

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

## ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА АНТИБИОТИКОПРОДУКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

### INFLUENCE OF HEAVY METAL SALTS ON ANTIBIOTIC PRODUCTIVITY OF PROBIOTIC STRAINS OF THE GENUS *BACILLUS* *IN VITRO*

*E.A. Дроздова, А.Н. Сизенцов, А.С. Прошка*

*E.A. Drozdova, A.N. Sizentsov, A.S. Proshka*

ФГБОУ ВПО «Оренбургский государственный университет»  
Orenburg State University, Orenburg, Russia

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пробиотики, антибиотики, *Bacillus*, антибиотикорезистентность, тяжелые металлы.

KEYWORDS: probiotics, antibiotics, *Bacillus*, antibiotic resistance, heavy metals.

**РЕЗЮМЕ.** Представлены результаты изучения влияния солей тяжелых металлов на антибиотикопродуктивность пробиотических штаммов бактерий рода *Bacillus*. Полученные данные свидетельствуют о положительном влиянии ионов свинца на антибиотикопродуктивность *B.subtilis* 534.

**ABSTRACT.** The article presents results of heavy metals effect on antibiotic productivity of probiotic strains of the genus *Bacillus in vitro*. The obtained data testify positive influence of lead ions on *B.subtilis* 534 antibiotic productivity.

#### ВВЕДЕНИЕ

Микроорганизмы рода *Bacillus* отличаются высоким и разнообразным спектром биологической активности. Они продуцируют целый ряд ферментов, лизирующих крахмал, пектины, целлюлозу, жиры, белки, также производят различные аминокислоты, антибиотики, витамины и многие другие вещества.

Образую широкий спектр биологически активных веществ, бациллы часто проявляют антагонизм по отношению к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам, что в первую очередь связано с продукцией почти 200 антибиотиков. Наиболее известными их продуцентами являются *B.subtilis*, *B.licheniformis*, *B.pumilus*, *B.polymyxa*, *B.circulans*, *B.laterosporus*, *B.cereits*, *B.brevis* и др. Продуцируемые антибиотики – это полимиксины, бацитрацин, тиротрициновый ком-

плекс, грамицидин С, субтилилин, эдеин, микробациллин и др. (Чучалина и др., 2004). В связи с токсичностью лишь часть из них допущена к применению в клинике (Похиленко, 2009).

Интерес к микроорганизмам рода *Bacillus* в отношении их способности к накоплению ионов тяжелых металлов возник в научном мире в связи с данными, которые были получены на кафедре микробиологии Университета Порт-Харкорт в Нигерии, где были проведены исследования по изучению аккумуляции бактерий тяжелых металлов (кадмия, свинца, цинка и никеля) тремя разновидностями бактерий (*Bacillus*, *Staphilococcus* и *Pseudomonas*), которые использовались в качестве сорбентов тяжелых металлов в речной воде с целью их очистки. По результатам исследований доля накопления тяжелых металлов микроорганизмами *B.subtilis*, *S.albus* и *P.aeruginosa* после 24 ч воздействия составила соответственно: никеля – до 68,6, 58,4 и 28,3 %; свинца – до 94,5, 85,7 и 90,8 %; цинка – до 91,6, 68,1 и 52,9 %; кадмия – до 71,6, 72,1 и 77,0 %. Таким образом, наилучшим сорбентом оказался род *Bacillus* (Green-Ruiz, 2006).

Способность накапливать ионы таких металлов, как свинец, медь, кадмий и цинк обнаружена также у *B.sphaericus* и *B.cereus*. Так, *B.sphaericus* накапливает ионы свинца, меди, кадмия и цинка в концентрациях до 0,76, 5,6, 4,3 и 11,8 моль/г сухой биомассы соответственно, а *B.cereus* накопи-

вают данные металлы в концентрации до 1,1, 5,9, 8,0 и 4,6 моль/г сухой биомассы соответственно (Montes, 2006; Waihung et al., 2007).

Бактерии рода *Bacillus* по-разному проявляют способность к накоплению тяжелых металлов, обладая избирательностью к тем или иным металлам.

Так, например, изучение биоаккумуляции тяжелых металлов (медь, цинк) бактериями рода *Bacillus* (*B.subtilis*, *B.cereus*) с целью определения лучшего биосорбента для дальнейшего применения его в очистке сточных вод показало, что *B.cereus* обладает избирательной способностью к накоплению ионов меди, а *B.subtilis* – к накоплению ионов цинка. Также известно, что *B.clausii* преимущественно аккумулирует ионы свинца, а *B.megaterium* и *B.sphaericus* преимущественно аккумулируют ионы кобальта, никеля и урана (Selenska-Pobell et al., 1999).

Особый интерес к бактериям рода *Bacillus* вызван также тем, что некоторые бактерии этого рода являются основой для создания пробиотических препаратов, активно применяемых в настоящее время. Несмотря на то, что представители *Bacillus* в норме не колонизируют кишечный тракт человека и не являются его обитателями, существует более двух десятков пробиотических препаратов, полученных на основе таких видов, как *B.coagulans*, *B.subtilis*, *B.clausii*, *B.cereus*, *B.toyoi*, *B.licheniformis*, *B.mesentericus*, *B.polymyxa* и др. (Похиленко, 2009).

Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при попадании в желудочно-кишечный тракт человека в достаточном количестве, сохраняют свою активность, жизнеспособность и способны оказывать иммуностимулирующее воздействие на здоровье человека.

Необходимо отметить, что по отношению к кишечному тракту человека виды *Bacillus* являются аллохтонными микроорганизмами, попадающими в него либо в результате случайного поедания, либо осознанного употребления в пищу ферментированных продуктов питания. При естественном способе введения пробиотики на основе микроорганизмов рода *Bacillus* проявляют противоаллергенное действие, оказывают положительное влияние на физиологические, биохимические, иммунные реакции организма хозяина за счет оптимизации и стабилизации функции микробиоценоза кишечника (Смирнов, 2001; Абрамова и др., 2011; Сизенцов, 2012).

Интересным представляется и тот факт, что микроорганизмы рода *Bacillus*, входящие в состав пробиотических препаратов, подавляют развитие патогенной и условно-патогенной микрофлоры, оказывают антиоксидантное действие, проявляющееся в активном выведении токсичных веществ из организма, в частности тяжелых металлов, вместе с тем являясь самоэлеминирующимися антагонистами (Похиленко, 2009).

Целью настоящей работы является изучение влияния тяжелых металлов на антибиотикопродуктивность бактерий рода *Bacillus*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовались три пробиотических препарата: Споробактерин жидкий, Биоспорин и Бактисубтил. Основу выбранных препаратов составляют бактерии рода *Bacillus*. В качестве тест-организмов использовались *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

В качестве регулирующих факторов в работе использовались соли тяжелых металлов:  $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – сульфат железа,  $\text{ZnSO}_4$  – сульфат цинка,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  – нитрат свинца,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  – сульфат марганца,  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – семиводный сульфат кобальта и  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  – восьмиводный 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 металлов был обусловлен нахождением их в одном ряду или в одном порядке со свинцом, кобальтом и кадмием, а также, косвенно, тем, что в повышенных концентрациях эти металлы способны проявлять токсический эффект.

Поскольку препарат Биоспорин является бинарным и содержит в своей основе два штамма бактерий рода *Bacillus* (*B.subtilis* 534 и *B.licheniformis*), нами был использован метод выделения и идентификации чистой культуры.

Для выделения чистой культуры был использован метод истончающего штриха. Принцип метода заключается в получении чистой культуры из отдельной колонии, которую считают результатом развития одной клетки. Предварительно Биоспорин (сухой) был растворен в стерильном физиологическом растворе и посеян на 1,5% мясопептонный агар (МПА) бактериологической петлей методом истончающего штриха на 4 сектора. Чашка Петри на 24 ч помещалась в термостат при  $t = 37^\circ\text{C}$ . 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  $37^\circ\text{C}$ . Пересевы делают до тех пор, пока на чашках отдельно не будут расти морфологически различные культуры бактерий *B.subtilis* и *B.licheniformis* соответственно.

После выделения изолированных колоний проводилась дальнейшая идентификация полученных культур клеток общепринятыми методами на основании свойств микроорганизмов, входящих в состав Биоспорина: морфологических, культуральных, биохимических. Использовали коммерческие тест-системы («BioMerieux», Франция).

Для определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) солей тяжелых металлов на рост бактерий рода *Bacillus* и тест-организмы был использован метод последовательных разведений.

Влияние тяжелых металлов на антибиотикопродуктивность исследуемых микроорганизмов

было изучено методом агаровых блочков. Предварительно готовились суточные культуры исследуемых микроорганизмов и тест-организмов, а также стерильный мясо-пептонный агар и стерильное пробочное сверло.

Исследуемый микроорганизм высевается «газоном» в чашке Петри на поверхность МПА. После этого исследуемые микроорганизмы инкубируются в течение 72 ч 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*. При этом культивирование изучаемых штаммов осуществлялось как в присутствии растворов солей тяжелых металлов, так и без них. В качестве тест-организмов были выбраны *E.coli* и *S.aureus*. Подготовительным этапом в данном эксперименте являлось определение МПК тяжелых металлов на рост тест-организмов. Необходимость проведения данного этапа связана с тем, что присутствие ионов металлов в концентрациях, не являющихся оптимальными для тест-организмов, приведет к бактерицидным и бактериостатическим эффектам и как следствие к искажению полученных результатов.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием стандартных математических методов по Г.Ф. Лакину (t-тест Стьюдента, уровень значимости  $p < 0,05$  прини-

мались достаточным для достоверной разницы между опытной и контрольной группами данных).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из важнейших свойств пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* является их достаточно высокая антибиотикопродуктивность в отношении патогенной и условно-патогенной микрофлоры. Этим и определяется наш интерес к влиянию накопительных функций исследуемых микроорганизмов на их собственную антибиотикопродуктивность.

Сравнив полученные результаты исследований по определению влияния ионов тяжелых металлов на антибиотикопродуктивность исследуемых штаммов, представленные на рис. 1 и 2, с данными по МПК характерными для бактерий рода *Bacillus*, мы выяснили, что тест-организмы проявляют большую устойчивость по сравнению с исследуемыми штаммами в отношении ионов кобальта, кадмия и марганца. Такую же устойчивость, что и бактерии рода *Bacillus*, используемые тест-организмы проявляют в отношении ионов свинца, железа и цинка, за исключением *S.aureus*, который оказался самым чувствительным из исследуемых микроорганизмов в отношении цинка.

В результате дальнейших исследований по определению влияния тяжелых металлов на антибиотикопродуктивность исследуемых микроорганизмов в качестве рабочих использовались те концентрации, при которых жизнеспособны не только бактерии рода *Bacillus*, но и тест-организмы, что способствовало получению более достоверных результатов.

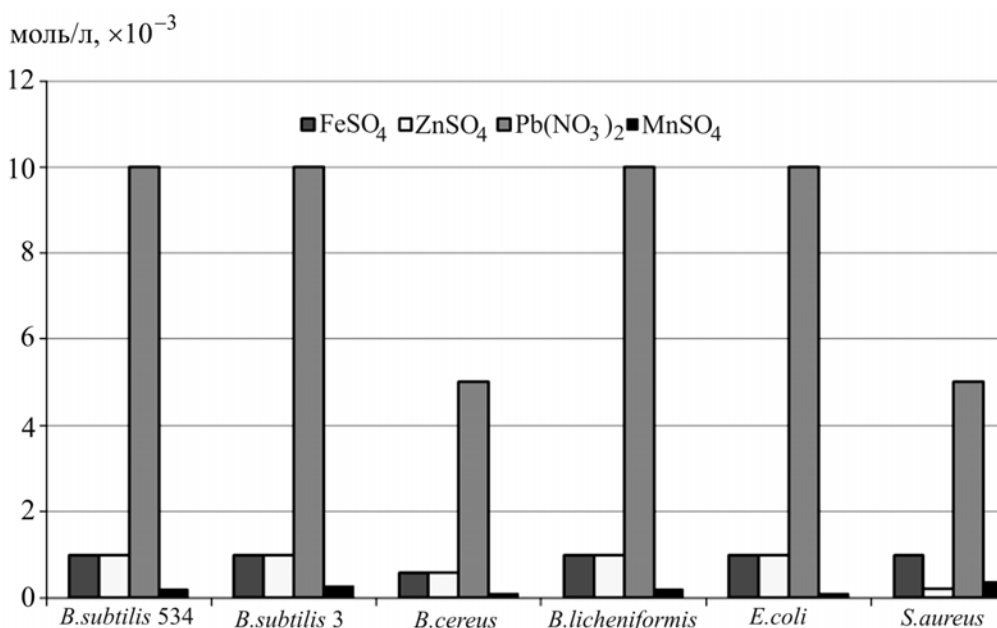


Рис. 1. Сравнительная характеристика МПК солей свинца, железа, цинка и марганца в отношении бактерий рода *Bacillus* и тест-организмов; по оси ординат – минимальная подавляющая концентрация

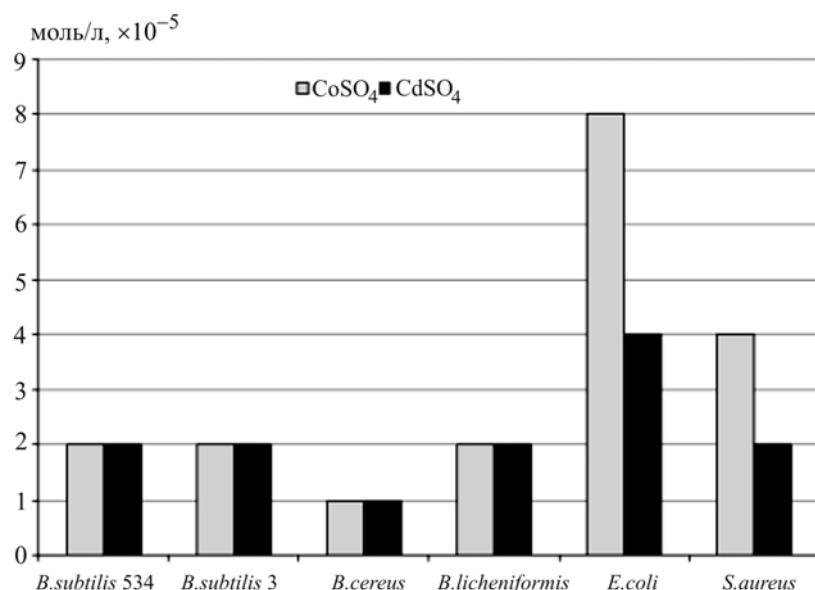


Рис. 2. Сравнительная характеристика МИК солей кобальта и кадмия в отношении бактерий рода *Vacillus* и тест-организмов; по оси ординат – минимальная подавляющая концентрация

Таблица 1. Влияние солей тяжелых металлов на антибиотикопродуктивность бактерий рода *Vacillus* в отношении *S.aureus*

Штамм	Зона подавления роста тест-организма <i>S.aureus</i> , мм						
	Контроль	Соли металлов					
		FeSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	MnSO <sub>4</sub>	CoSO <sub>4</sub>	CdSO <sub>4</sub>
<i>B.subtilis</i> 534	14,8 ± 0,6	13,2 ± 0,54**	9,3 ± 0,66*	17,16 ± 0,70	6,8 ± 0,47**	5,5 ± 0,56***	3,6 ± 0,84***
<i>B.cereus</i>	13,3 ± 0,49	12,3 ± 0,61*	8,6 ± 0,33*	15,3 ± 0,666	7 ± 0,36***	5,5 ± 0,42***	5,6 ± 0,66***
<i>B.subtilis</i> 3	9,6 ± 0,714	8,5 ± 0,84**	8,2 ± 0,4**	12,8 ± 0,477	6,8 ± 0,47**	4,6 ± 0,71*	4,8 ± 0,70**
<i>B.licheniformis</i>	11,5 ± 0,34	9,8 ± 0,54*	6,3 ± 0,42**	11,3 ± 1,358	5,8 ± 0,54***	4,8 ± 0,54**	6,0 ± 0,60**

Примечание: \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ .

Таблица 2. Влияние солей тяжелых металлов на антибиотикопродуктивность бактерий рода *Vacillus* в отношении *E.coli*

Штамм	Зона подавления роста тест-организма <i>E.coli</i> , мм						
	Контроль	Соли металлов					
		FeSO <sub>4</sub>	ZnSO <sub>4</sub>	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	MnSO <sub>4</sub>	CoSO <sub>4</sub>	CdSO <sub>4</sub>
<i>B. subtilis</i> 534	9,3 ± 0,49	8,9 ± 1,33**	9,0 ± 0,68*	12,1 ± 1,13	7,3 ± 0,95*	6,2 ± 0,80*	5,3 ± 0,66**
<i>B. cereus</i>	9,5 ± 0,50	12,6 ± 0,70**	9,6 ± 0,66**	12,6 ± 1,21	7,5 ± 0,42*	5,0 ± 0,73**	5,2 ± 0,47**
<i>B. subtilis</i> 3	7,2 ± 0,79	8,8 ± 1,22**	7,6 ± 0,55*	11,8 ± 1,07	6,8 ± 0,65**	6,6 ± 0,44**	5,6 ± 0,42**
<i>B. licheniformis</i>	6,8 ± 0,47	9,3 ± 0,61**	6,8 ± 0,79**	11 ± 0,57	6,0 ± 0,36***	6,2 ± 0,6**	5,3 ± 0,33***

Примечание: \* –  $p \leq 0,05$ ; \*\* –  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* –  $p \leq 0,001$ .

Полученные нами результаты демонстрируют антагонистическую активность изучаемых штаммов в отношении тест-организмов. Наиболее активным штаммом в отношении *E.coli* и *S.aureus* является *B.subtilis* 534, что можно отметить по диаметру зон подавления роста (табл. 1 и 2).

Также, из данных представленных в табл. 1 следует, что присутствие ионов свинца способствует повышению антибиотикопродуктивности *B.subtilis* 534, что отмечается по увеличению диаметра зоны подавления роста тест-организмов, а присутствие ионов железа, кобальта, кадмия, марганца и цинка оказывает противоположный эффект. Такая же закономерность наблюдается и для других исследуемых штаммов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют сделать вывод, что только один металл из перечня анализируемых – свинец – оказывает положительное влияние на антибиотикопродуктивность бактерий рода *Bacillus*, в то время как ионы остальных металлов угнетают ее.

### ЛИТЕРАТУРА

Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. Морфологическое обоснование эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллеза крыс // Известия ОГАУ. 2011. № 29-1. С 192–195.

Абрамова Л.Л., Сизенцов А.Н., Шеботина Н.В. Оценка эффективности применения пробиотических

препаратов при лечении сальмонеллеза на основании исследования показателей крови // Известия ОГАУ. 2011. № 30-1. С 249–253.

Похиленко, В. Д. Пробиотики на основе спорообразующих бактерий и их безопасность [Электронный ресурс]. Режим доступа: [www.cbsafety.ru/rus/saf](http://www.cbsafety.ru/rus/saf). 6.12.09.

Сизенцов А.Н. Динамика морфологических показателей крови млекопитающих при лечении интоксикации свинцом и цинком пробиотическими препаратами // Вестник ОГУ. 2012. № 10. С.126–128.

Смирнов В.В. Антибиотики и/или пробиотики: размышления и факты // Медицинская картотека ТГУ. 2001. № 8. С. 15–18.

Чучалина А.Г., Вялкова А.И., Белоусова Ю.Б., Яснецова В.В. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Вып. V. М.: ЭХО, 2004. 944 с.

Green-Ruiz C. Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus sp.* from a tropical // Bioresource Technology. 2006, 97(10): 1907–1911.

Montes D. Removal of mercury (II) from aqueous solutions of non-viable cells of *Bacillus sp.* // Biotechnology. 2006, 97(7):1907–1911.

Selenska-Pobell S., Panak P., Bernhard G. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous by *Bacillus sp.*, *B.clausii*, *B.cereus*, *B.megaterium* and *B.sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile // Microbiology Ecology. 1999, 29(1):59–67.

Waihung Lo, Mei Lau N., Peter H.F. Biosorption and desorption of copper (II) ions by *Bacillus sp.* // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2007, 107(3):581–591.