

## СВЯЗЫВАНИЕ РАДИОЦЕЗИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ, ВЫДЕЛЕННЫМИ ИЗ ОБРАЗЦОВ ОБЪЕКТА «УКРЫТИЕ»

В. Б. Рыбалка<sup>1</sup>, И. Н. Канцева<sup>1</sup>, Г. Ф. Смирнова<sup>2</sup>, Г. И. Петелин<sup>1</sup>, Ю. И. Зимин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем безопасности АЭС НАН Украины, Чернобыль

<sup>2</sup>Институт микробиологии и вирусологии НАН Украины, Киев

Изучение всех факторов, способных оказывать влияние на экологическую безопасность объекта «Укрытие» представляет важную и актуальную задачу. Важной областью исследований является изучение влияния микроорганизмов на формы содержания радионуклидов в объекте «Укрытие». Из проб грунта (грязи) объекта «Укрытие» выделены микроорганизмы, способные связывать радионуклиды цезия. Описаны их морфолого-культуральные свойства, проведена их первичная идентификация. Большинство микроорганизмов, изолированных из изученных образцов, отнесено к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*. Определены коэффициенты накопления радиоцезия выделенными культурами. Полученные результаты указывают на то, что в объекте «Укрытие» протекают процессы изменения связывания радионуклидов под действием микроорганизмов.

В предыдущих исследованиях было показано, что в результате жизнедеятельности микроорганизмов в природных и полуприродных биотопах миграционные характеристики радионуклидов могут сильно изменяться [1], а также что в аэрозолях объекта «Укрытие» в больших количествах присутствуют споры микроорганизмов, бактериальные слизи, органические материалы - остатки микроорганизмов [2]. Исследованные материалы содержали большое количество радионуклидов, в частности радиоцезия. Было интересно выявить наличие биотического связывания радиоцезия и описать культуры объекта «Укрытие», способные это связывание осуществлять.

### Методы

Стерилизация посуды, растворов, питательных сред проводилась в соответствии с общепринятыми методиками [3, 4]. В работе использовали также центрифугу Suprafuga-22 (10000 об./мин) и германиевый детектор Canberra 7229P – 7500 – 40 – 19. ( $K_{\text{eff}}$  (1 и / с / Бк) = 0,035 для  $E = 661,6$  кэВ ( $^{137}\text{Cs}$ ); коэффициент дискриминации  $K = 2$  для  $E = 13325$  кэВ ( $^{60}\text{Co}$ ); МДА ( $^{137}\text{Cs}$ ) 0,25 Бк / препарат, 50000 с, геометрия  $H = 2,6$  см,  $r = 0,9$  см). Для выделения микробных культур, которые способны связывать радиоцезий использовали усовершенствованные методики [5 - 7]. Агаризованную среду с добавкой радиоцезия - для обнаружения накопления бактериями цезия, а жидкую питательную среду - для культивирования при определении коэффициента накопления радиоцезия. Состав среды BS (на 1 л):  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  - 2000 мг,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 200 мг,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  - 100 мг,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 10 мг,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 10 мг,  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,6 мг,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - 0,6 мг,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,1 мг,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - 0,06 мг,  $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,06 мг,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  - 0,05 мг,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  - 0,01 мг, дрожжевой экстракт - 50 мг, агар - 15 г (для твердой среды).

Образцы для исследований отобраны в помещениях 208, 209 объекта «Укрытие». Приготовление разбавления суспензий образцов (грунт, илы) при подготовке проб к анализам проводили в соответствии с общепринятыми методиками [3, 4].

Навеску образца (1 г) суспендировали в 9 см<sup>3</sup> стерильной водопроводной воды, готовили 10-кратные разведения до соотношения 1/1000 - 1/10000000. Из каждого разведения на поверхность агаризованной среды BS высевали по 100 мкл суспензии и инкубировали при 30°C 7 сут.

Первичную идентификацию культур проводили на основании изучения основных признаков: морфологии клеток, наличия спор, окраски по Граму, подвижности, отношения к глюкозе на среде Хью - Ливсена, наличия пигментов, образования каталаза, оксидазы, роста на разных концентрациях NaCl, восстановления нитратов в нитриты и др.

Агаризованную среду BS с содержанием  $^{137}\text{Cs}$  примерно 600000 Бк/л использовали для выявления культур, способных накапливать радиоцезий. По 10 - 12 культур высевали на радиоактивную среду в чашки Петри. Выросшие колонии (30 °С, 4 сут) отпечатывали на кружочки стерильной фильтровальной бумаги, с использованием пинцета и микробиологической петли переносили на специальный держатель для автордиографии, покрывали майларовой антихемографической защитной пленкой, далее в темноте накладывали специальную рентгеновскую пленку Cronex-4 (Производство Украина – США), накрывали пластмассовой защитной пластиной, и фиксировали «сэндвич» металлическими клипсами. Сборку упаковывали в светозащитную черную бумагу и экспонировали 60 ч. На основании данных автордиографии отобрали 224 колонии, которые активно накапливали радиоцезий.

Фотографирование бактерий выполняли с использованием микроскопа Oxiplot Option (Germany) (Объективы 100/130<sup>x</sup> окуляры 10/25<sup>x</sup>). Препараты готовили из 3-суточных культур. Фотографии наиболее типичных культур представлены на рис. 1 - 4.

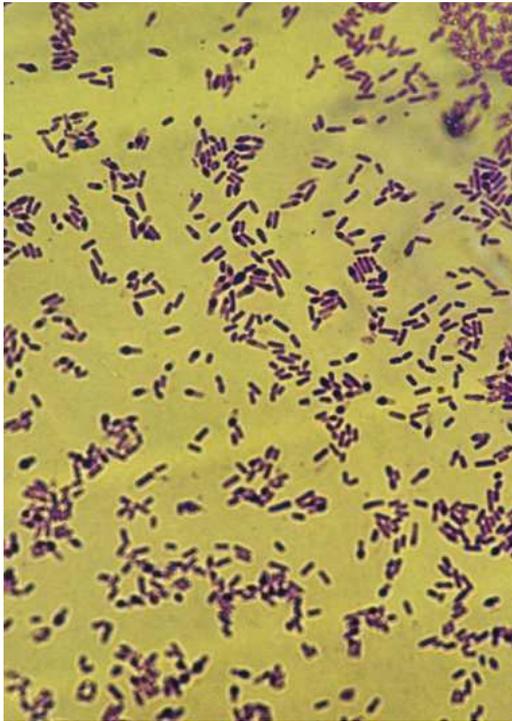


Рис. 1. Вид культуры BS124.

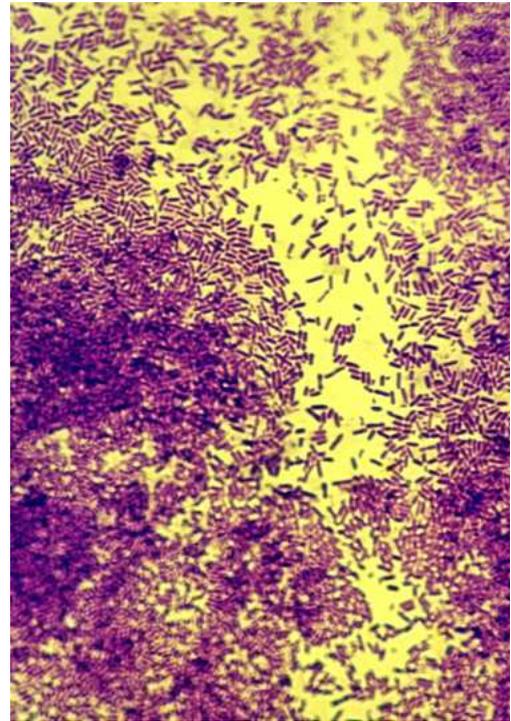


Рис. 2. Вид культуры BS56.

Биомассу определяли нефелометрически на спектрофотометре СФ – 46 при 550 нм.

Для определения коэффициента накопления радиоцезия культуры высевали на жидкие питательные среды BS с содержанием  $^{137}\text{Cs}$  примерно 500000 Бк / л, культивировали 4 сут на качалке при 240 об./мин. Содержание радиоцезия в суспензии измеряли на гамма-спектрометре. Культуральную жидкость центрифугировали (5 мин при 10000 об./мин), биомассу дважды промывали 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды с последующим центрифугированием, ресуспендировали в 30 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и определяли на гамма-спектрометре содержание радиоцезия, связанного культурой.

На основании полученных данных рассчитывали коэффициент накопления радиоцезия культурой по формуле  $K_d = (N_{\text{bact}}/m_{\text{bact}})/(N_w/m_w)$ , где  $K_d$  - коэффициент накопления радиоцезия культурой;  $N_{\text{bact}}$  - счетность  $^{137}\text{Cs}$  в отмытой суспензии культуры;  $m_{\text{bact}}$  – масса отмытой культуры (находится по предварительно построенному градуировочному графику: А (мутность суспензии)/m (мг) культуры, 550 нм, L = 0,3 см);  $N_w$  – счетность  $^{137}\text{Cs}$  в

питательной среде;  $m_w$  - масса питательной среды (плотность питательной среды BS принята равной  $1 \text{ г/см}^3$ ).

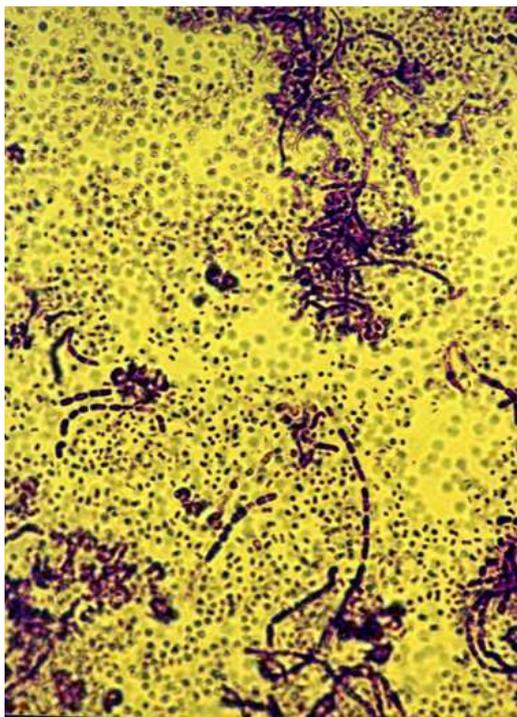


Рис. 3. Вид культуры BS39.

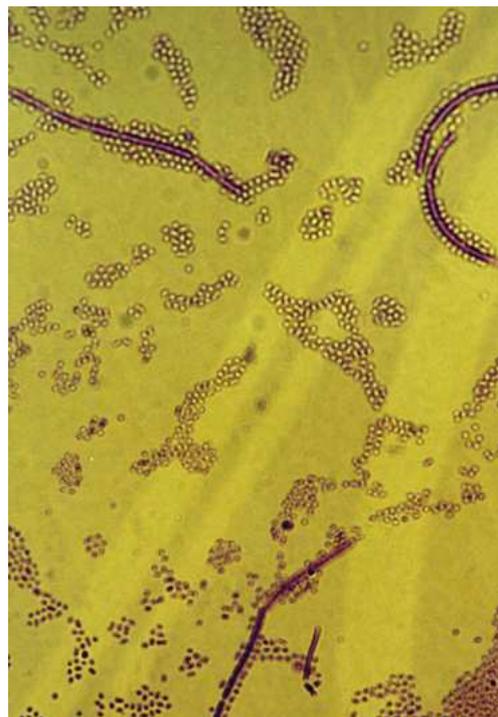


Рис. 4. Вид культуры BS175.

## Результаты

Исследуемые образцы содержат жизнеспособные и разнообразные по своим морфологическим и физиологическим свойствам микроорганизмы, общее количество которых составило  $3,17 \cdot 10^5 - 7,2 \cdot 10^7$  кл / г образца.

Методами общей бактериологии исследовали штаммы, которые активно накапливали радиоактивный цезий. Изучение культуральных и морфолого-физиологических свойств показало, что часть штаммов представлена аэробными грамположительными, частично кислотоустойчивыми неподвижными палочками, которые с ростом фрагментируют на кокковидные элементы. Колонии шероховатые, гладкие или блестящие слизистые, разнообразной окраски или бесцветные. Этим микроорганизмам присущ IV тип клеточной стенки. В гидролизатах клеток имеется мезо-диапимелиновая кислота, арабиноза, галактоза и липид ZSN-A (свободные миколовые кислоты, экстрагируемые смесью этанол – эфир). На основании вышеперечисленных признаков эти бактерии отнесли к роду *Rhodococcus*.

Микроорганизмы *Acinetobacter* были представлены короткими толстыми палочками, располагающимися парами или в коротких цепочках, неподвижные или обладающие незначительной «дергающейся» подвижностью. Иногда на ранних стадиях развития культуры (4 – 6 ч) наблюдали длинные бесформенные нити, распадающиеся на короткие палочки. Грамвариабельны. Образуют гладкие выпуклые колонии с ровными краями, слегка голубоватые в проходящем свете. С возрастом превращаются в грязноватые колонии, легко отделяющиеся от поверхности среды.

Строгие аэробы, оксидоотрицательные, каталазоположительны. Устойчивы к пенициллину, не разжижают желатину, не образуют нитратредуктазу. На основании этих признаков эту группу организмов отнесли к роду *Acinetobacter*.

Коэффициенты накопления  $^{137}\text{Cs}$  некоторыми выделенными культурами

Шифр культуры	Масса клеток после культивирования, мг	Коэффициент накопления $^{137}\text{Cs}$	Шифр культуры	Масса клеток после культивирования, мг	Коэффициент накопления $^{137}\text{Cs}$
BS1	2,71	1180	BS42	3,68	2800
BS2	3,02	1070	BS43	3,81	1170
BS3	2,64	780	BS44	6,04	450
BS4	3,23	1940	BS45	4,33	1050
BS5	2,77	370	BS46	4,63	3060
BS6	3,53	1440	BS47	5,69	240
BS7	1,99	970	BS48	5,44	1470
BS8	2,96	1600	BS49	7,64	2600
BS9	2,82	570	BS50	8,89	530
BS10	3,11	520	BS51	8,48	1500
BS11	3,07	1400	BS52	9,83	1050
BS12	4,78	4780	BS53	9,79	3620
BS13	3,19	500	BS54	9,48	1900
BS14	3,14	360	BS55	5,82	120
BS15	3,48	520	BS56	6,70	630
BS16	3,89	5130	BS57	7,04	3240
BS17	2,89	760	BS58	6,40	560
BS18	3,50	470	BS59	7,62	1090
BS19	3,93	760	BS60	8,36	1000
BS20	2,84	410	BS61	7,94	740
BS21	3,33	3700	BS62	8,47	1540
BS22	3,40	1450	BS63	7,71	2250
BS23	4,15	1700	BS64	7,89	2650
BS24	4,15	730	BS65	6,72	2010
BS25	4,07	1770	BS66	12,93	2120
BS26	3,14	2070	BS67	10,29	570
BS27	3,16	210	BS68	11,00	330
BS28	3,54	1480	BS69	11,94	890
BS29	3,53	1070	BS70	10,48	3610
BS30	2,75	890	BS71	10,08	1320
BS31	3,34	2960	BS72	13,90	2000
BS32	5,76	1960	BS73	9,65	3280
BS33	4,98	1820	BS74	9,60	730
BS34	5,94	880	BS75	8,96	430
BS35	4,70	780	BS76	9,00	1160
BS36	5,50	640	BS77	9,42	3290
BS37	6,06	2410	BS78	9,68	1920
BS38	5,85	1550	BS79	8,25	1070
BS39	7,78	440	BS80	10,95	1820
BS40	3,92	1240	BS81	11,39	2360
BS41	4,96	1300	BS82	11,60	1200

Значительная часть культур была представлена граммотрицательными подвижными палочками с поступательным движением. Эти культуры строгие аэробы, каталазо- и оксидазоположительны. Часть из них выделяет в культуральную среду флуоресцирующий пигмент. Эти культуры отнесли к роду *Pseudomonas*.

Род *Bacillus* был представлен подвижными грамположительными палочками, со спорой, расположенной в центре клетки или слегка смещенной к одному из полюсов. Культуры аробны, каталазоположительны. Растут при 7 % NaCl, большинство восстанавливает нитраты в нитриты.

Наиболее активное накопление  $^{137}\text{Cs}$  отмечено у представителей родов *Rhodococcus* - BS16 ( $K_d$  5130), BS12 ( $K_d$  4780), BS57 ( $K_d$  3240), BS53 ( $K_d$  3620), BS70 ( $K_d$  3610) и *Bacillus* - BS77 ( $K_d$  3290), BS57 ( $K_d$  5130), BS73 ( $K_d$  3280), BS46 ( $K_d$  3060), BS42 ( $K_d$  2800), BS31 ( $K_d$  2960). При этом культуры накапливали значительное количество биомассы (3 - 10 мг), т.е. накапливаемый цезий не ингибировал рост культур (см. таблицу).

### Обсуждение результатов

Сочетание высоких коэффициентов накопления радиоцезия отдельными представителями *Rhodococcus*, отмеченной в литературе патогенности некоторых их представителей для человека и животных, делает дальнейшие исследования свойств микробных культур объекта «Укрытие» важными и актуальными. Учитывая, что повышенные уровни ионизирующего излучения являются источниками разнообразных мутаций, необходимо более подробное исследование свойств как отдельных микроорганизмов, так и микробных сообществ в объекте «Укрытие».

Установлено, что коэффициенты накопления радиоцезия выделенными микроорганизмами составляют в среднем 3000 - 4000 (формы в среднеактивном состоянии). Селективное накопление радиоцезия культурами, скорее всего, не является ошибкой транспорта [8, 9], так как известно, что ионы цезия способны влиять на активность ферментов микроорганизмов и это влияние прямо противоположно действию ионов калия [10].

Важным с точки зрения экологической опасности является также тот факт, что исследованные бактерии являются спорообразующими с размерами спор около 0,1 - 0,08 мкм [11], а, как известно, субмикронные частицы обладают свойствами проникать через фильтры средств защиты органов дыхания [12]. В условиях дефицита стабильного цезия в специфических биотопах объекта «Укрытие», цезийнакапливающие культуры заменят его радиоактивным. При этом может быть достигнута очень высокая удельная активность по  $^{137}\text{Cs}$  в аэрозолях, а также изменятся миграционные характеристики (подвижность, водорастворимость комплексов цезия с микробными метаболитами, доступность другим членам микробного сообщества) и, соответственно, степень радиационной и экологической опасности.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rybalka V., Klechkovskaja E., Serbinovich V. et al. The microbiological factor and possibilities of radionuclides outwash control, changing of its uptake by plants on an example of the contaminated soils of Chernobyl zone // International Conference, Prague, 11 - 13 Sept., 2001 Crop Science on the verge of the 21-th Century – Opportunities and Challenges: Proceedings of the 50-th Anniversary Conferences. Proceedings. - P. 164 - 167.
2. Рыбалка В.Б., Смирнова Г.Ф., Петелин Г.И. и др. Микробный фактор, топливосодержащие материалы и образование субмикронных частиц в объекте “Укрытие” // Проблеми безпеки атомних електростанцій і Чорнобиля. - 2005. - Вип. 3. - Ч. 1. - С.87 - 97.
3. Практическое руководство по микробиологии // Под ред. Н. С. Егорова. - М.: Изд-во Москов. ун-та, 1976. – 307 с.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д. Г. Звягинцева. - М.: Изд-во МГУ, 1991. –301 с.
5. Tomioka N., Uchiyama H., Yagi O. Caesium accumulation and growth characteristics of *Rhodococcus erythropolis* CS98 and *Rhodococcus* sp. Strain CS402 // Applied and Environmental Microbiology. - 1994. -Vol. 60. – P. 2227 - 2231.

6. *Tomioka N., Uchiyama H., Yagi O. et al.* Kinetic Studies on Cesium in *Rhodococcus erythropolis* CS98 and *Rhodococcus* sp. Strain CS402 // *Biochemistry*. - 1995. - Vol. 59. – No. 12. – P. 2219 - 2222.
7. *Tomioka N., Tanaka M., Uchiyama H. et al.* Recovery of Cs by a Bioaccumulation System Using *Rhodococcus erythropolis* CS98 // *Bioengineering*. - 1998. - Vol. 85. – No. 6. - P. 604 - 607.
8. *Tomioka N., Uchiyama H., Yagi O.* Isolation and characterization of cesium-accumulating bacteria // *Applied and Environmental Microbiology*. - 1992. – Vol. 58, No. 3. - P. 1019 - 1023.
9. *Tomioka, Uchiyama, Yagi et al.* Kinetic Studies on Cesium in *Rhodococcus erythropolis* CS98 and *Rhodococcus* sp. Strain CS402 // *Biochemistry*. - 1995. - Vol. 59. - No. 12. - P. 2219 - 2222.
10. *Плющев В.Е., Степин Б.Д.* Аналитическая химия рублидия и цезия. - М.: Наука. - 1975. - С. 113 - 114.
11. *Определитель бактерий Берджи* / Под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига и др. - 9-е изд., т. 2. - М.: Мир, 1997. - С. 630 - 632.
12. *Бондаренко О.А.* Методы изучения формирования доз облучения от трансурановых элементов (на позднем этапе Чернобыльской аварии). - К.: Наук. думка., 1998. - 134 с.

Поступила в редакцию 13.12.05

## 15 10 СВЯЗЫВАНИЕ РАДИОЦЕЗИЯ МИКРООРГАНИЗМАМИ ИЗ ОБЪЕКТА «УКРЫТИЕ»

**В. Б. Рыбалка, И. Н. Канцева, Г. Ф. Смирнова, Г. И. Петелин, Ю. И. Зимин**

Изучение всех факторов, способных оказывать влияние на экологическую безопасность объекта «Укрытие» представляет важную и актуальную задачу. Важной областью исследований является изучение влияния микроорганизмов на формы содержания радионуклидов в объекте «Укрытие». Из проб грунта (грязи) объекта «Укрытие» выделены микроорганизмы, способные связывать радионуклиды цезия. Описаны их морфолого-культуральные свойства, проведена их первичная идентификация. Большинство микроорганизмов, изолированных из изученных образцов, отнесены к родам *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*. Определены коэффициенты накопления радиоцезия выделенными культурами. Полученные результаты указывают на то, что в объекте «Укрытие» протекают процессы изменения связывания радионуклидов под действием микроорганизмов.

## 15 10 ЗВ'ЯЗУВАННЯ РАДІОЦЕЗІЮ МІКРООРГАНІЗМАМИ З ОБ'ЄКТА «УКРИТТЯ»

**В. Б. Рыбалка, И. М. Канцева, Г. Ф. Смирнова, Г. И. Петелин, Ю. И. Зимин**

Вивчення всіх факторів, здатних здійснювати вплив на екологічну безпеку об'єкта «Укриття» є важливою та актуальною задачею. Важливою областю досліджень є вивчення впливу мікроорганізмів на форми вмісту радіонуклідів в об'єкті «Укриття». Із зразків ґрунту (бруд) об'єкта «Укриття» виділено мікроорганізми, здатні зв'язувати радіонукліди цезію. Описано їх морфолого-культуральні властивості, проведено їх первинну ідентифікацію. Більшість мікроорганізмів, ізольованих із досліджених зразків, віднесено до родів *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*. Визначено коефіцієнти накопичення радіоцезію виділеними культурами. Отримані результати вказують на те, що в об'єкті «Укриття» протікають процеси змінення зв'язування радіонуклідів під дією мікроорганізмів.

## BINDING OF RADIOCAESIUM BY MICROORGANISMS FROM OBJECT "UKRYTTYA"

**V. B. Rybalka, I. N. Kantseva, G. F. Smirnova, G. I. Petelin, J. I. Zimin**

Studying of all factors, capable to influence ecological safety of object "Ukryttya" represents the important and actual problem. The important area of researches is studying influence of microorganisms on forms of radionuclides in object "Ukryttya". From tests of a ground (dirty) of object "Ukryttya" the microorganisms, capable to bind caesium radionuclides are allocated. The morphologic and cultural properties them are described, their primary identification is carried out. The majority of the microorganisms isolated from investigated samples, are related to genera *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*. Radiocaesium accumulation coefficient are determined by the allocated cultures. The received results specify that in object "Ukryttya" processes of change of radionuclides binding under action of microorganisms proceed.