

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА РОСТ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *E. COLI M-17*, *E. FAECIUM*, *L. ACIDOPHILLUS*, *L. BULGARICUS LB-51* И БАКТЕРИИ РОДА *BACILLUS* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

В данной работе была рассмотрена устойчивость различных пробиотических штаммов микроорганизмов к тяжелым металлам в условиях *in vitro*. Изучено влияние тяжелых металлов на фазы роста микроорганизмов.

Ключевые слова: пробиотики, *Bacillus*, фазы роста, тяжелые металлы.

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].

Особенностью металлов по сравнению с другими элементами является их тенденция к биоаккумуляции.

Термин «тяжелые металлы» связан с высокой относительной атомной массой. В связи с этим к этой группе относят элементы масса атомов, которых составляет свыше 50 атомных единиц. Также одним из признаков, которые позволяют относить металлы к тяжелым, является их плотность. По литературным данным к тяжелым металлам отнесены элементы, плотность которых более 5 г/см³. Если исходить из этого показателя, тяжелыми следует считать 43 из 84 металлов [1].

На сегодняшний день безоговорочно к числу токсичных металлов относят только кадмий, свинец, ртуть и сурьму. Деятельность же значительной части тяжелых металлов в биологических системах различна. Справедливо утверждение о том, что нет вредных веществ, есть вредные концентрации [4].

Способность концентрировать металлы, в том числе и тяжелые, очень широко распространена в природе среди различных организмов. Настоящими «рекордсменами» по извлечению тяжелых металлов из окружающей среды являются микроорганизмы

Большой интерес вызывает изучение данной способности среди микроорганизмов, входящих в состав пробиотических препаратов, при этом наибольший интерес представляют бактерии рода *Bacillus*, являющиеся самоэлеминирующимися

антагонистами. Пробиотические препараты обладают такими свойствами как: ярко выраженная антагонистическая активность в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, высокая ферментативная активность, обладают иммуностимулирующим действием [4].

На основании вышеизложенных данных перед нами была поставлена цель: Влияние тяжелых металлов на рост пробиотических штаммов *Escherichia coli M-17*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus LB-51* и бактерий рода *Bacillus* в условиях *in vitro*.

Исходя из поставленной цели были определены следующие задачи: 1) определить МПК тяжелых металлов для пробиотических штаммов микроорганизмов; 2) изучить влияние тяжелых металлов на фазы роста микроорганизмов в условиях *in vitro*.

Для решения поставленных задач в работе использовались 6 пробиотических препаратов:

1. Препарат «Бактисубтил» твердые желатиновые капсулы молочно-белого цвета, содержащие аморфный порошок бело-серо-голубого или беложелтоватого цвета – споры *B.cereus* IP 5832.

2. Препарат «Ветом 2», иммобилизованная, высушенная споровая биомасса бактерий *B. subtilis* штамм ВКПМ В 7048 и *B. licheniformis* штамм ВКПМ В 7038, наполнители – сахар или сахарная пудра и крахмал.

3. Препарат «Ветом 1.1», содержит пробиотические микроорганизмы – *B. subtilis* штамм ВКПМ В 7092 и наполнитель – экстракт кукурузный, крахмал картофельный, сахарная пудра.

4. Препарат «Колибактерин». Лиофильно высушенная в среде культивирования с добавлением сахарозо-желатозо-желатиновой среды микробная масса живых бактерий *E. coli M-17*.

5. Препарата «Линекс». 1 капсула содержит не менее 1,2 г 10⁷ живых молочнокислых лиофилизированных бактерий *L. acidophilus*, *B. infantis*, *E. faecium* вспомогательные вещества – лактоза, крахмал картофельный.

6. Препарат «Гастрофарм». Выпускается препарат в виде таблеток, каждая из которых содержит жизнеспособные лактобациллы *L. bulgaricus* LB-51 и биологически активные продукты их жизнедеятельности.

В качестве регулирующих факторов в работе использовались соли тяжелых металлов: FeSO_4 – сульфат железа, ZnSO_4 – сульфат цинка, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ – нитрат свинца, MnSO_4 – сульфат марганца, CoSO_4 – сульфат кобальта и CdSO_4 – сульфат кадмия.

При выборе таких металлов как свинец, кадмий и кобальт исходили из того, что они являются наиболее распространенными (в случае свинца) и наиболее опасными (в случае всех металлов) загрязнителями окружающей среды. Выбор остальных был связан с тем, что они находились в одном ряду или в одном порядке периодической системы Менделеева со свинцом, кобальтом и кадмием, а также косвенно тем, что в повышенных концентрациях способны давать токсический эффект.

Предварительно из бинарных препаратов производилось выделение чистых культур микроорганизмов. С этой целью после выделения изолированных колоний проводилась дальнейшая идентификация полученных культур клеток по морфологическим и биохимическим характеристикам по общепринятым методам (для определения биохимических свойств использовали коммерческие тест-системы фирмы BioMerieux – Франция).

Для выделения и культивирования так же использовались МПА и МПБ, Лактобакагар и жидкая среда для культивирования лактобактерий.

Для определения минимальных подавляющих концентраций тяжелых металлов на исследуемые штаммы микроорганизмов использовали метод последовательных разведений. Эксперимент проводился в трех повторностях. В пробирки вносили по 3 мл мясопептонного бульона (МПБ), кроме первой (в первую вносили 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 пробир-

ки 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 агаровых культур по стандарту мутности. Посев инкубировали в термостате в течение суток.

Учет результатов проводился визуально, при этом отмечалось наличие роста (при сравнении с контролем роста микроорганизма) или его отсутствие (при сравнении с контролем среды). Затем отмечалась последняя пробирка с полной видимой задержкой роста микробов. Количество солей тяжелых металлов в этой пробирке является минимальной подавляющей концентрацией (МПК) для испытуемого штамма (таблица 1).

В ходе проведенных исследований было установлено, что наиболее токсичными из исследуемых металлов в отношении всех пробиотических штаммов микроорганизмов являются – кобальт и кадмий. Металлом, проявляющим наименьшую токсичность, является – свинец

При изучении влияния тяжелых металлов на рост исследуемых микроорганизмов определяли оптическую плотность бактериальной суспензии на фотоэлектроколориметре (ФЭК-КФК-2) с интервалом на 3 часа с целью дальнейшего построения кривой роста в периодической культуре.

Эксперименты проводились в трех повторностях. 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 (таб-

Таблица 1. Определение минимальных подавляющих концентраций солей тяжелых металлов на рост исследуемых микроорганизмов

Исследуемые штаммы	МПК солей тяжелых металлов, М/л						
	Fe	Zn	Pb	Mn	Co	Cd	Cu
<i>E. coli</i> M-17	0,0025	0,0025	0,005	0,005	0,000625	0,0003	0,0025
<i>E. faecium</i>	0,0025	0,00062	0,005	0,005	0,00062	0,00001	0,0003
<i>L. acidophilus</i>	0,0025	0,00125	0,0025	0,0025	0,00125	0,0003	0,0003
<i>L. bulgaricus</i> LB-51	0,00062	0,00062	0,00125	0,0003	0,0003	0,0001	0,00007
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В 7048	0,005	0,00031	0,02	0,00031	0,00125	0,00002	
<i>B. subtilis</i> ВКПМ В 7092	0,00125	0,00015	0,005	0,0025	0,00125	0,000001	

Таблица 2. Влияние тяжелых металлов на рост микроорганизмов

Исследуемые штаммы	<i>E. coli M-17</i>			<i>E. faecium</i>			<i>L. acidophilus</i>			<i>L. bulgaricus LB-51</i>			<i>B. subtilis 534</i>			<i>B. subtilis ВКПМ 7048</i>		
	Фазы роста																	
	log	ex	C	log	ex	C	log	ex	C	log	ex	C	log	ex	C	log	ex	C
Контроль	0	3	24	0	9	27	0	21	36	0	24	36	0	3	24	0	3	24
Fe	0	3	18	0	3	24	0	18	33	0	21	33	0	3	30	0	3	30
Zn	0	3	18	0	9	27	0	21	36	0	24	36	0	3	27	0	6	24
Pb	0	3	18	0	3	24	0	18	33	0	21	33	0	3	27	0	3	27
Mn	0	3	24	0	12	27	0	18	33	0	21	33	0	6	33	0	6	24
Co	0	6	30	0	12	30	0	21	39	0	24	39	0	6	33	0	3	24
Cd	0	3	27	0	21	30	0	21	39	0	24	39	0	3	30	0	3	24
Cu	0	6	27	0	12	33	0	21	39	0	24	42						

лица 2). В промежутки времени между измерениями пузырьки ставились в термостат при T = 37 °C на шейкеры (Shaker) для постоянного перемешивания.

Из данных представленных в таблице 2 следует, что соли Co и Cd удлиняют логарифмическую фазу в среднем на 3 – 6 часов, а соли Fe и Pb

уменьшают на 3 часа. Так же с уменьшением логарифмической фазы, происходит увеличение экспоненциальной фазы на 3 часа у *Enterococcus faecium*, а у *Escherichia coli M-17* наоборот уменьшение на 6 часов. Противоположно обратная ситуация происходит с увеличением логарифмической фазы.

21.09.2011

Список литературы:

1. Холопов, Ю. А. Тяжелые металлы как фактор экологической опасности: Методические указания к самостоятельной работе по экологии для студентов [Текст] / Ю. А. Холопов – Самара: СамГАПС, 2003. – 42 с.
2. Ливинская, С. А. Разработка метода подготовки проб атомно-абсорбционному спектральному анализу для определения содержания тяжелых металлов в растительных маслах [Текст] / С. А. Ливинская, П. В. Владимирский, В. П. Данильчук // Вестник ВГУ. – 2005. – № 2. – С. 38-42.
3. Будников, Г. К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем [Текст] / Г. К. Будников // Сорковский образовательный журнал. – 2000. – № 5. – С. 23-29.
4. Савельева, Т. А. Споробразующие аэробные бактерии, используемые для получения пробиотиков [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.blagovesta.su>. – 7.10.09.

Сведения об авторе: **Сизенцов Алексей Николаевич**, доцент кафедры микробиологии Оренбургского государственного университета, кандидат биологических наук, e-mail: asizen@mail.ru

Нугаманова Эльза Минахатовна, студент кафедры микробиологии Оренбургского государственного университета, e-mail: nugamanova@mail.ru

Пешков Сергей Алексеевич, студент кафедры микробиологии Оренбургского государственного университета, e-mail: Seregca1@mail.ru
460018, Оренбург, пр.Победы, 13, тел. (3532)372481

UDC 579.243

Sizentsov A.N., Nugamanova E.M., Peshkov S.A.

Orenburg state university, e-mail: asizen@mail.ru

IMPACT OF HEAVY METALS ON THE GROWTH OF PROBIOTIC STRAINS *E. COLI M-17*, *E. FAECIUM*, *L. ACIDOPHILUS*, *L. BULGARICUS LB-51* AND BACTERIA OF THE GENUS *BACILLUS* IN THE CONDITIONS IN VITRO

In this paper was examined the stability of different probiotic strains of microorganisms to heavy metals in the conditions in vitro. The effect of heavy metals on the growth phase of microorganisms.

Key words: probiotics, Bacillus, growth phase, heavy metals.

Bibliography:

1. Slaves, A. Heavy metals as environmental hazards: Guidelines for independent work environment for students [Text] / A. Kholopov – Samara SamGAPS, 2003. – 42.
2. Livinsky, S.A Development of method of sample preparation of atomic-absorption spectral analysis to determine the content of heavy metals in vegetable oils [Text] / S.A. Livinsky, P.V. Vladimirsky, V.P. Danil'chuk // Vestnik VSU. – 2005. – № 2. – S. 38-42.
3. Budnikov, G.K. Heavy metals in environmental monitoring of aquatic systems [Text] / G.K. Budnikov // Sorovsky educational journal. – 2000. – № 5. – S. 23-29.
4. Saveliev, TA Spore aerobic bacteria used to produce probiotics [electronic resource]. Mode of access: <http://www.blagovesta.su>. – 07.10.09.