

Список литературы

- 1 Piggot P.J., Hilbert D.W. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2004, Vol. 7, no. 6, pp. 579-586.
- 2 Hengge-Aronis R. Recent insights into the general stress response regulatory network in *Escherichia coli*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2002, Vol. 4, no. 3, pp. 341-346.
- 3 Cheigton W.D., Zambet P.H., Mischer P.A. Circulationg immunocomplexes in infections diseases. *Immunologie*, 1993, Vol. 111, no. 11, pp. 1219-1227.
- 4 Прозоркина, Н. В. Основы микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие для средних специаль-
ных медицинских учебных заведений / Н. В. Прозоркина, Л. А. Рубашкина. – Изд. 6-е, стер. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2012. – 151 с.
- 5 Гавриш, В. Г. Сальмонеллезная инфекция у животных / В. Г. Гавриш. – Ростов-на-Дону : Феникс, 2003. – 576 с.
- 6 Мельников, В. И. Ферменты патогенности и токсины бактерий / В. И. Мельников, М. Г. Гимранов – Москва : Медицина, 2001. – 252 с.
- 7 Пак, С. Г. Сальмонеллез / С. Г. Пак, М. Х. Турьянов, М. А. Пальцев. – Москва : Медицина, 1988. – 304 с.

УДК 579.8:579.62

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКОГО ВЛИЯНИЯ КАТИОНОВ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФАКУЛЬТАТИВНО-АНАЭРОБНУЮ МИКРОФЛОРУ КИШЕЧНИКА КРЫС

Клименко О.П., Филиппова О.А., Сербова В.А.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»,

Оренбург, e-mail: cloud456@mail.ru

Нормофлора пищеварительного тракта играет важную роль в защите организма от токсических воздействий различных субстратов и метаболитов. Она защищает макроорганизм от токсичных соединений, поступающих в организм с пищей, водой и воздухом. Целью нашего исследования являлось определение резистентности представителей нормофлоры кишечника лабораторных крыс в отношении тяжелых металлов. В статье представлены данные свидетельствующие о том, что наиболее чувствительным представителем нормофлоры кишечника по отношению ко всем используемым металлам является *L. acidophilus*. Металлами, проявляющими наименьшую токсичность в отношении *E. coli* являлись железо, цинк, свинец и медь, в отношении *E. faecium*, *E. cloacae* и *L. acidophilus* только свинец и железо. Наиболее токсичным металлом в отношении исследуемых микроорганизмов является кадмий.

Ключевые слова: *E. faecalis*, *E. cloacae*, *E. coli*, *L. acidophilus*, тяжелые металлы, минимальные подавляющие концентрации, фазы роста.

RESEARCH OF THE TOXIC INFLUENCE OF CATIONS OF HEAVY METALS ON THE OPTIONAL-ANAEROBIC MICROFLORA OF INTESTINE RATS

Klimenko O.P., Filippova O.A., Serbova V.A.

FGBOU V Orenburg State University, Orenburg, e-mail: cloud456@mail.ru

Normoflora of the digestive tract plays an important role in protecting the organism from the toxic effects of different substrates and metabolites. It protects the macroorganism from toxic compounds entering the body with food, water and air. The purpose of our article was to determine the resistance of the representatives of the normoflora of the intestines of laboratory rats against heavy metals. The article presents data indicating that the most sensitive representative of the normoflora of the intestine with respect to all used metals is *L. acidophilus*. The metals exhibiting the lowest toxicity with regard to *E. coli* were iron, zinc, lead and copper, only lead and iron for *E. faecium*, *E. cloacae* and *L. acidophilus*. The most toxic metal in regard of the microorganisms under investigation is cadmium.

Keywords: *E. faecalis*, *E. cloacae*, *E. coli*, *L. acidophilus*, heavy metals, minimal inhibitory concentrations, growth phases

В работах, посвященных проблемам загрязнения окружающей среды, на сегодняшний день к тяжелым металлам относят более 40 металлов периодической системы Д.И. Менделеева с атомной массой свыше 50 атомных единиц. По классификации Н.Реймерса, тяжелыми следует считать металлы с плотностью более 8 г/см³ [1-3].

Тяжелые металлы обладают высокой способностью к многообразным химическим, физико-химическим и биологическим реакциям. Часть органических соединений, с которыми связываются металлы, представлена продуктами микробиологической деятельности. Ртуть и другие металлы характеризуются способностью аккумулироваться в звеньях «пищевой цепи». Микроорганизмы почвы могут давать устойчивые к металлам популяции. [4,5].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена следующая цель: изучить влияние катионов тяжелых металлов на представителей факультатив-

но-анаэробной кишечной нормофлоры крыс в условиях *in vitro*.

Для достижения поставленной цели были выдвинуты следующие задачи:

- определить видовой состав микрофлоры лабораторных крыс;
- определить минимальные подавляющие концентрации тяжелых металлов на рост и изучить их влияние на динамику роста микроорганизмов, входящих в состав нормофлоры кишечника лабораторных животных

В качестве материалов выступала факультативно-анаэробная нормофлора лабораторных крыс: *E. faecalis*, *E. cloacae*, *E. coli*, *L. acidophilus*. В качестве источника катионов тяжелых металлов использовались соли с высоким уровнем диссоциации в водных растворах: FeSO₄ – сульфат железа, ZnSO₄ – сульфат цинка, Pb(NO₃)₂ – нитрат свинца, CdSO₄·8H₂O – восьмиводный сульфат кадмия, CuSO₄·5H₂O – пятиводный сульфат меди.

Для определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) тяжелых металлов мы использовали метод последовательных разведений, что позволило нам получить различные концентрации начального 0,02 М/л раствора солей исследуемых металлов.

Получение ряда разведений растворов тяжелых металлов (таблица 1), было необходимо с целью определения ингибирующих и субингибирующих концентраций, в отношении исследуемых микроорганизмов, а также концентраций, которые не оказывают влияния на рост популяции. Это позволило создать оптимальные условия

для культивирования исследуемых микроорганизмов в присутствии солей тяжелых металлов.

Из таблицы следует, что концентрации солей свинца расположенные в анализируемом диапазоне до концентрации 0,005 М/л оказывали бактерицидный эффект на *E. coli* и *E. faecalis*. Такой же эффект оказывали концентрации солей железа, меди и цинка расположенные в анализируемом диапазоне до концентрации 0,0025 М/л (в случае *E. faecalis* до концентрации 0,0025, 0,0003 и 0,0006 М/л соответственно), концентрации кадмия до концентрации 0,0003 М/л (в случае *E. faecalis* до 0,00001 М/л).

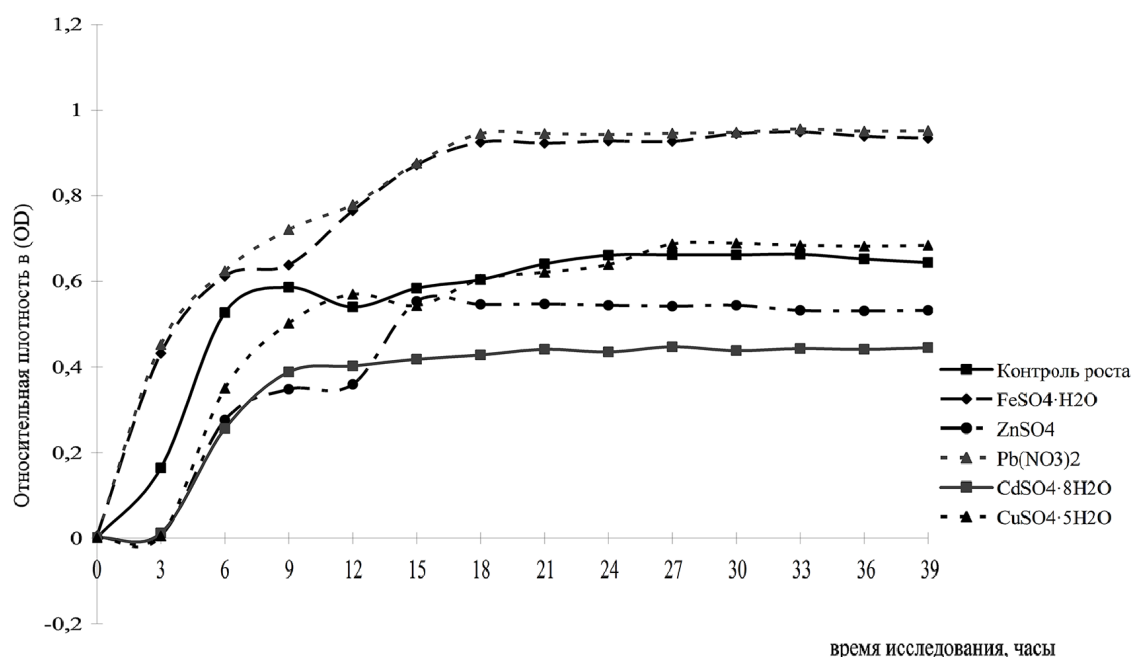
Минимальные подавляющие концентрации тяжелых металлов, влияющие на рост исследуемых микроорганизмов, моль/л

Штамм	Соли металлов	Концентрация							
		0,02	0,01	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,0003	0,0001
<i>E. coli</i>	FeSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	±	+	+	+	+
	ZnSO ₄	-	-	-	±	+	+	+	+
	Pb(NO ₃) ₂	-	-	±	+	+	+	+	+
	CdSO ₄ ·8H ₂ O	-	-	-	-	-	-	±	+
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	-	±	+	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	FeSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	±	+	+	+	+
	ZnSO ₄	-	-	-	-	-	±	+	+
	Pb(NO ₃) ₂	-	-	±	+	+	+	+	+
	CdSO ₄ ·8H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	-	-	-	-	±	+
<i>E. cloacae</i>	FeSO ₄ ·H ₂ O	-	-	±	+	+	+	+	+
	ZnSO ₄	-	-	-	-	±	+	+	+
	Pb(NO ₃) ₂	-	-	±	+	+	+	+	+
	CdSO ₄ ·8H ₂ O	-	-	-	-	-	-	+	+
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	-	-	±	+	+	+
<i>L. acidophilus</i>	FeSO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	±	+	+	+	+
	ZnSO ₄	-	-	-	-	±	+	+	+
	Pb(NO ₃) ₂	-	-	-	±	+	+	+	+
	CdSO ₄ ·8H ₂ O	-	-	-	-	-	-	±	+
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	-	-	-	-	-	±	+

Примечание: «-» – ингибирующие концентрации;

«±» – субингибирующие концентрации;

«+» – концентрации не оказывающие ингибирующего действия на рост популяции



Влияние катионов солей тяжелых металлов на рост *E. coli*

Также представленные данные следуют, что бактерицидный эффект на *L. acidophilus* оказывали концентрации солей железа и свинца, расположенные в диапазоне до концентрации 0,0025 М/л. Концентрации солей цинка оказывали бактерицидный эффект на *L. acidophilus* до концентрации 0,00125 М/л, концентрации солей меди и кадмия до 0,0003 М/л. Концентрации находящиеся ниже перечисленных значений не оказывали негативного влияния на рост популяции данного микроорганизма.

Бактерицидный эффект на *E. cloacae* оказывали концентрации солей железа и свинца, расположенные в диапазоне до 0,005 М/л. Концентрации солей цинка и меди оказывали бактерицидный эффект до 0,00125 М/л, концентрации солей кадмия до концентрации 0,0003 М/л. При меньших концентрациях наблюдался обильный рост данной культуры.

Концентрации солей металлов, располагающиеся между бактерицидными и концентрациями при которых наблюдался рост исследуемых микроорганизмов, являлись бактериостатическими или оказывали субингибирующее действие. Определение данных концентраций позволяло судить о степени биотоксичности катионов исследуемых металлов.

Обобщая и интерпретируя полученные данные можно констатировать, что из всех

исследуемых микроорганизмов наиболее чувствительным штаммом по отношению ко всем используемым металлам является *L. acidophilus*. Металлами, проявляющими наименьшую токсичность в отношении *E. coli* являлись железо, цинк, свинец и медь, в отношении *E. faecium*, *E. cloacae* и *L. acidophilus* только свинец и железо. Наиболее токсичным металлом в отношении исследуемых микроорганизмов является кадмий.

Процесс аккумуляции катионов металлов бактериальными штаммами происходит в стационарной фазе роста. Данный процесс связан с тем, что в данной фазе происходит истощение субстрата и аккумуляция токсичных продуктов, что в свою очередь вынуждает микроорганизмы к поиску других источников энергии, а так же детоксикации среды обитания. На основании изложенного следующим этапом нашей работы являлось изучение роста популяций, с целью выявления оптимального времени роста в периодической культуре, и оценка влияние катионов тяжелых металлов на динамику роста исследуемых микроорганизмов.

Определение оптимального времени роста на периодической культуре осуществлялось путем культивирования исследуемых штаммов в периодической культуре на жидкой питательной среде с измерением оптической плотности каждые 3 часа. Измерения велись до получения не менее трех

одинаковых значений оптической плотности, что свидетельствовало о наступлении стационарной фазы роста. По полученным результатам для каждого штамма были построены кривые роста.

Исходя из полученных данных следует, что лаг-фаза *E. coli* (см. рис.) длилась около 3 часов, *E. faecium* 9 часов, а у *L. acidophilus* – 12 часов. Продолжительность экспоненциальной фазы роста составляла для *E. coli* и *E. faecalis* 6 часов, для *L. acidophilus* 12 часов. Время наступления стационарной фазы происходило у *E. coli* через 24 часа культивирования, у *E. faecium* через 27 часов, у *L. acidophilus* через 36 часов.

Изучение влияния солей тяжелых металлов на динамику роста исследуемых бактерий проводилось аналогично, для этого в среду культивирования вносилась рабочая концентрация исследуемого металла и осуществлялось культивирование до наступления стационарной фазы роста.

Анализ полученных данных свидетельствует, что влияние солей тяжелых металлов на время наступления и продолжительность фаз роста неоднозначно, при этом стимулирующее действие на рост *E. coli* оказывали ионы свинца и железа (см. рис). При этом продолжительность лаг-фазы составляла 2 часа, экспоненциальной фазы – 13 часов, фазы за-

медленного роста – 3 часа. Стационарная фаза наступала через 18 часов культивирования.

Обобщая полученные данные можно констатировать, что наиболее чувствительным представителем нормофлоры кишечника по отношению ко всем используемым металлам является *L. acidophilus*. Металлами, проявляющими наименьшую токсичность в отношении *E. coli* являлись железо, цинк, свинец и медь, в отношении *E. faecium*, *E. cloacae* и *L. acidophilus* только свинец и железо. Наиболее токсичным металлом в отношении исследуемых микроорганизмов является кадмий.

Список литературы

1. Северин, Е. С. Биохимия : учебник / Е. С. Северин. – Москва. : ГЭО-ТАР-МЕД, 2004. – 784 с.
2. Quigley, J.G. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. / J.G. Quigley, Z. Yang, Mark T. Worthington // Cell. – 2004. – V. 118. – № 6. – P. 757-766.
3. Портал фундаментального химического образования России [Электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.chem.msu.ru/>
4. Collins, M. D. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approach for modulating the microbial ecology of the gut / M. D. Collins, G. R. Gibson // Am.J.Clin.Nutr. – 2003. – V. 69. – № 5. – P. 1052-1057.
5. Сизенцов, А.Н. Способность пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* к биоаккумуляции ионов тяжелых металлов в организме лабораторных животных/ Сизенцов А.Н., Барышева Е.С., Бабушкина А.Е.// Российский иммунологический журнал. – 2015.- Т. 9.- № 2(1) (18).- С. 753-755.