

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИНТОКСИКАЦИИ ЦИНКОМ В УСЛОВИЯХ IN VITRO И IN VIVO

Барышева Е.С., Сизенцов А.Н.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: baryshevae@mail.ru

В статье представлены данные по изучению эффективности применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при лечении интоксикации цинком. В ходе проведения экспериментов *in vitro* было установлено, что ионы цинка негативно влияют на все исследуемые штаммы микроорганизмов, при этом наиболее чувствительным из всех исследуемых микроорганизмов является *B. cereus*, а наиболее устойчивым штаммом является *B. subtilis* 534, входящий в состав препарата «Споробактерин», а лучшим биосорбентом ионов цинка является штамм *B. cereus* IP 5832, входящий в состав препарата «Бактисубтил». В ходе проведения экспериментов *in vivo* было установлено, что применение пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* предотвращает развитие патологических процессов в организме животных, о чем свидетельствует то, что во всех опытных группах основные биохимические показатели крови, свидетельствующие не только о процессах детоксикации, но и отвечающие за функционирование обменных процессов, к 21 дню исследования находятся в пределах физиологической нормы. Максимальные значения аккумуляции ионов цинка были зарегистрированы в группе, где в качестве лекарственного средства применялся препарат «Споробактерин», концентрация ионов цинка в тканях данной группы была ниже контрольных значений в среднем на 60,5 %, в то время как аналогичный показатель в группах, где применялся «Бактисубтил» и «Ветом 2», составил 47,9 % и 35,2 %, соответственно.

Ключевые слова: *Bacillus*, интоксикация цинком, Споробактерин, Бактисубтил, биохимические показатели крови, биоаккумуляция.

EXPERIMENTAL REASONS FOR EFFICIENCY OF APPLICATION OF PRO-BIOTIC PREPARATIONS IN CASE OF TREATMENT OF INTOXICATION ZINC IN THE CONDITIONS OF IN VITRO AND IN VIVO

Barysheva E.S., Sizensov A.N.

FGBOU IN "The Orenburg state university", Orenburg, e-mail: baryshevae@mail.ru

In article data on studying of efficiency of application of probiotic preparations on the basis of sort *Bacillus* bacteria in case of treatment of intoxication are provided by zinc. During experiments of *in vitro* it has been established that zinc ions negatively influence all researched strains of microorganisms, at the same time the most sensitive of all researched microorganisms is *B. cereus*, and the most steady strain is *B. subtilis* 534 being a part of the preparation "Sporobakterin", and the best biosorbent of ions of zinc is the strain of *B. cereus* IP 5832 being a part of the preparation "Baktisubtil". During experiments of *in vivo* it has been established that application of probiotic preparations on the basis of bacteria of the sort *Bacillus* prevents development of pathological processes an organism of animals what demonstrates to the fact that in all experienced groups the main biochemical indicators of blood the researches demonstrating about not only processes of a detoxication, but also responsible for functioning of exchange processes by 21 days are in limits of physiological regulation. The maximum values of accumulation of ions of zinc have been registered in group where as medicine the preparation "Sporobakterin" was applied, concentration of ions of zinc in fabrics of this group was below control values on average for 60,5 % while a similar indicator in groups where "Baktisubtil" was applied and "Vetom 2" has constituted 47,9 % and 35,2%, respectively.

Keywords: *Bacillus*, intoxication zinc, Sporobakterin, Baktisubtil, biochemical indicators of blood, bioaccumulation.

Уровень загрязнения окружающей среды различными токсичными соединениями, в частности металлами, неуклонно растет с каждым годом. При этом уровень утилизации остается низким. Загрязнение вод и суши, в первую очередь микроэлементами из группы тяжелых металлов, привело к накоплению вредных и ядовитых веществ в земле и водоемах,

к резкому снижению биопотенциала экосистем и загрязнению пищевых продуктов, в результате чего идет загрязнение внутренней среды организма человека и животных через пищу, воздух, воду [1,4].

Как элементы-следы, некоторые тяжелые металлы (например, медь, селен, цинк) необходимы для поддержания метаболизма человеческого организма. Однако при более высоких концентрациях они могут вести к губительным последствиям.

Металлический цинк и его соединения в производственных условиях поступают в организм главным образом через органы дыхания и частично через пищеварительный тракт в результате заглатывания пыли. Более всего изучено токсическое действие паров цинка и мелкодисперсного аэрозоля, которые образуются в процессе плавления металла оксида цинка. При их вдыхании в значительных концентрациях может возникать профессиональное заболевание – так называемая цинковая, или литейная лихорадка. При хроническом отравлении оксидом цинка могут развиваться атрофические и субатрофические изменения слизистой оболочки верхних дыхательных путей, гипохромная анемия, желудочно-кишечные расстройства, нарушения сна, повышенная утомляемость, шум в ушах, снижение остроты слуха. При длительном воздействии пыли оксида цинка на организм человека возможно развитие медленно прогрессирующего пневмокониоза [2].

Особенностью металлов по сравнению с другими элементами является их тенденция к биоаккумуляции. Известно, что способность концентрировать металлы, в том числе и тяжелые, очень широко распространена в природе среди различных организмов.

Важным является то, что входящие в состав пробиотических препаратов микроорганизмы рода *Bacillus*, являются самоэлеминирующимися антагонистами и способны оказывать антитоксическое действие, проявляющееся в активном выведении токсичных веществ из организма, в частности тяжелых металлов [5].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена цель: изучить эффективность применения пробиотиков на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* при отравлении цинком.

На первом этапе исследования в работе использовались 3 пробиотических препарата: «Ветом 2» на основе *B. subtilis* ВКПМ В 7048 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, «Споробактерин жидкий» – *B. subtilis* 534, и «Бактисубтил» на основе *B. cereus* IP 5832.

В качестве регулирующих факторов в работе использовалась соль $ZnSO_4$ сульфат цинка. При выборе металла исходили из того, что он является одним из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды.

Для решения поставленной цели нами использовались следующие методы: выделения чистых культур, последовательного разведения, фотоэлектроколориметрический и атомно-

адсорбционные методы [3]. Биохимические (сахар, холестерин, мочеви́на, общий белок, аланинаминотрансфераза, билирубин, креатинин, щелочная фосфатаза) показатели крови исследовались в соответствии с общепринятыми методиками.

При распределении животных на группы придерживались общепринятых принципов подбора аналогов, сходных по возрасту (четырёхмесячные крысы), физиологическому состоянию, которое оценивалось по двум параметрам: питание и поведение, находившиеся в пределах физиологической нормы животных, живой массе (200–250 грамм), пол лабораторного животного не имел значения. Важное преимущество белых крыс как лабораторных животных заключается в том, что они довольно устойчивы к инфекционным заболеваниям и дают большой приплод. Вес белых крыс небольшой, разводить их и содержать в условиях вивария несложно, и это позволяет проводить над ними массовые опыты.

С целью проведения исследования из 120 особей было сформировано восемь групп – пять контрольных и три опытных. Первая контрольная группа получала основной рацион (K_0), вторая – основной рацион с добавлением сульфата цинка из расчёта 150 мг/кг веса тела (K_2), третья – основной рацион с добавлением «Споробактерина» (K_3), четвертая – основной рацион с добавлением «Бактисубтила» (K_4), пятая – основной рацион с добавлением «Ветом 2» (K_5). Три опытные группы получали основной рацион с добавлением сульфата цинка и пробиотиков – «Споробактерин» (O_4), «Бактисубтил» (O_5), «Ветом 2» (O_6).

Соль тяжёлого металла задавалась в первый день эксперимента, а пробиотики – с первого по седьмой день. Взятие материала проводилось с периодичностью в семь дней (фоновое исследование, седьмой, четырнадцатый и двадцать первый дни) путём убоя животных методом декапитацией. В целом длительность эксперимента составляла 21 день.

Для определения минимальных подавляющих концентраций сульфата цинка мы использовали метод последовательных разведений, что позволило нам получить различные концентрации начального 0,02 М раствора соли металла.

Определение минимальных подавляющих концентраций было проведено с целью получения данных о количестве металла, которое оказывает бактериостатическое и бактерицидное действие. Полученные данные свидетельствуют о том, что максимальную устойчивость в отношении действия сульфата цинка проявляет *B. licheniformis* (0,00125 М), а наиболее чувствительным в отношении исследуемой соли оказался *B. subtilis* (0,00015625 М), оба штамма входят в состав препарата «Ветом 2». Уровень резистентности *B. subtilis* 534 находился на достаточно высоком уровне и составил 0,000625 М. В отношении *B. cereus*, являющегося основой препарата «Бактисубтил», оказался довольно токсичным, и субингибирующая концентрация составила 0,0003125 М.

Как известно, процесс накопления металлов микроорганизмами осуществляется в стационарной фазе роста. Это связано с тем, что во время жизни микроорганизмов происходит накопление токсичных продуктов, а также истощение субстрата, что вынуждает бактерии приступить к поиску других источников энергии, но и к детоксикации среды обитания. 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 измерения оптической плотности каждые 3 часа. По полученным результатам для каждого штамма были выстроены кривые роста (рисунок 1).

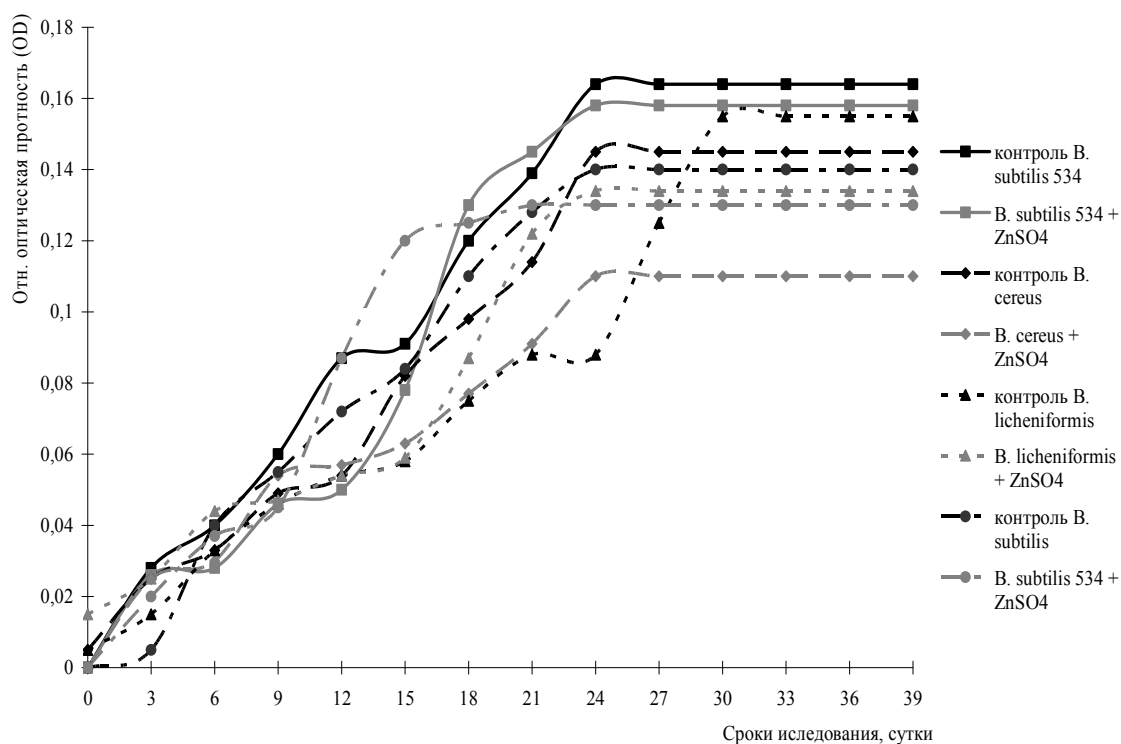


Рис. 1. Кривые роста бактерий рода *Bacillus* в периодической культуре (контроль роста и рост в присутствии сульфата цинка)

Представленные на графике данные свидетельствуют о том, что ионы цинка негативно влияют на все исследуемые штаммы микроорганизмов, при этом наиболее чувствительным из всех исследуемых микроорганизмов является *B. cereus*, а наиболее устойчивым штаммом является *B. subtilis* 534, входящий в состав препарата «Споробактерин». Также в ходе эксперимента было установлено, что присутствие избыточного содержания ионов цинка не влияет на время наступления стационарной фазы.

Следующим и основным этапом нашей работы являлось определение количества металлов, аккумулируемых исследуемыми бактериями из питательной среды.

Количественное определение металлов осуществлялось с помощью атомно-абсорбционного метода, и анализу подвергались как биомасса, так и супернатант. Для этого в среду для культивирования вносился один из анализируемых металлов в рабочих концентрациях и осуществлялось культивирование до наступления стационарной фазы роста. По окончании культивирования пробы подвергались обработке и анализировались на атомно-абсорбционном спектрофотометре (ААСФ) (рисунок 2).

Наиболее активно из всех используемых штаммов ионы цинка аккумулирует штамм *B.cereus* IP 5832, на втором месте находится *B.subtilis* 534. Показатели накопления ионов цинка для штаммов *B. subtilis* ВКПМ В 7048 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038 ниже, чем у двух предыдущих штаммов, и имеют примерно одинаковые значения.

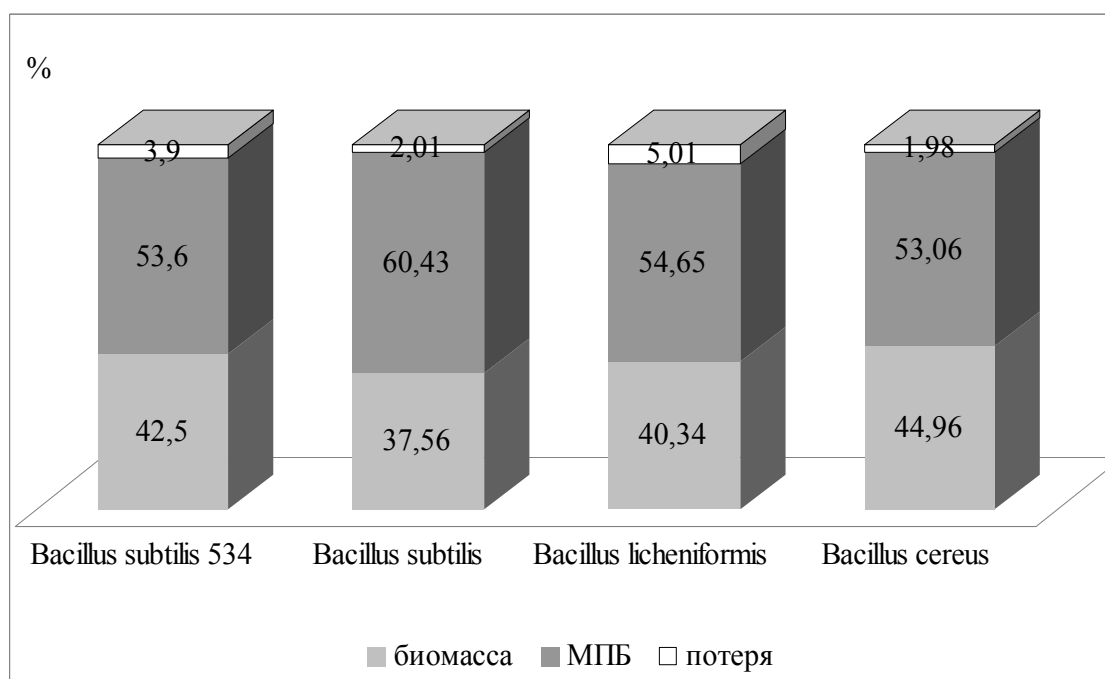


Рис. 2. Содержание цинка в биомассе бактерий рода *Bacillus* и в супернатанте

Из полученных данных следует, что лучшим биосорбентом ионов цинка является штамм *B.cereus* IP 5832, входящий в состав препарата «Бактисубтил». Значительных различий в значениях накопления ионов цинка между исследуемыми штаммами не наблюдается.

Для оценки критериев эффективности применения пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* при интоксикации цинком нами было произведено исследование биохимических показателей сыворотки крови, с целью оценки влияния как тяжелых металлов, так и самих микроорганизмов, входящих в состав пробиотиков, на обменные процессы, а также изучение их способности предотвращать негативное влияние

высоких концентраций ионов цинка на внутренние органы, отвечающие за детоксикацию различных соединений.

Для реализации поставленной цели нами был произведен отбор образцов сыворотки крови от экспериментальных животных с кратностью в 7 дней, а именно – фоновое исследование, седьмой день, четырнадцатый день и двадцать первый день эксперимента.

Одним из критериальных биохимических показателей крови эффективности лечения интоксикации цинком является определение концентрации щелочной фосфатазы в сыворотке крови (рисунок 3).

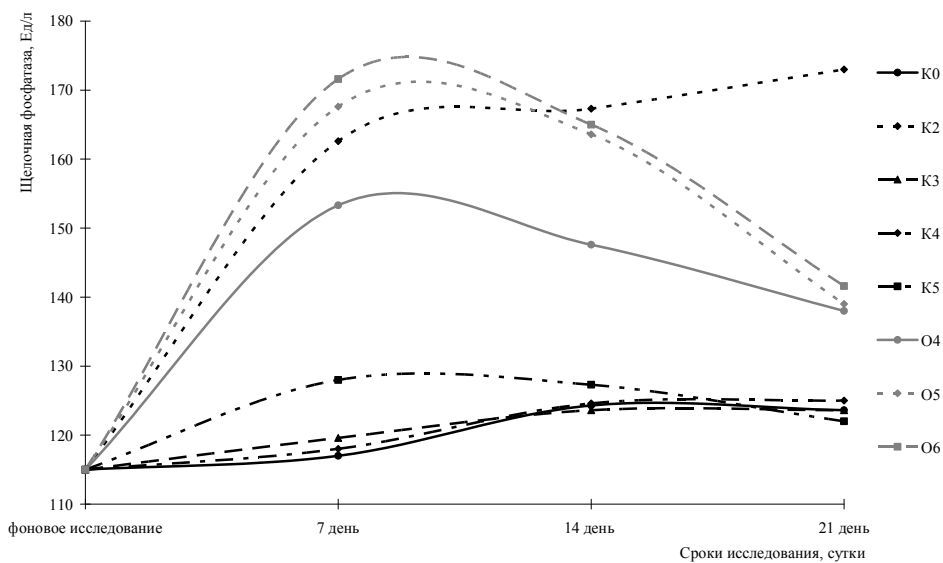


Рис. 3. Динамика концентрации щелочной фосфатазы в организме экспериментальных животных при интоксикации цинком

Представленные данные свидетельствуют о том, что пиковые концентрации щелочной фосфатазы при лечении интоксикации цинком во всех опытных группах регистрировались на 7 день эксперимента, при этом в группах O₅ и O₆ уровень данного показателя превышал контрольные значения. На 14 день эксперимента содержание щелочной фосфатазы во всех опытных группах было ниже контроля интоксикации цинком, и к 21 дню концентрация изучаемого показателя находилась примерно на одном уровне во всех опытных группах, однако их концентрация значительно превышала значения общего контроля, но в то же время была ниже показателя группы контроля металла.

Анализ данных концентрации общего билирубина (рисунок 4) в сыворотке крови лабораторных животных свидетельствует о том, что на 7 день исследования во всех опытных группах зафиксировано значительное увеличение данного показателя по сравнению с

фоновым исследованием, при этом максимальные значения были зарегистрированы в группе O₆.

На 14 день эксперимента в группах O₅ и O₆ отмечается снижение уровня билирубина ниже значений контроля металла, а в группе O₄ данный показатель незначительно увеличился по сравнению с предыдущим исследованием. К 21 дню содержание билирубина во всех опытных группах снизилось, но при этом его концентрация значительно превышала показатели общего контроля.

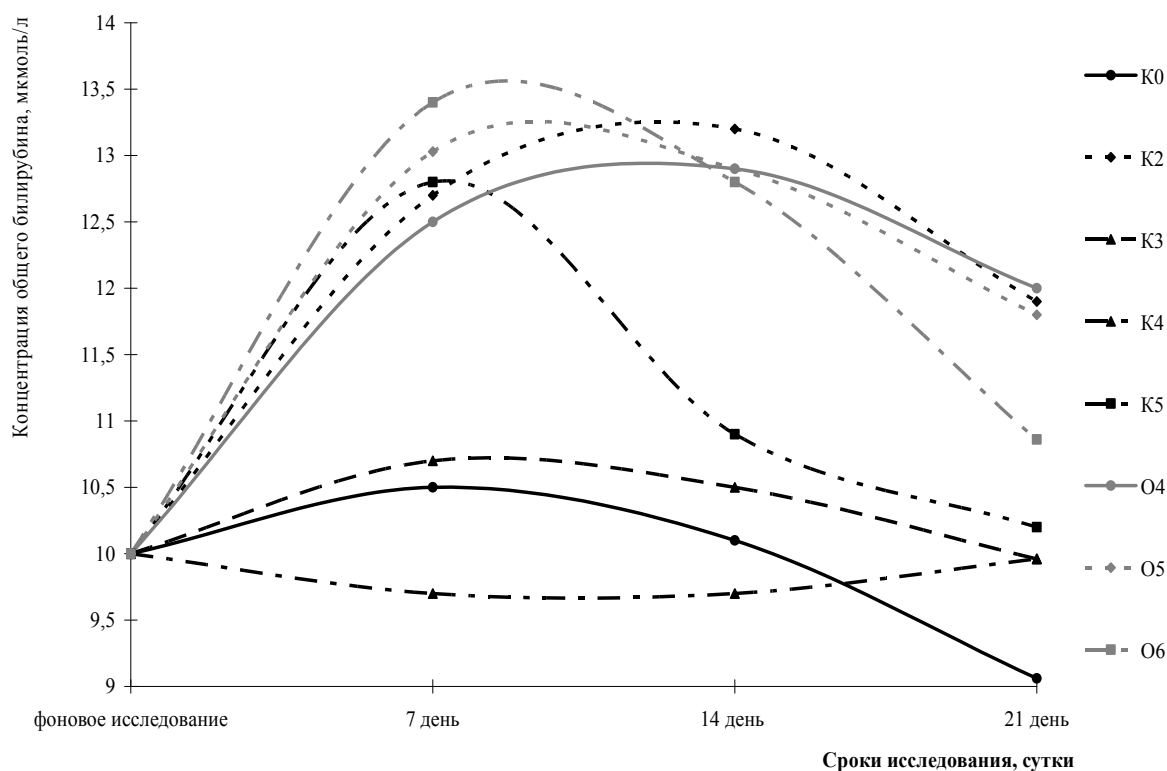


Рис. 4. Динамика концентрации общего билирубина в организме экспериментальных животных при интоксикации цинком

Исходя из вышеизложенного, следует, что применение пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* предотвращает развитие патологических процессов в организме животных, о чем свидетельствует то, что во всех опытных группах основные биохимические показатели крови, свидетельствующие не только о процессах детоксикации, но и отвечающие за функционирование обменных процессов, к 21 дню исследования либо находятся в пределах физиологической нормы, либо имели более низкие показатели по сравнению с группой контроля интоксикации цинком.

Нами проанализирована способность бацилл к накоплению цинка в тканях (для этого брали такие биологические материалы, как кости, мышцы и шкура лабораторных животных) с помощью атомно-абсорбционной спектрометрии.

В эксперименте по изучению эффективности применения пробиотиков на основе спорообразующих бактерий рода *Bacillus* при интоксикации ионами цинка было установлено, что наибольшей аккумулирующей способностью по отношению к ионам цинкам обладает костная и мышечная ткань.

Наиболее высокие показатели аккумуляции ионов цинка были зарегистрированы в опытной группе О₄ (добавление цинка и препарат «Споробактерин»), что свидетельствует о том, что в условиях *in vivo* при применении цинка наиболее эффективным пробиотиком является «Споробактерин» на основе бактерий *B. subtilis* 534. Концентрация ионов цинка в тканях данной опытной группы была ниже контрольных значений в среднем на 60,5 %, в то время как аналогичный показатель в группах, где применялся «Бактисубтил» и «Ветом 2», составил 47,9 % и 35,2 %, соответственно.

Список литературы

1. Калюжный Ю.И. О состоянии и об охране окружающей среды Оренбургской области в 2010 году / Ю. И. Калюжный // Государственный доклад. – 2010. – С. 53-54.
2. Мухина Г. Клиническое значение нарушений метаболизма цинка. / Г. Мухина [и др.]. – Гастроэнтерология, Т. 3. – Москва: Изд-во «Медицина», 2005. – С.37-39.
3. Сизенцов А.Н. Аккумуляция тяжелых металлов пробиотическими препаратами на основе бактерий рода *Bacillus* в условиях *in vitro* / А.Н. Сизенцов, Т.А. Гальченко, Ю.И. Мартынович // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – № 216. – С. 303-307.
4. Холопов Ю.А. Тяжелые металлы как фактор экологической опасности: методические указания к самостоятельной работе по экологии для студентов / Ю.А. Холопов. – Самара: Изд-во СамГАПС, 2003. – 42 с.
5. Reid G. Probiotics for the developing world / G. Reid // Clin Gastroenterol. 2000, no. 3, pp. 40-43.