструкторы - были адаптированы и отселекционированы по способности к росту при высоких концентрациях металлов, ртути до 0.75 мг/л на жидких и $1 \cdot 10^{-1} \%$ - на агаризованных средах, а свинец - при концентрации до 1.5-2 мг/л.

Штаммы характеризуются следующими признаками:

Штамм H5-8 *Bacillus megatherium*

Номенклатурные данные:

Семейство *Bacillaceae* Fischer, 1895, 139, род *Bacillus* Cohn 1872, 174, вид *Bacillus megatherium*.

Морфолого-культуральные признаки:

2.0 · 0.8-1.25 мкм. Окраска по Граму положительная, Перитрихи. Старые палочки неправильной формы и часто больше чем 2.5-3.0 мкм в диаметре.

Колонии на желатине: серовато-белые, приподнятые, блестящие, цельные.

Желатина уколом: серовато-белый, поверхностный налет, разжижения от крате-рообразного до мешковидного.

Колонии на мясопептонном агаре (МПА): круглые, толстые, от грязно-белого до темно-кремового цвета, диаметром 8-10 мм, с гладкой поверхностью и ровным краем. Флюоресцирующих пигментов не образуют.

На косом агаре: темно-кремового цвета, гладкий, слизистый налет, среда становится коричневой.

Физиолого-биохимические свойства:

Хемоорганотроф, факультативный аэроб. Крахмал и желатину гидролизует. В качестве источника углерода и энергии использует глюкозу, лактозу, инозит, арабинозу. Не использует мальтозу, дульцит, маннит. В качестве источника азота использует неорганические и органические формы азота (аминокислоты, полипептиды). Индол не образует.

Оптимальная температура для роста 25-28°C. Растет в диапазоне pH 7-9.5.

Культура штамма Н5-8 на агаровых косяках хранится в холодильнике при (-2+5°C) с периодическими пересевами 3-4 раза в течение года. При соблюдении этих условий стабильность штамма Н5-8 сохраняется в течение 4-5 лет.

Штамм Н5-2 *Bacillus cereus*.

Номенклатурные данные:

Семейство *Bacillaceae* Fischer, 1895, 13 9, род *Bacillus* Cohn 1872, 174, вид *Bacillus cereus*.

Морфолого-культуральные признаки.

Палочки: 0.8-1.0 · 2.5-4.0 мкм, расположены поодиночке и цепочками, подвижные. Перитрихи. Грамположительные; споры 0.7-1.0 · 1.1-1.5 мкм, овальные, центральные или парацентральные.

На мясопептонном бульоне происходит быстрое помутнение, затем образуется нежная пленка, кольца, иногда хлопья.

На картофеле толстый мягкий слой беловато-кремовый с легким розовато-кремовым оттенком.

На МПА образует от грязно белого до кремовых колоний, диаметром 13-15 мм, с неровными краями, с шероховатой, сухой поверхностью. На косом агаре образует желтовато-зеленую флюоресценцию.

Физиолого-биохимические свойства.

Хемоорганотроф, аэроб, факультативный, каталазо-положительный. Ферментирует глюкозу, сахарозу, глицерин. Крахмал гидролизует. Индол не образует. Нитраты редуцируются. Оптимальная температура для роста 25-28°C. Растет в диапазоне значений pH 6.8-9. Оптимальная для роста pH 7.0-8.0.

Изобретение поясняется следующим конкретным примером получения препарата на основе двух штаммов *Bacillus megatherium* и *B. cereus*, обладающих активной поглотительной активностью солей ртути и свинца из почвенной среды.

Пример 1. Посевной материал - штамм *Bacillus megatherium*, *Bacillus cereus* культивируют на мясопептонном агаре. Биомассу микроорганизмов добавляют к среде в таком количестве, чтобы в 1 мл среды содержалось около 10^3 кл. В качестве жидких питательных сред использованы среды следующего состава:

1. NaCl - 5 г/л питательный бульон - 8 г/л pH-7.0

2. Почвенная среда, по составу максимально приближенная к естественным условиям.

Почвенный экстракт готовят следующим образом: к 500 г плодородной почвы (250 г гумус + 250 г почвы) добавляют 1.5 л водопроводной воды, после тщательного перемешивания автоклавируют 30 мин (при 1 атм); затем фильтруют через фильтровальную бумагу и тут же добавляют к горячему фильтрату 0.5 г – CaCO₃ и тщательно перемешивают, затем добавляют 0.2 г K₂HPO₄, 1.5 г глюкозы, стерилизуют pH-7.0.

Культуру в колбах выращивают на качалках со скоростью вращения 200-220 об/мин при температуре 28-30 °C в течение до 48 ч до стадии полной споруляции. После окончания споруляции, питательную среду центрифугируют, разбавляют различными стабилизаторами и разливают в тару. Жидкая ферментированная среда в конце процесса содержит $2-5 \cdot 10^9$ жизнеспособных спор на 1 мл.

Пример 2. В данном эксперименте проведена оценка степени поглощения и деструкции ртути и свинца со штаммами *Bacillus megatherium* + *Bacillus cereus*.

Опыты ставили в качалочных колбах емкостью 250 мл (объем среды №2 - 50 мл), в которую вносились концентрированные растворы солей тяжелых металлов, превышающие ПДК в несколько раз, например HgSO₄ в дозах: 0.3; 0.5; 0.75 мг/л, Pb(CH₃COO)₂·3H₂O в дозах 1; 1.5; 3 мг/л. Вносят посевной материал, содержащий суспензии Н5-8 *Bacillus megatherium*, Н5-2 *Bacillus cereus* (в концентрации 10^6 кл.). Культивирование проводят при температуре 28-30°C на качалке при 200-220 об/мин, pH

питательной среды - 7.5. В качестве контроля на все варианты взята культуральная жидкость без внесения металлов.

Через каждые 6, 12, 24, 48 часов деструктивный характер штаммов к содержанию в почвенной питательной среде соли ртути и свинца, выражали характером роста и развития колоний и численностью колониеобразующих единиц (КОЕ) путем посева из разведения на среду МПА, а также контролировали по ФЭК-КФ-2 изменение оптической плотности при толщине кюветы 1 см.

Результаты исследований показали (табл. 1), что при высоком исходном содержании ртути (0.75 мг/л) в нейтральной среде происходит понижение pH среды до 3.56, но полное угнетение роста биомассы не происходит, рост тормозится (в первые 6 часов), снижается деструктивная активность штамма. Клеточная стенка становилась рыхлой и деформированной. Однако через 12 часов инкубирования происходит адаптация культуры микроорганизмов и через 48 ч контакта во всем исследованном интервале концентрации был равномерный, хороший рост клеток. При концентрации ртути в среде 0.3 мг/л скорость роста клеток в начальный период контакта (6-10 ч) была невелика, но уже через 48 ч содержание биомассы, особенно при самой высокой концентрации - 0.75 мг/л, составляло 60 и 71 .4% от контроля).

Деструктивная зависимость ртути от pH среды имеет выраженный максимум, лежащий в диапазоне pH 6.34-6.92 (табл. 1). При понижении pH деструктивная способность биомассы постепенно падает, и деструкция ртути практически прекращается в области pH 2.0-3.1.

У штаммов Н5-8 *Bacillus megatherium*, Н5-2 *Bacillus cereus* деструкция ртути заканчивается окончательно при pH 2.9-3, тогда как деструкция свинца при pH 4.

Таблица 1

Деструкция высоких концентраций ртути культурами *Bacillus megatherium*,
Bacillus cereus (Н5-8 + Н5-2)

Конц. ртути, мг/л	Показатели через 12-48 ч роста	
	pH	Оптическая плотность
	Исх. pH - 7.60	Исх. ОП - 0.1
0 (контроль)	7.01/6.72	0.7/1.0
0.3	4.12/4.51	0.31/0.38
0.5	6.34/6.92	0.4/0.5
0.75	3.30/3.56	0.5/0.4

Пример 3. Как видно из табл. 2 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.

Таблица 2

Деструкция высоких концентраций свинца культурами *Bacillus megatherium*,
Bacillus cereus (Н5-8 + Н5-2)

Конц. свинца, мг/л	Показатели через 12-48 ч роста	
	pH	Оптическая плотность
	Исх. pH - 7.60	Исх ОП-0.1
0 (контроль)	7.01/6.72	0.7/1.0
1	6.78/7.33	0.8/0.6
1.5	6.87/7.40	0.52/0.62
3	6.82/6.72	0.42/0.4

Таким образом, используемые штаммы H5-8 *Bacillus megatherium*, H5-2 *Bacillus cereus* могут увеличивать свою биомассу при достаточно высоких концентрациях свинца до 3 мг/л в среде, однако оптимальными являются концентрации до 1.5 мг/л, где удельная скорость роста и биомассы культур имеют максимальные значения.

Одним из факторов, влияющих на эффективность утилизации свинца, является pH среды культивирования. Для биомассы штаммов H5-8 *Bacillus megatherium*, H5-2 *Bacillus cereus* оптимальное для деструкции значение pH лежит в области 6.78-7.33, она равняется 1 мг/л Pb и при понижении pH наблюдается постепенное снижение деструктивной способности, при pH 3-4 и далее замечается заметное падение концентрации биомассы, характерное для всех штаммов.

Пример 4. Многие исследователи отмечают, что при ухудшении свойств почв в результате загрязнения длительного времени тяжелыми металлами в обедненном комплексе микромицетов начинают доминировать фитотоксичные формы микромицетов.

При постоянном воздействии на почву тяжелых металлов, вызывающих ее токсикоз, наличие грибов - токсинообразователей может быть дополнительным фактором, отрицательно влияющим на развитие растений на загрязненных почвах.

Предлагаемый штамм H5-2 *Bacillus cereus* обладает не только деструктивными свойствами, но и обладает высокой антагонистической активностью в отношении фитопатогенных грибов - возбудителей корневых гнилей. Данные таблицы 3 отражают подавление и угнетение роста возбудителей корневых гнилей - *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cynerea*, *Cladosporium* sp. *Penicillium funiculosum*, *Nigrospora* sp. культурой H5-2 *Bacillus cereus*.

Таблица 3

Культура антагониста <i>Bacillus</i> , зона подавления в мм	Тест культуры					
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	<i>Botrytis cynerea</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Penicillium funiculosum</i>	<i>Nigrospora</i> sp.
0 (контроль)	Рост обильный	Рост обильный	Рост обильны	Рост обильный	Рост обильный	Рост обильный
1 <i>Bacillus cereus</i>	+	++	+	++	++	+

Примечание:

"+" - тест культура сильно угнетена;

"++" - рост тест культуры почти полностью отсутствует.

Пример 5. Была проведена экспериментальная очистка биопрепаратом участка - поверхности почвы, загрязненной тяжелыми металлами - ртути и свинца. Проведена обработка биопрепаратом опытного участка. Опыт проводился в трехкратной повторности. Усредненные результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Динамика очистки биопрепаратом загрязненных тяжелыми металлами почв

Объект, мониторинг, сут.	Содержание тяжелых металлов, мг/л		Степень очистки, %	
	Почва			
	Ртуть	Свинец	Ртуть	Свинец
0	0.75	1.5		
10	0.54	0.8	28	47
20	0.37	0.5	63	50

30	0.19	0.22	75	85.4
50	0.08	0.03	92	98.2

Как показывают данные табл. 4 в течение 50 суток в результате применения биопрепарата, созданного на основе аэробных спорообразующих бактерий, содержание ртути и свинца в загрязненной почве снизилось до 92-98.2%.

Формула изобретения

Использование вновь полученных штаммов бактерий *Bacillus megatherium* H5-8 и *Bacillus cereus* H5-2 в ассоциациях для деструкции тяжелых металлов природной среды.

Составитель описания

Усубакунова З.К.

Ответственный за выпуск

Арипов С.К.

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03