

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* В СИСТЕМЕ ДОСТАВКИ ЖЕЛЕЗА

УДК 579.62

Сизенцов А.Н., Кван О.В., Нотова С.В., Гальченко Т.А.

ФГБОУ ВПО Оренбургский государственный университет, г. Оренбург, Россия

THE EFFICIENCY OF APPLICATION OF PROBIOTIC PREPARATIONS ON THE BASIS OF *BACILLUS* BACTERIA IN SYSTEM OF DELIVERY OF IRON

Sizencov A.N., Kvan O.V., Notova S.V., Galchenko T.A.

«Orenburg state university», Orenburg, Russia

Введение

Железо является незаменимым микроэлементом, который участвует в основных жизненно важных функциях, таких как, продуцировании железосодержащих молекул (гемоглобин, миоглобин и др.) и нормальном функционировании железозависимых реакций (продукция интерлейкинов, Т-киллеров, Т-супрессоров, металлоферментов, поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса и др.). Железодефицитные состояния наносят непоправимый «вклад» в нарушение здоровья [2, 5].

Железодефицитные состояния встречаются почти у половины населения земного шара. Выраженный дефицит железа (ДЖ) имеют не менее 4% женщин репродуктивного возраста, от 20 до 30% беременных женщин (от 30 до 50% в конце беременности) и от 1 до 2% мужчин.

Пристальный интерес исследователей к этому элементу связан не столько с распространённостью железа в природе, сколько с участием его в сложных метаболических процессах человеческого организма. Немаловажен тот факт, что концентрация железа регулируется исключительно поглощением, а не выделением.

Самое активное участие в регуляции сорбции и экскреции анионов, катионов, воды принимает микрофлора кишечника. Однако, неоднозначно влияние пробиотиков на минеральный обмен человека и животных. Так, для ряда бактерий потребление железа в организме хозяина затруднено из-за его нерастворимости при нейтральных и слабощелочных значениях pH. Рядом авторов доказано, что пробиотические штаммы способны усиливать эндогенные потери минеральных элементов за счёт инкорпорации и выведения [2].

Металлы по сравнению с другими элементами имеют тенденцию к биоаккумуляции. Известно, что микроорганизмы способны извлекать и концентрировать металлы, в том числе и тяжелые. Также данной способностью обладают микроорганизмы, входящие в состав пробиотических препаратов, в частности бактерий рода *Bacillus* [1, 3, 4, 5].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена цель: изучение эффективности применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* в системе доставки железа.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на модели крыс-самцов линии Wistar, в возрасте 4-х месяцев. Животные содержались в условиях экспериментально-биологической клиники (вивария) Института биоэлементологии Оренбургского государственного университета, в соответствии с рекомендациями [3]. По принципу пар-аналогов были сформированы 7 групп (n=6): контрольная и 6 опытных групп.

Первая контрольная группа находилась на минеральной диете (K0). Выделенные микроорганизмы из пробиотических препаратов культивировались вместе с сульфатом железа в жидкой питательной среде, затем часть выделенных микроорганизмов инактивировали, с помощью автоклавирования. Затем данные растворы задавались лабораторным животным.

Первые три опытные группы – минеральная диета с добавлением сульфата железа и штаммов исследуемых пробиотических препаратов: O₁ – «Ветом-2» (штаммы микроорганизмов) + Fe, O₃ – «Споробактерин» (штаммы микроорганизмов) + Fe, O₅ – «Бактисубтил» (штаммы микроорганизмов) + Fe. Следующие три опытные группы – минеральная диета с добавлением сульфата железа и инактивированных микроорганизмов пробиотических препаратов: O₂ – «Ветом-2» (инактивированные) + Fe, O₄ – «Споробактерин» (инактивированные) + Fe, O₆ – «Бактисубтил» (инактивированные) + Fe. Дозировки пробиотиков соответствовали аннотациям препаратов. Подопытные животные находились в одинаковых условиях содержания.

Экспериментальные исследования на животных проводили в соответствии с Российским Регламентом, (1987) и «The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Nationak Academy Press Washington, D.C. 1996)».

В работе были использованы три пробиотических препарата, основу выбранных препаратов составляют бактерии рода *Bacillus*:

Споробактерин жидкий (культура *Bacillus subtilis* №534) представляет собой самоэлиминирующийся монопробиотик. Суспензия бактерий, выращенная на безлактозной среде, содержит в 1мл 10⁹ КОЕ. Оптимальная дозировка для животных – 10,8 мл/кг корма. Производитель – Бакорен (Россия) (Жданов П.И., 1991).

Ветом-2 содержит иммобилизованную, высушенную споровую биомассу бактерий *Bacillus subtilis* штамм ВКПМ В 7048 и *Bacillus licheniformis* штамм ВКПМ В 7038 и наполнители – сахар или сахарную пудру и крахмал. Не содержит ГМО. В одном грамме препарата содержится не менее 1×10^6 КОЕ (колониеобразующих единиц) живых микробных клеток. Производитель – ООО НПФ «Исследовательский центр», Новосибирская область, пос. Кольцово.

Бактисубтил – твердые желатиновые капсулы молочно-белого цвета, содержащие аморфный порошок бело-сероватого или бело-желтоватого цвета – споры *B.cereus* IP 5832. Со специфическим запахом, при растворении образует гомогенную взвесь беловато-сероватого цвета. Производитель: Франция.

Пробиотические штаммы совместно культивировались с сульфатом железа (II), в течении 24 ч, после чего полученная культура центрифугировалась (3000 об/с в течении 5 минут), с целью отделения клеток от субстрата. Полученную культуру клеток делили на две части: одна из которых – инактивировалась с использованием автоклавирования ($T=121$ °C), а другая была разведена физиологическим раствором в соотношении 1:10. Полученные суспензии задавались лабораторным животным в течении 7 дней, в объеме 1 мл на 1 голову натошак.

Взятие материала проводилось с периодичностью в семь дней (фоновое исследование, седьмой день) путём убоя животных методом декапитацией.

Метод выделения чистой культуры был использован для препарата Ветом-2, который является бинарным и содержит в своей основе два штамма бактерий рода *Bacillus* (*Bacillus subtilis* штамм ВКПМ В 7048 и *Bacillus licheniformis* штамм ВКПМ В 7038) [7].

Для выделения чистой культуры был использован чашечный метод. Принцип метода заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки. Предварительно «Ветом 2» (сухой) растворяли в стерильном физиологическом растворе и производили посев на 1,5% мясопептонный агар (МПА) бактериологической петлей методом истончающего штриха на 4 сектора. Чашку Петри на 24 часа помещали в термостат при $T = 37$ °C. При выделении чистых культур учитывались морфологические признаки колоний, растущих изолированно. Затем производили пересевы бактерий из отдельных колоний на другие чашки Петри со стерильно залитым МПА с последующим инкубированием в течение суток при температуре 37 °C. Пересевы делали до тех пор, пока на чашках отдельно не росли морфологически различные культуры бактерий *B.subtilis* и *B.licheniformis* соответственно [8].

Для определения минимальных подавляющих концентраций сульфата железа на рост бактерий рода *Bacillus*, был использован метод последовательных разведений. Для выполнения данного этапа работы предварительно были приготовлены: стерильная жидкая питательная среда (МПА), стерильные пробирки – по 13 штук для каждой серии разведений, стерильные 0,5 М растворы тяжелых металлов, взвеси культур микроорганизмов (*B.subtilis* 534, *B.subtilis* 3, *B.cereus* IP 5832, *B.licheniformis*) [9].

Для приготовления растворов солей исследуемых металлов взвешивались навески, исходя из расчетов и растворялись в 100 мл дистиллированной воды. Растворы автоклавировались при 121 °C, в течении 15 минут и доводились до значения $pH = 7$. Бациллы из

пробиотических препаратов высевались на 1,5% МПА и инкубировались в термостате 24 часа при $T = 37$ °C [8].

Эксперимент проводился в трех повторностях. В пробирки автоматической пипеткой вносились по 3 мл мясопептонного бульона (МПБ), кроме первой (в первую вносилось 4 мл среды и 1 мл 0,1 М раствора соли тяжелого металла). Таким образом, в первой пробирке был 0,02 М раствор металла. Содержимое первой пробирки тщательно пипетировалось с последующим переносом 3 мл во 2-ую пробирку, из 2-й в 3-ю, из 3-й в 4-ю и так до 10-й, из которой 3 мл удалялось.

В результате титрования, в каждой последующей пробирке содержалась концентрация в двое меньше, чем в предыдущей. Содержимое 11-й пробирки служило контролем роста бактерий, 12-й – контролем стерильности питательной среды, а 13-й контролем стерильности раствора соли металла. Для приготовления каждого разведения использовался стерильный наконечник пипетки. Во все пробирки, кроме 12-й и 13-й, вносилось 30 мкл суспензии микроорганизмов. Суспензии готовились из суточных агаровой культур по стандарту мутности. Посев инкубировали в термостате в течение суток.

Учет результатов проводился визуально, при этом отмечалось наличие роста (сравнивали с контролем роста микроорганизма) или его отсутствие (сравнивали с контролем среды). Затем отмечалась последняя пробирка с полной видимой задержкой роста микробов. Количество сульфата железа в этой пробирке является минимальной подавляющей концентрацией (МПК) для испытуемого штамма.

Для определения оптической плотности бактериальной суспензии с целью дальнейшего построения кривой роста в периодической культуре был использован фотоэлектроколориметрический метод (фотоэлектроколориметр (ФЭК-КФК-2)).

Для проведения данного этапа работы предварительно были приготовлены: стерильные пузырьки объемом 200 мл, стерильная жидкая питательная среда (МПБ), суточные культуры микроорганизмов, стерильные растворы металлов.

Эксперименты проводились в трех повторностях. Бактерии выращивались в МПБ с применением периодического метода культивирования. В 24 пузырьков вносились: питательный бульон, суспензия микроорганизмов и рабочая концентрация тяжелых металлов (при которой микроорганизмы жизнеспособны); 4 пузырька служили контролем (среда с микроорганизмами без добавления растворов металлов).

Измерение оптической плотности бактериальной суспензии проводилось с интервалом в три часа, начиная с нулевого часа, и продолжалось до получения трех приблизительно равных значений, что означало наступление стационарной фазы. В промежутки времени между измерениями пузырьки ставились в термостат при $T = 37$ °C на шейкеры (Shaker) для постоянного перемешивания.

По результатам полученных оптических плотностей с помощью программы Microsoft Excel выстраивались кривые роста в периодической культуре, в том числе в присутствии токсикантов. Каждая точка кривой роста представляет собой среднее значение трех независимых экспериментов.

Для изучения влияния сульфата железа на антибиотикопродуктивность исследуемых микроорганизмов был использован метод агаровых блочков. Предвари-

тельно были приготовлены суточные культуры исследуемых микроорганизмов и тест-организмов, а также стерильный МПА и стерильное пробочное сверло.

Исследуемый микроорганизм высевается «газоном» в чашке Петри на поверхность МПА. После этого исследуемые микроорганизмы инкубируются в течение 72 часов при температуре 37 °С. Стерильным пробочным сверлом (диаметр 2 см) вырезают агаровые блоки, которые переносят в стерильные чашки Петри. В центр каждой чашки помещают по одному блоку, затем в эти же чашки на свободную их часть наливают МПА, с тем расчетом, чтобы уровень был на 1,5 мм ниже уровня блока и производят посев тест-организмов. В качестве тест-организмов использовались *E.coli* и *S.aureus*.

В ходе эксперимента в первый день эксперимента и на 7 день, проводился убой животных путем декаптации. Анализ исследуемых биосубстратов (мышечная, костная ткань и шкура с шерстью) осуществлялся в лаборатории АНО «Центр биотической медицины», г. Москва (аттестат аккредитации ГСЭН.RU.ЦОА.311, регистр. номер в гос. реестре РОСС RU.0001.513118 от 29 мая 2003) с использованием методов атомно-абсорбционной спектрометрии. Пробоподготовка осуществлялась в соответствии с рекомендациями 4.1.1482-03 и 4.1.1483-03, методом микроволнового разложения на приборе Multiwave 3000 (A. Paar).

Статистическая обработка полученного материала проводилась с применением общепринятых методик при помощи приложения «Excel» из программного пакета «Office XP» и «Statistica 6.0», включая определение средней арифметической величины (M), стандартной ошибки средней (m), оценку достоверности различий по Манна-Уитни. Взаимосвязь между исследуемыми признаками анализировали с использованием функции «корреляционный анализ» и «дисперсионный анализ» компьютерной программы AtteStat [4].

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований нами была проанализирована способность бактерий доставки железа в тканях (для этого брали такие биологические материалы, как кости, мышцы и шкура с шерстью лабораторных животных) и с помощью атомно-абсорбционной спектрофотометрии, определяли концентрацию железа в исследуемом биосубстрате.

Из таблицы 1, видно, что в шкуре лабораторных животных наблюдалось достоверное повышение концентрации в II опытной группе, а также в VI опытной группе.

Так в опытной группе O_2 с применением инактивированных микроорганизмов концентрация железа достоверно повысилась на 49,6 % ($p \leq 0,01$), а в группе O_6 на 52,26%, соответственно. В трех опытных группах O_1 , O_3 , O_5 с применением живых микроорганизмов по отношению к фоновым значениям наблюдалось повышение концентрации железа на 28,1%, 24,3% и 30,3%.

При анализе мышечной ткани (мышечная ткань с передних и задних конечностей) экспериментальных животных, было определено, что уровень железа достоверно повышался через 7 дней эксперимента в опытных группах O_2 , O_4 , O_6 с применением инактивированных микроорганизмов на 65,8% ($p \leq 0,01$), 12,5% ($p \leq 0,01$) и 60,6% ($p \leq 0,05$) (см. таблица 2). В опытных группах с применением живых микроорганизмов (O_1 , O_3 , O_5) можно проследить повышение концентрации железа на 41,9%, 12,8% и 29,4%.

При анализе костной ткани (бедренная, берцовая, лопатка, плечевая) исследуемых животных, во II и VI

Таблица 1. Концентрация железа в шкуре лабораторных животных, мкг/кг

Группы	Фоновое исследование	через 7 дней
Концентрация ионов металлов в шкуре		
K_0	4,63±0,06	4,67±0,07
O_1	3,87±0,02	4,96±0,03
O_2	3,79±0,10*	5,67±0,02**
O_3	3,58±0,02	4,45±0,03
O_4	3,23±0,03*	4,87±0,03
O_5	3,59±0,02	4,68±0,02
O_6	3,75±0,03	5,71±0,03

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Таблица 2. Концентрация железа в мышечной ткани лабораторных животных, мкг/кг

Группы	Фоновое исследование	через 7 дней
Концентрация ионов металлов в мышечной ткани		
K_0	3,68±0,03	3,65±0,04
O_1	3,55±0,02	5,04±0,03
O_2	3,87±0,03	6,42±0,04**
O_3	3,66±0,04	4,13±0,04
O_4	3,75±0,04*	4,22±0,04**
O_5	3,77±0,05*	4,88±0,04
O_6	3,71±0,04*	5,96±0,05*

Примечание: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

группах мы наблюдаем также повышение концентрации железа через 7 дней эксперимента на 86,5% и на 88,4% (см. таблица 3). В опытных группах O_1 , O_3 , O_5 также наблюдалось повышение концентрации железа на 44,3%, 33,9% и 49,5%.

Выводы

В результате исследования было выяснено, в качестве доставки железа в ткани лабораторных животных наиболее эффективными являются пробиотические препараты с инактивированными микроорганизмами. Это хорошо видно, исходя из результатов атомно-абсорбционной спектрометрии, где в группах с инактивированными микроорганизмами количество железа превышает количество железа в тканях групп с живыми микроорганизмами. Также, в системе доставки железа наиболее эффективным из исследуемых препаратов является «Ветом-2» (шкура – 49,6%, мышечная ткань – 65,8%, костная ткань – 86,5%), а наименее – «Споробактерин» (шкура – 50,7%, мышечная ткань – 12,5%, костная ткань – 30,08%).

Таблица 3. Концентрация железа в костной ткани лабораторных животных, мкг/кг

Группы	Фоновое исследование	через 7 дней
Концентрация ионов металлов в костной ткани		
K ₀	3,64±0,04	3,85±0,06
O ₁	3,56±0,06	5,14±0,07
O ₂	3,73±0,04	6,96±0,07**
O ₃	3,48±0,06	4,66±0,04
O ₄	3,69±0,04	4,80±0,04
O ₅	3,45±0,06	5,16±0,11
O ₆	3,64±0,06	6,86±0,04**

Примечание: *p < 0,05; **p < 0,01

Работа выполнена при поддержке Президента Российской Федерации, стипендия для молодых ученых и аспирантов

(Конкурс СП-2012; СП-102.2012.4).

Результаты исследований

Загрязнение окружающей среды элементами, относящимися к группе тяжелых металлов, в настоящее время является одной из главных проблем в экологии. Попадая в окружающую среду, а в последствие и в организм человека, тяжелые металлы вызывают ряд губительных последствий нарушающих функционирование как отдельных систем, так и всей экосистемы. Металлы не только отравляют среду обитания, но и способны накапливаться в различных объектах среды. В настоящее время хорошо изучен факт активного накопления металлов, в том числе и тяжелых, различными организмами. Эта способность сильно развита у микроорганизмов, которые способны накапливать металлы в концентрации в 3 раза превышающей таковую в окружающей среде.

Большой интерес вызывает изучение данной способности среди микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов. Пробиотики представляют собой живые микроорганизмы, прием которых в адекватных количествах оказывает оздоровительный эффект на весь организм человека, а в частности, на желудочно-кишечный тракт. В практике широко используются пробиотики на основе бактерий рода *Bacillus*, являющихся самоэлеминирующимися антагонистами. Препараты данного рода обладают такими свойствами как: ярко выраженная антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, высокая ферментативная активность и обладают иммуностимулирующим действием. Помимо этого важным свойством данных бактерий является способность к детоксикации и выведению различных токсических веществ из организма человека, например, таких как тяжелые металлы. Наличие такой способности среди пробиотических препаратов, ставит целью оценить эффективность их применения при отравлении тяжелыми металлами.

Для реализации поставленной цели в качестве объектов исследования нами были использованы 3 пробиотических препарата на основе бактерий рода *Bacillus*. Два из используемых препаратов представлены монокультурами (споробактерин, основу

которого составляет *Bacillus subtilis* 3, бактисубтил – *Bacillus cereus* IP 5832) и один является бинарным препаратом – биоспорин, состоящий из штаммов *Bacillus subtilis* 534 и *Bacillus licheniformis*. В связи с этим предварительным этапом в нашей работе являлось выделение чистых культур из данного препарата, с помощью метода истощающего штриха и дальнейшая их идентификация.

Идентификация чистых культур осуществлялась общепринятыми методами на основании различных свойств микроорганизмов. В соответствии с культуральными и морфологическими особенностями, были выделены два типа колоний. Одни колонии были белесые, круглые, матовые, с обильным ростом, мелкоморщинистые, складчатые с волнистыми краями, легко снимаемые с агара – колонии *B. subtilis* 534 (рисунок 5).

Другие колонии были желтоватые, с менее обильным ростом, тусклой, грубой, морщинистой поверхностью, плохо снимаемые с агара – колонии *B. licheniformis* (рисунок 6).

Полученные колонии также отличались по росту на жидких питательных средах. Так, при культивировании на мясопептонном бульоне рост *B. subtilis* 534 характеризуется появлением белых хлопьев, оседающих на дно, а рост *B. licheniformis* наличием морщинистой пленки иногда с кремовым оттенком.

Изучив совокупность биохимических особенностей, выяснилось, что данные штаммы отличаются по продукции фермента аргининдегидролазы, так *B. subtilis* 534 не продуцирует данный фермент, а для *B. licheniformis* характерна его продукция. В связи с этим для идентификации нами были использованы коммерческие тест-системы фирмы BioMerieux. Для этого в лунки тест-систем вносились суспензия микроорганизмов и осуществлялась инкубация в термостате в течении 24 часов. Учет результата производился визуально по изменению цвета: красная окраска – отрицательный результат (*B. subtilis* 534), желтая – положительный (*B. licheniformis*).

Получение чистых культур исследуемых нами микроорганизмов позволило нам приступить к решению задач нашей работы, первая из которых заключалась в определении минимальных подавляющих концентраций тяжелых металлов на рост исследуемых микроорганизмов.

3.1 Определение минимальных подавляющих концентраций тяжелых металлов на рост бактерий рода *Bacillus*, входящих в состав пробиотических препаратов

Для определения минимальных подавляющих концентраций тяжелых металлов мы использовали метод последовательных разведений, что позволило нам получить различные концентрации начального 0,02 М (в случае свинца 0,04 М) раствора соли металла.

Получение ряда разведений растворов тяжелых металлов, было необходимо для определения концентраций, которые оказывают бактерицидное и бактериостатическое действие на исследуемые микроорганизмы, а также концентраций, которые не оказывают влияния на рост. Это позволит создать оптимальные условия для культивирования исследуемых микроорганизмов в присутствии солей тяжелых металлов.

В пробирках, где среда оставалась прозрачной (сравнивали с контролем среды) и роста не отмечалось, свидетельствовало о том, что разведение соли тяжелого металла оказывает бактерицидное действие. Если же отмечался обильный рост в виде хлопьевидного осадка (сравнивали с контролем роста микроорганизма) то счи-

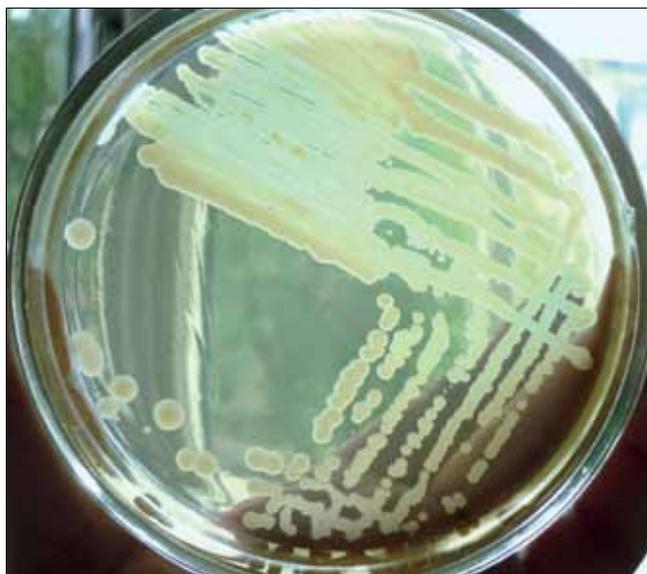


Рис. 5. Культура *B.subtilis* 534, полученная в результате рассеивания пробиотического препарата биоспорина

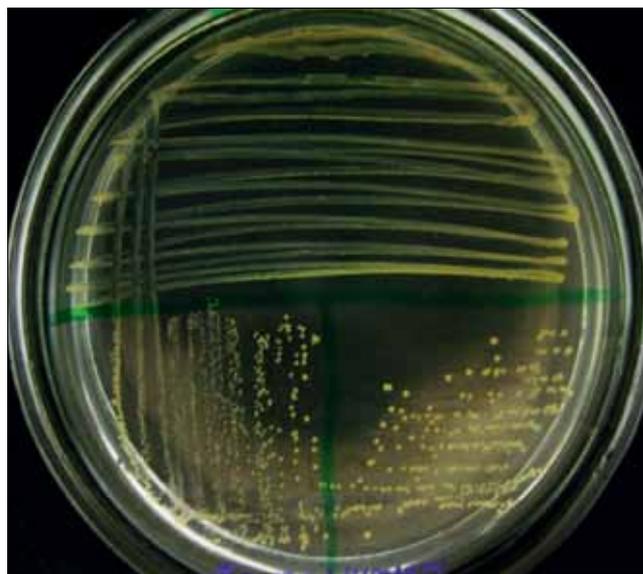


Рис. 6. Культура *B.licheniformis*, полученная в результате посева препарата биоспорина

тали, что данное разведение не оказывает влияния на рост исследуемых микроорганизмов. Разведение, в котором отмечался скудный рост данных бактерий, считали минимальной подавляющей концентрацией (МПК).

Из данных, представленных в таблицах 1 и 2, следует, что концентрации солей железа и цинка расположенные в анализируемом диапазоне до концентрации 0,0025 М оказывают бактерицидный эффект на данные штаммы, за исключением *B.cereus* IP 5832 для которого данный диапазон расположен до концентрации 0,00125 М. Такой же эффект оказывают концентрации соли свинца расположенные в анализируемом диапазоне до концентрации 0,02 М (в случае *B.cereus* IP 5832 до 0,01 М), концентрации кобальта и кадмия до концентрации 0,00004 М (в случае *B.cereus* 0,00002 М), и концентрации марганца до концентрации 0,003 М (в случае *B.cereus* до 0,0001 М). Рост же исследуемых штаммов отмечается при концентрациях, которые находятся выше вышеперечисленных.

В результате анализ таблиц показывает, что из всех исследуемых микроорганизмов самым чувствительным штаммом по отношению ко всем используемым металлам является *B.cereus* IP 5832.

Концентрации солей металлов, располагающиеся между бактерицидными и концентрациями, при которых наблюдается рост исследуемых микроорганизмов

являются бактериостатическими или минимальными подавляющими концентрациями (МПК). Определение данных концентраций позволяет судить о степени токсичности того или иного металла.

Так, исходя из данных, представленных на рисунках 7 и 8 можно сделать вывод, что наиболее токсичными металлами из исследуемых в отношении бактерий рода *Bacillus* являются кобальт и кадмий. Металлом, проявляющим наименьшую токсичность из всех – является свинец.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента были установлены рабочие концентрации солей тяжелых металлов, что позволит создавать оптимальные условия для роста исследуемых штаммов. В качестве рабочей концентрации (РК) в дальнейшем использовали концентрацию на порядок ниже той концентрации, которая характерна для пробиотика с МПК.

3.2 Изучение влияния солей тяжелых металлов на динамику роста бактерий рода *Bacillus*

Как известно, процесс накопления металлов микроорганизмами осуществляется в стационарной фазе роста. Процесс накопления связан с тем, что в данной фазе наблюдается истощение субстрата и накопление токсичных продуктов, что вынуждают бактерии к поиску других источников энергии и детоксикации среды оби-

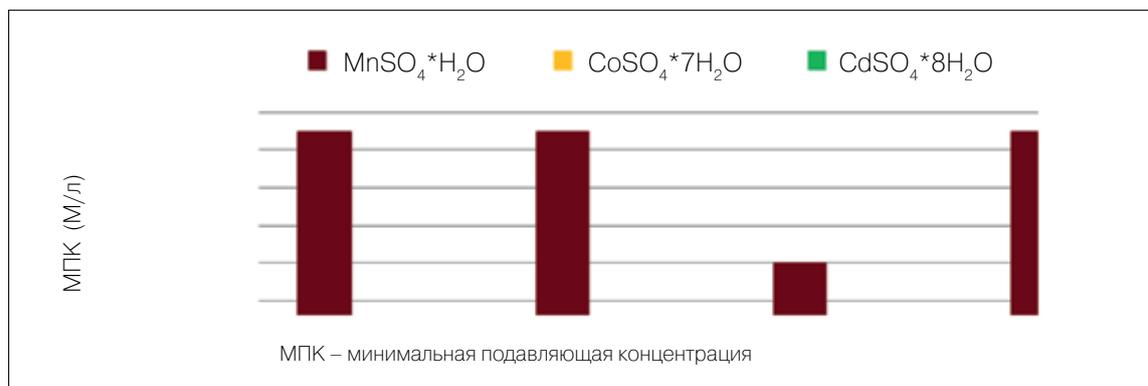


Рис. 7. Различия отдельных штаммов по устойчивости к соли марганца, кобальта и кадмия

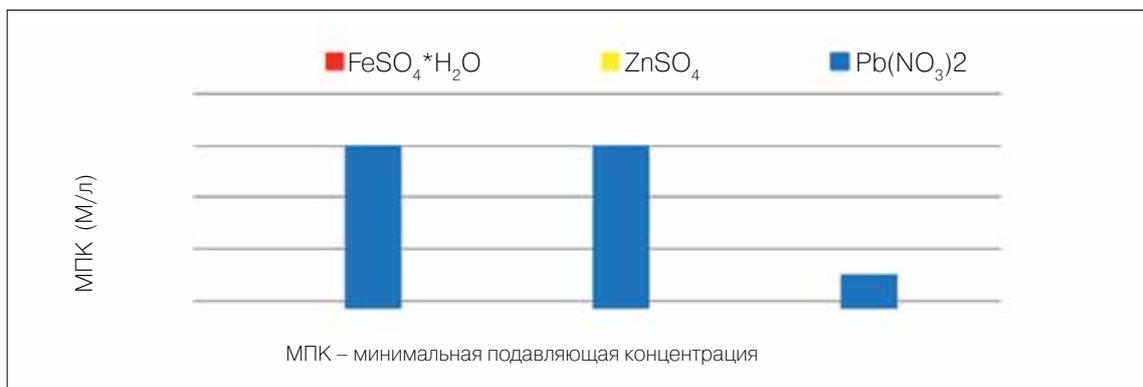


Рис. 8. Различия отдельных штаммов по устойчивости к соли свинца, цинка и железа

тания. В связи с этим следующим этапом нашей работы являлось определение фаз роста, с целью выявления оптимального времени роста на периодической культуре, а также влияние солей 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 и измерении оптической плотности каждые 3 часа, начиная с нулевого часа. Измерения велись до тех пор, пока не было получено не менее трех приблизительно одинаковых значений оптической плотности, что свидетельствовало о наступлении стационарной фазы роста. По полученным результатам для каждого штамма были выстроены кривые роста (рисунок 9).

Исходя из полученных графиков следует, что лаг-фаза у исследуемых штаммов длится примерно 3 часа. Продолжительность экспоненциальной фазы роста для *V. cereus* IP 5832, *V. subtilis* 534 и *V. subtilis* 3 составляет 21 час культивирования, а для *V. licheniformis* – 24 часа. Наступление стационарной фазы для *V. cereus*, *V. subtilis* 534 и *V. subtilis* 3 наблюдается через 24 часа культивирования, для *V. licheniformis* – 27 часов.

Изучение влияния солей тяжелых металлов на динамику роста бактерий рода *Bacillus* проводилось анало-

гично, для этого в среду культивирования вносилась РК исследуемого металла и осуществлялось культивирование до наступления стационарной фазы роста.

Анализ полученных данных показывает, что действие солей тяжелых металлов на время наступления и продолжительность фаз роста неоднозначно. Так стимулирующее действие на рост *V. subtilis* 534 оказывают ионы свинца и железа, что показано на рисунке 10. При этом продолжительность лаг-фазы составляет 2 часа, экспоненциальной фазы – 15 часов, стационарная фаза наступает через 21 час культивирования.

Также в соответствии с рисунком 6 противоположное действие ионам свинца и железа на динамику роста *V. subtilis* 534 оказывают ионы кобальта и кадмия. Они замедляют рост данного микроорганизма и удлиняют лаг-фазу до 4 часов, экспоненциальная фаза длится 27 часов, стационарная фаза наступает через 30 часов культивирования. Остальные два металла (марганец и цинк) влияния на динамику роста не оказывают.

Аналогичным образом соли тяжелых металлов влияют и на динамику роста *V. cereus* IP 5832 и *V. subtilis* 3 (рисунок 11). Исключение составляют ионы кобальта в отношении *V. cereus*. В его присутствии продолжительность лаг-фазы составляет 4 часа, продолжительность экспоненциальной фазы составляет 30 часов,

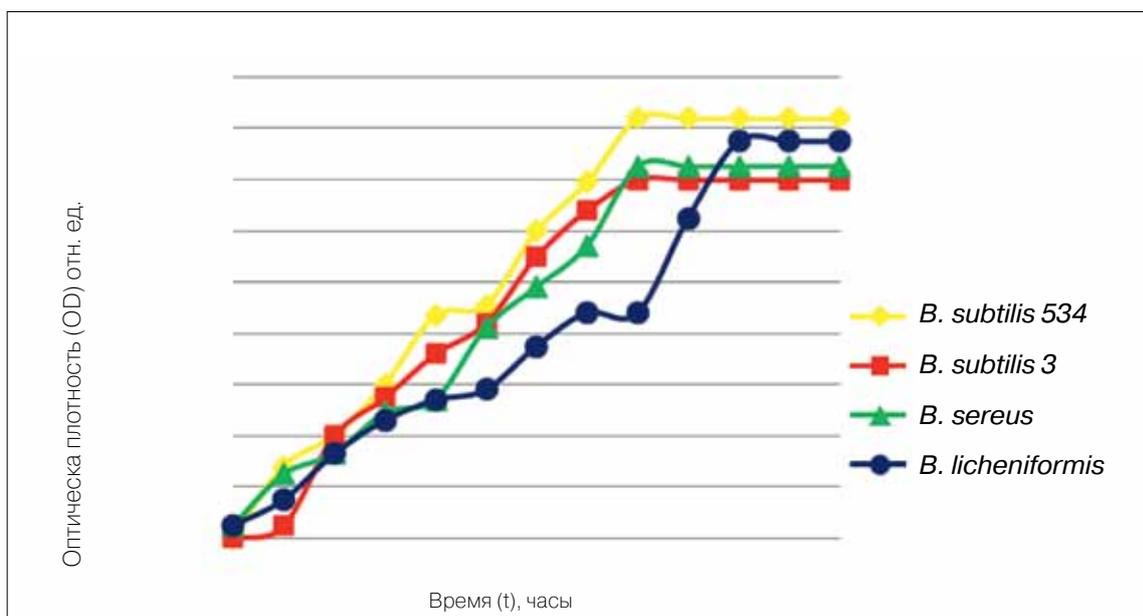


Рис. 9. Кривые роста бактерий рода *Bacillus* в периодической культуре

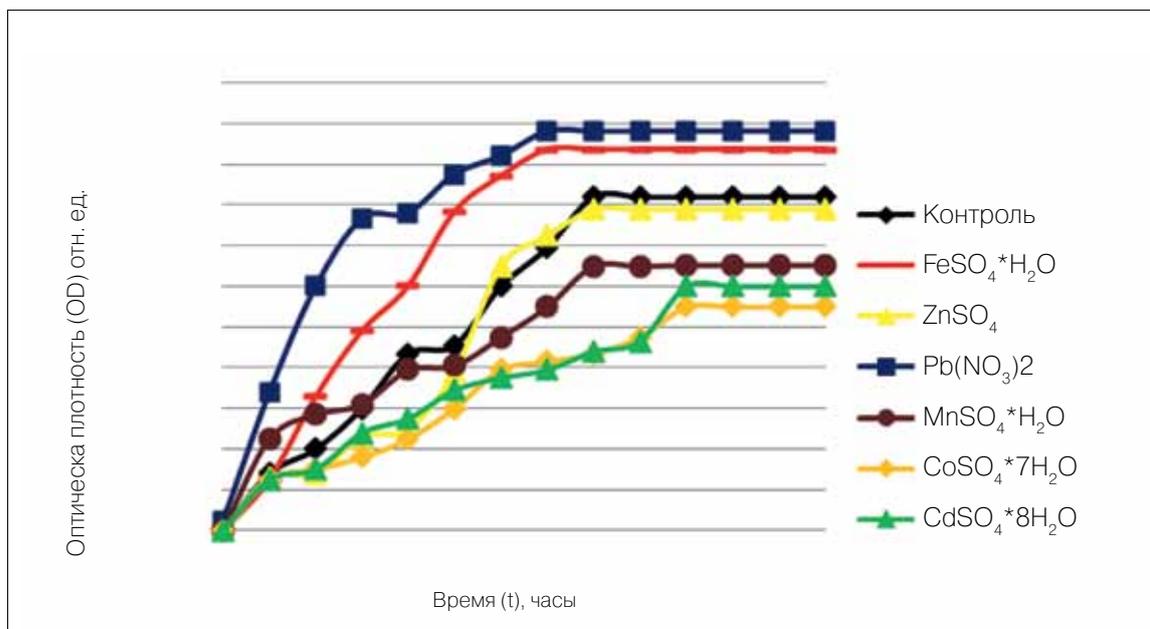


Рис. 9. Кривые роста бактерий рода *Bacillus* в периодической культуре

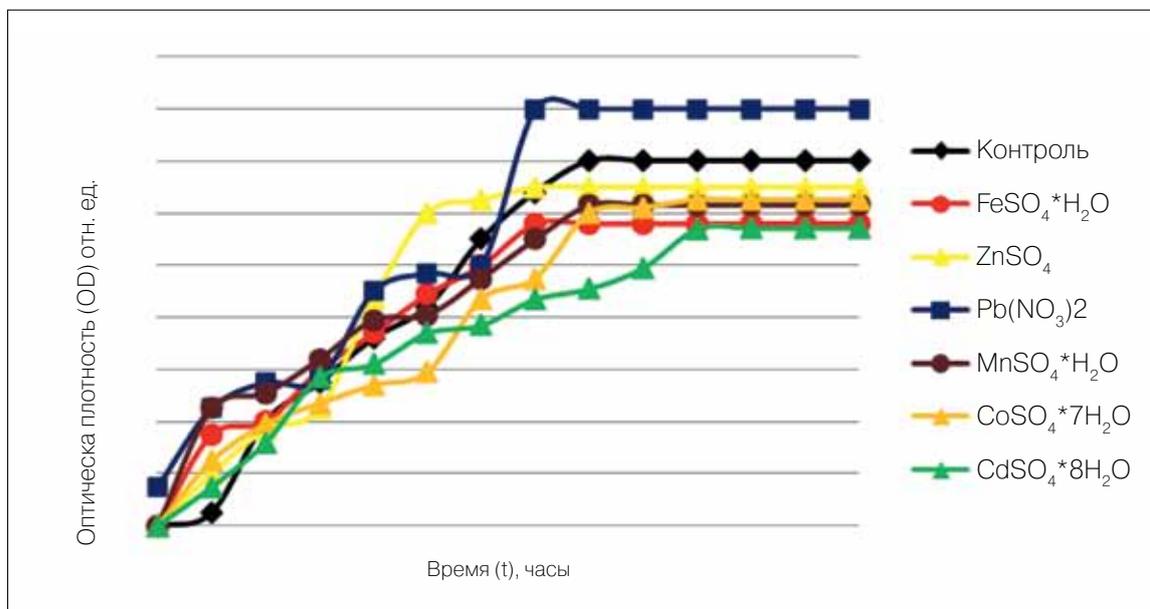


Рис. 10. Кривые роста бактерий рода *Bacillus* в периодической культуре

стационарная фаза наступает через 33 часа культивирования.

В случае *B.licheniformis*, стимулирующее действие на динамику роста, в отличие от трех предыдущих штаммов, кроме ионов железа и свинца оказывают также ионы цинка, что показано на рисунке 12.

Продолжительность лаг-фазы составляет примерно 2 часа, экспоненциальной фазы – 18 часов, стационарная фаза наступает примерно через 24 часа культивирования. Увеличению же времени наступления и продолжительности фаз роста способствует присутствие ионов кобальта и кадмия. Так продолжительность лаг-фазы составляет 4 часа, экспоненциальной фазы – 33 часа, стационарная фаза наступает через 36 часов культивирования. Ионы марганца влияния на динамику роста данного микроорганизма не оказывают.

Расчет Критерия Стьюдента показал, что статистически достоверные изменения значений плотности для всех исследуемых микроорганизмов в присутствии ионов кобальта и кадмия наблюдаются, начиная с экспоненциальной фазы роста, а в присутствии ионов железа, свинца, цинка и марганца по мере приближения и в течение стационарной фазы роста (Приложение А, Б, В, Г).

В результате проведения дисперсионного анализа было выяснено, что значительную степень влияния из используемых металлов на динамику роста *B.subtilis* 534 оказывают ионы свинца, железа, кобальта и кадмия (рисунок 13). Степень влияния ионов двух оставшихся металлов (цинк и марганец) незначительна. Такая же закономерность по результатам дисперсионного анализа наблюдается для *B.subtilis* 3 и *B.cereus* IP 5832 (рисунки 14, 15).

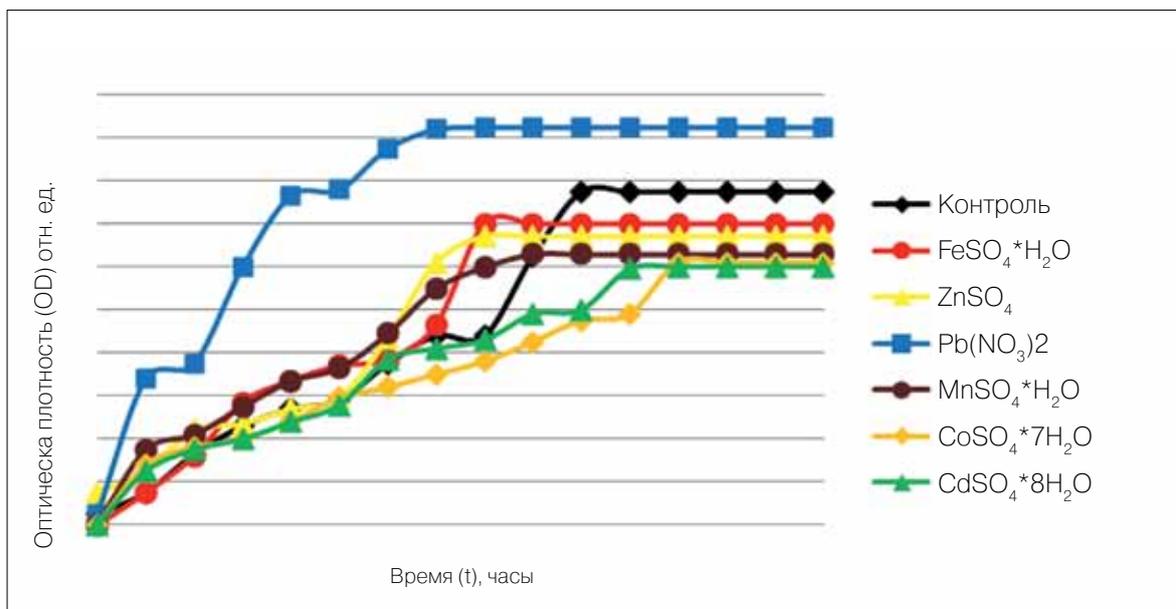


Рис. 11. Кривые роста бактерий рода *Bacillus* в периодической культуре

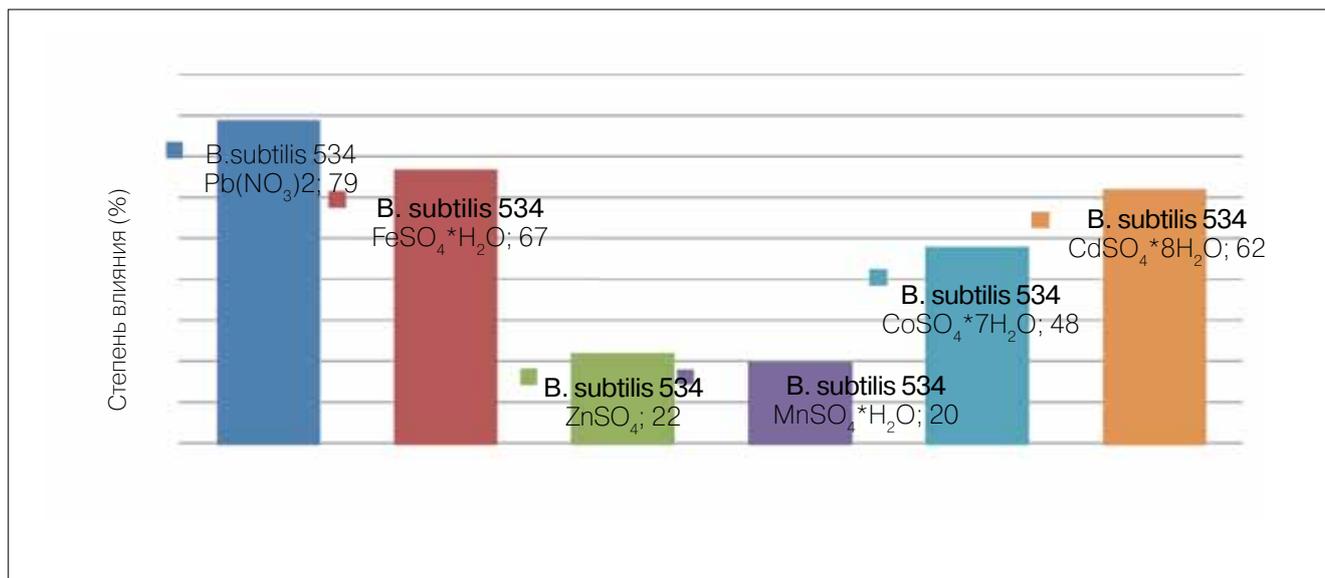


Рис. 12. Кривые роста бактерий рода *Bacillus* в периодической культуре

Данные дисперсионного анализа для *B.licheniformis* характеризуется практически такой же закономерностью, что и для других 3 штаммов, исключение составляет цинк. Так, в соответствии с рисунком 16 присутствие его ионов оказывает значительную степень влияния на динамику роста данного штамма.

В итоге, по результатам дисперсионного анализа все анализируемые металлы по степени влияния на динамику роста исследуемых микроорганизмов можно разделить условно на: металлы, оказывающие высокую степень на динамику роста исследуемых микроорганизмов – свинец, железо и кадмий; металлы, степень влияния которых составляет 50% – кобальт, а *B.licheniformis* в случае еще и цинк; и металлы степень влияния, которых незначительна – цинк и марганец, в случае *B.licheniformis* только марганец. Также, анализируя результаты дисперсионного анализа, мы полу-

чили подтверждение вышеописанных графических данных динамики роста.

Таким образом, в результате эксперимента было установлено, что присутствие различных солей тяжелых металлов по-разному влияет на динамику роста исследуемых микроорганизмов. Не смотря на это, наблюдается общая закономерность во влиянии одного и того же иона металла на все исследуемые микроорганизмы.

Так, присутствие ионов свинца и железа оказывает стимулирующее действие на рост всех исследуемых микроорганизмов, а присутствие ионов кобальта и кадмия угнетает их рост. Присутствие ионов цинка и марганца не оказывает влияния на динамику роста исследуемых штаммов, исключение составляет лишь *B.licheniformis* для которого цинк является стимулятором роста.

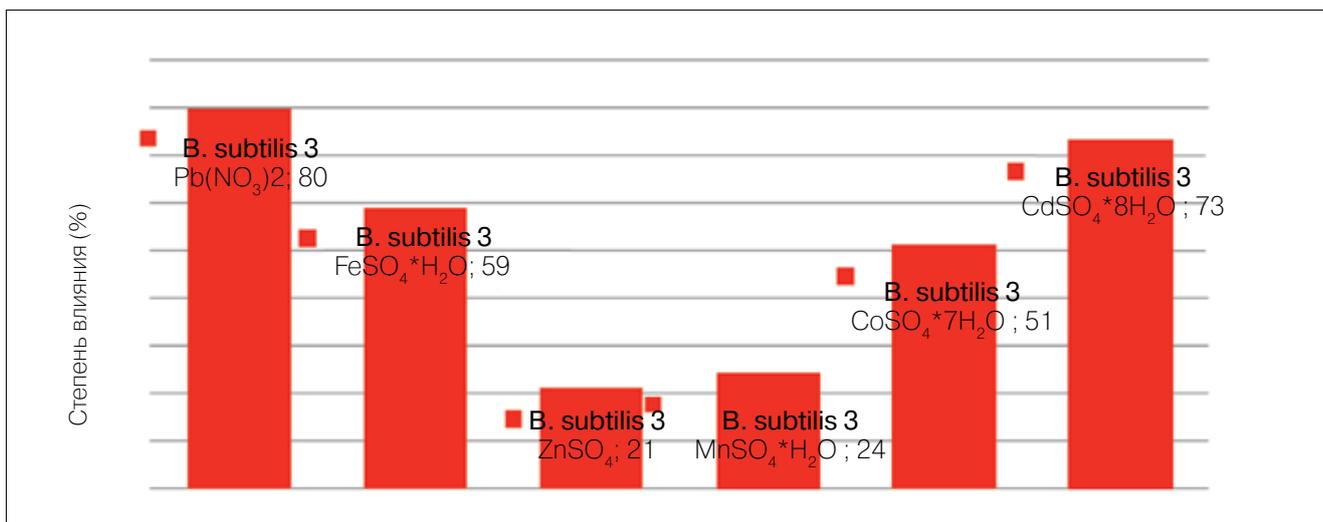


Рис. 13. Кривые роста бактерий рода *Vacillus* в периодической культуре

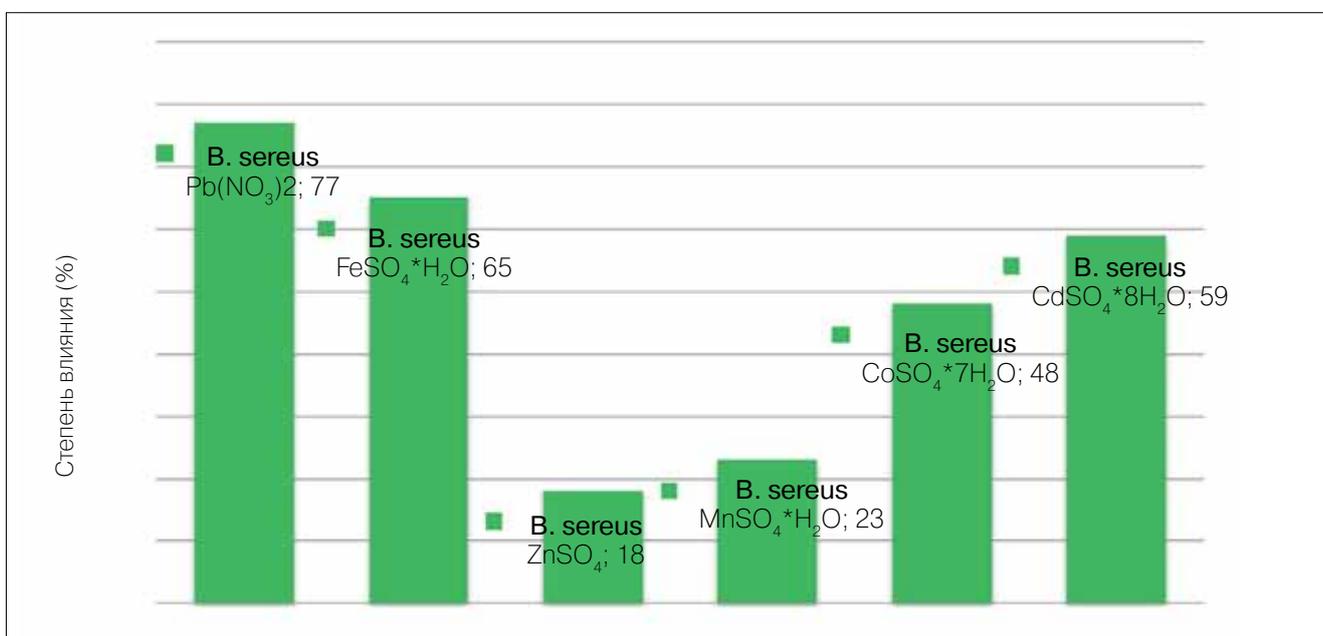


Рис. 14. Кривые роста бактерий рода *Vacillus* в периодической культуре

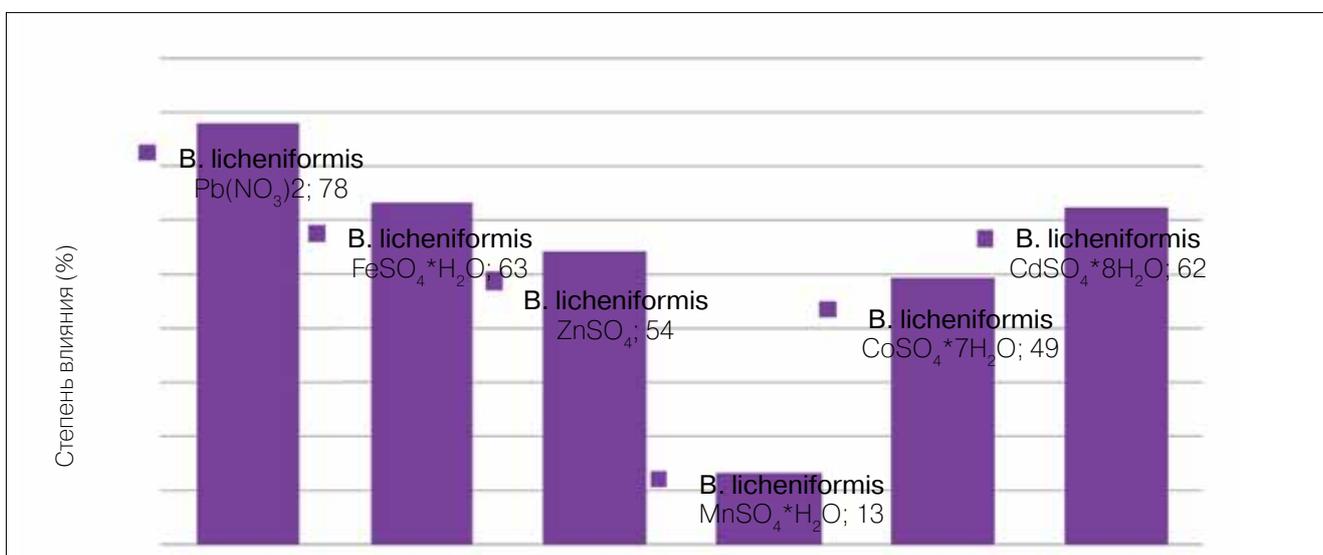


Рис. 15. Кривые роста бактерий рода *Vacillus* в периодической культуре

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Мирошников, С.А. Неоднозначность влияния пробиотиков на обмен токсических элементов в организме кур-несушек / С.А. Мирошников, О.В. Кван, Д.Г. Дерябин // Вестник Оренбургского государственного университета. 2006. № 2. С. 142.
2. Оберлис, Д. Биологическая роль макроэлементов и микроэлементов / Д. Оберлис, Б. Харланд, А. Скальный // СПб. : Наука. – 2008. – С. 542.
3. Садовникова, И.И. Железодефицитная анемия: патогенез, диагностический алгоритм и лечение / Русский медицинский журнал. – 2010. – Т. 18, №9. – С. 540–543.
4. Сизенцов, А.Н. Эффективность применения пробиотических препаратов при интоксикации цинком / Вестник ветеринарии. – 2013. – №2. – С. 34–36.
5. Сизенцов, А.Н. Применение пробиотических препаратов при интоксикации свинцом / Вестник ветеринарии. – 2012. – Т. 63, №4. – С. 147–148.
6. Сизенцов, А.Н. Экологические аспекты аккумуляции свинца и цинка пробиотическими препаратами на основе бактерий рода Bacillus / А.Н. Сизенцов, А.И. Вишняков, А.Е. Новикова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2011. - №4. – С. 7.
7. Шендеров, Б.А. Пробиотики, пребиотики и синбиотики. Общие и избранные разделы проблемы / Б.А. Шендеров // Пищевые ингредиенты. Сырье и добавки. – 2005. – № 2. – С. 23–26.

REFERENCES:

1. Miroshnikov, S.A. Neodnoznachnost' vlijaniya probiotikov na obmen toksicheskikh jelementov v organizme kur-nesushek / S.A. Miroshnikov, O.V. Kvan, D.G. Derjabin // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2006. № 2. S. 142.
2. Oberlis, D. Biologicheskaja rol' makrojelementov i mikrojelementov / D. Oberlis, B. Harland, A. Skal'nyj // SPb. : Nauka. – 2008. – S. 542.
3. Sadovnikova, I.I. Zhelezodeficitnaja anemija: patogenez, diagnosticheskij algoritm i lechenie / Russkij medicinskij zhurnal. – 2010. – T. 18, №9. – S. 540–543.
4. Sizencov, A.N. Jeffektivnost' primenenija probioticheskikh preparatov pri intoksikacii cinkom / Vestnik veterinarii. – 2013. – №2. – S. 34–36.
5. Sizencov, A.N. Primenenie probioticheskikh preparatov pri intoksikacii svincom / Vestnik veterinarii. – 2012. – T. 63, №4. – S. 147–148.
6. Sizencov, A.N. Jekologicheskie aspekty akumuljacji svinca i cinka probioticheskimi preparatami na osnove bakterij roda Bacillus / A.N. Sizencov, A.I. Vishnjakov, A.E. Novikova // Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universtiteta. – 2011. - №4. – S. 7.
7. Shenderov, B.A. Probiotiki, prebiotiki i sinbiotiki. Obshhie i izbrannye razdely problemy / B.A. Shenderov // Pishhevye ingredienty. Syr'e i dobavki. – 2005. – № 2. – S. 23.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены данные по изучению способности пробиотических препаратов на основе бактерий рода Bacillus в системе доставки железа в организм лабораторных животных. В результате исследования было выяснено, в качестве доставки железа в ткани лабораторных животных наиболее эффективными являются пробиотические препараты с инактивированными микроорганизмами. Так, в системе доставки железа наиболее эффективным из исследуемых препаратов является «Ветом-2» (шкура – 49,6%, мышечная ткань – 65,8%, костная ткань – 86,5%), а наименее – «Споробактерин» (шкура – 50,7%, мышечная ткань – 12,5%, костная ткань – 30,08%).

Ключевые слова: железо, дефицит железа, пробиотические препараты, Bacillus.

ABSTRACT

In article data on studying of ability of pro-biotic preparations on the basis of sort Bacillus bacteria in system of delivery of iron are presented to an organism of laboratory animals. As a result of research it was found out, as iron delivery in tissue of laboratory animals the most effective are pro-biotic preparations with the inactivated microorganisms. So, in system of delivery of iron the most effective of studied preparations is «Vetom-2» (a skin – 49,6%, muscular fabric – 65,8%, bone fabric – 86,5%), and least – «Sporobakterin» (a skin – 50,7%, muscular fabric – 12,5%, bone fabric – 30,08%).

Keywords: iron, deficiency of iron, pro-biotic preparations, Bacillus.

Контакты:

Кван О.В. E-mail: kwan111@yandex.ru