

DOI: 10.19112/2413-6174-2024-25-3-10

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ВЛИЯНИЯ МЕДИ И КОБАЛЬТА НА ФЛОРУ КИШЕЧНИКА В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

А.П. Баранова¹, Е.В. Сальникова¹, А.Е. Побилат², А.Н. Сизенцов¹

¹ ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет»,
Российская Федерация, 460018, Оренбург, пр. Победы, д. 13

² ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»,
Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

РЕЗЮМЕ. Представлен анализ результатов исследования оценки биологического действия химических соединений кобальта и меди на представителей структурного микробиома кишечника, выполненного на модели *Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* и *E. coli*. Полученные данные свидетельствуют о высоком уровне толерантности исследуемых штаммов к химическим соединениям эссенциальных элементов в концентрациях от 0,125 М/л до 0,031 М/л. Выявлено выраженное пролонгирующее действие кобальта и меди на динамические показатели роста. Однако уровень сорбции данных элементов незначителен и составляет в среднем 10,7% для *E. coli* (Cu) и 8,3% для *Lactobacillus sp.* (Co). Экспериментально установлено, что численность популяции *E. coli* имеет достоверно низкие значения на фоне интоксикации кобальтом – ниже на 25,27% ($p < 0,05$). Увеличение численности популяции клеток данного микроорганизма можно связать со снижением конкурентоспособности за питательные вещества на фоне сокращения численности популяции других микроорганизмов, о чем свидетельствуют результаты подсчета *Enterococcus sp.*

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: кобальт, медь, острая интоксикация, биоаккумуляция.

Для цитирования: Баранова А.П., Сальникова Е.В., Побилат А.Е., Сизенцов А.Н. Оценка степени влияния меди и кобальта на флору кишечника в модельных экспериментах *in vivo* и *in vitro*. Микроэлементы в медицине. 2024;25(3):23–25. DOI: 10.19112/2413-6174-2024-25-3-10.

ВВЕДЕНИЕ

Микробиом кишечника выполняет ключевую роль в метаболических и иммунологических процессах организма хозяина. В современной литературе представлены многочисленные данные об уникальных механизмах толерантности бактериальных клеток к действию тяжелых металлов и их биоаккумулирующих характеристик. Воздействие тяжелых металлов тесно связано с функцией и толерантностью кишечных микробов (Zhao et al., 2024; Arun et al., 2021).

Цель исследования – оценить уровень толерантности отдельных представителей нормофлоры кишечника крыс в отношении химических соединений меди и кобальта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельный эксперимент состоял из двух взаимодополняющих блоков. На первом этапе проведена оценка уровня толерантности к металлам тестируемых штаммов (*Enterococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* и *E. coli*), выделенных из структурного микробиома кишечника и дифференцированных с использованием микроскопических, культуральных и биохимических методов исследования. Полученные данные свидетельствуют о выраженной устойчивости тестируемых штаммов к исследуемым химическим соединениям меди и кобальта. В частности, установлено, что для *Lactobacillus sp.* минимальные ингибирующие концентрации (МИК) составляют 0,125 М/л (CoSO_4) и 0,031 М/л (CuSO_4), *Enterococcus sp.* 0,063 (CoSO_4) и 0,031 М/л (CuSO_4) в отличие от изолята *E. coli*, для которого устойчивость имеет обратную картину, характеризующуюся более высокими показателями к исследуемым химическим соединениям. Так, МИК составила для CuSO_4 0,125 М/л, а для CoSO_4 – 0,063 М/л.

Второй этап в реализации данного блока базировался на оценке степени влияния исследуемых химических соединений на изолированные культуры клеток. Для реализации использовали нефелометрический метод. Динамику роста определяли методом интервального замера (каждые 3 ч) оптической плотности популяции исследуемых микроорганизмов до получения индетичных показателей (не менее трех), свидетельствующих о выходе роста на максимальную фазу. Полученные данные свидетельствуют о значительной степени влияния исследуемых веществ на динамические показатели роста популяции в условиях периодического культивирования. Установлено, что присутствие в субстрате

CoSO₄ оказывает пролонгированное действие на длительность экспоненциальной фазы *E. coli* с увеличением времени наступления стационарной фазы на 3 ч, при этом плотность популяции уступала интактному показателю 5,86% ($p<0,05$). Для *Enterococcus sp.* время выхода на стационарную фазу приходится на 30-й час проведения замеров, что на 6 ч больше по отношению к контролю, при этом плотность популяции снижена на 42,95% ($p<0,001$). *Lactobacillus sp.* имеет схожую с *E. coli* характеризующуюся увеличением логарифмической фазы роста на 3 ч (36 ч контроль и 39 ч опыт) и уступает в показателях оптической плотности 11,41% ($p<0,05$). В отношении CuSO₄ у всех тестируемых штаммов регистрируется схожая картина с CoSO₄ по динамике и времени наступления стационарной фазы роста. Разница в показателях оптической плотности составила для *Enterococcus sp.* 26,32% ($p<0,01$), *Lactobacillus sp.* 12,28% ($p<0,05$) ниже интактных значений, а для *E. coli* данный показатель составил 5,72% ($p<0,05$) в сторону увеличения.

Анализ сорбционной емкости исследуемых микроорганизмов проводили с использованием атомно-абсорбционной спектрофотометрии. Анализировали биомассу клеток и супернатант с определением процента содержания элементов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о низком потенциале сорбции кобальта из субстрата всеми тестируемыми микроорганизмами. Уровень аккумуляции составил 8,3% для *Lactobacillus sp.*, 5,7% для *Enterococcus sp.* и 4,8% *E. coli* соответственно. В отношении накопления биомассой меди наблюдается обратная картина. Так, максимальные значения регистрируются у *E. coli* и составляют в среднем 10,7%, а минимальные значения регистрируются у *Lactobacillus sp.* и составляют 3,2%.

В модельном эксперименте *in vivo* были сформированы две группы аналогов из самцов крыс Wistar по 15 голов в каждой. Животным натошак перорально вводили растворы CoSO₄ и CuSO₄ в дозах в пересчете на Co мг/кг массы тела и Cu 50 мг/кг соответственно. После создания острой интоксикации проводили оценку степени влияния исследуемых металлов на микрофлору кишечника на модели *Enterococcus sp.* (тонкий отдел кишечника) и *E. coli* (толстый отдел). Высев и подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ) проводили с интервалом в 2 ч (фоновое исследование, 2, 4, 6 и 8 ч).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Полученные в ходе проведения исследования данные свидетельствуют о выраженной динамическом влиянии обоих исследуемых соединений. Так, численность популяции *Enterococcus sp.* при интоксикации медью значительно снижалась на протяжении всего эксперимента и составила $29,67 \pm 1,76$ КОЕ/мл при разведении 1×10^5 , что на 58,60% меньше фоновых значений ($p<0,001$), при этом наиболее значимое снижение регистрируется в первые часы с момента интоксикации и составляет 26,99% ($p<0,05$) через 2 ч и 52,53% ($p<0,01$) через 4 ч соответственно. Присутствие кобальта оказывает более выраженное ингибирующее действие на *Enterococcus sp.* со снижением численности через 2 ч на 33,49% ($p<0,05$), через 4 ч на 74,43% ($p<0,01$) и суммарным снижением к 8-му часу исследования на 81,40% ($p<0,001$) соответственно.

По отношению к *E. coli* регистрируется обратная зависимость. На фоне введения в организм сульфата меди численность популяции достоверно увеличивается начиная с 4-го часа исследования на 72,91% ($p<0,05$), через 6 ч на 78,85% ($p<0,001$) и через 8 ч на 96,02% ($p<0,001$) соответственно. Присутствие кобальта в пищеварительном тракте также оказывает «стимулирующее» действие на изменение численности популяции с максимальными показателями изменения численности, начиная с 6-го часа, и составляет 79,19% ($p<0,05$), а на 8-й час 81,28% ($p<0,01$) по отношению к фоновым показателям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследуемые бактериальные изоляты, формирующие микробиом кишечника крыс обладают выраженной толерантностью в отношении химических соединений кобальта и меди. Однако уровень сорбции данных элементов незначителен и составляет в среднем 10,7% для *E. coli* (Cu) и 8,3% для *Lactobacillus sp.* (Co). Оценка степени влияния металлов на микробиом кишечника в условиях острой интоксикации косвенно подтверждает результаты исследования *in vitro*. Установлено, что численность популяции *E. coli* имеет достоверно низкие значения на фоне интоксикации кобальтом на 25,27% ($p<0,05$). Увеличение численности популяции клеток данного микроорганизма можно связать

со снижением конкурентоспособности за питательные вещества на фоне снижения численности популяции других микроорганизмов, о чем свидетельствуют результаты подсчета *Enterococcus* sp.

Работа выполнена при поддержке государственного задания FSGU-2023-0007.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Zhao L., Li X., Wang Y., et al. Resistance role of *Lactobacillus* sp. and *Lactococcus* sp. to copper ions in healthy children's intestinal microorganisms. J Hazard Mater. 2024 May 5; 469: 134059. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2024.134059.

Arun K.B., Madhavan A., Sindhu R., et al. Probiotics and gut microbiome – Prospects and challenges in remediating heavy metal toxicity. J Hazard Mater. 2021 Oct 15; 420: 126676. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126676.

ASSESSMENT OF THE DEGREE OF INFLUENCE OF COPPER AND COBALT ON THE INTESTINAL FLORA IN MODEL EXPERIMENTS *IN VIVO* AND *IN VITRO*

A.P. Baranova¹, E.V. Salnikova¹, A.E. Pobilat², A.N. Sizentsov¹

¹ Orenburg State University,
Pobedy Ave., 13, Orenburg, 460018, Russian Federation

² Peoples' Friendship University of Russia,
St. Miklouho-Maklaya, 6, Moscow, 117198, Russian Federation

ABSTRACT. The presented work presents an analysis of the results of a study assessing the biological effect of chemical compounds of cobalt and copper on representatives of the structural intestinal microbiome using the model *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp. and *E. coli*. The data obtained indicate a high level of tolerance of the studied strains to chemical compounds of essential elements in concentrations from 0.125 M/l to 0.031 M/l. A pronounced prolonging effect of cobalt and copper on dynamic growth rates was established. However, the level of sorption of these elements is insignificant and averages 10.7% for *E. coli* (Cu) and 8.3% for *Lactobacillus* sp. (Co). It was experimentally established that the population size of *E. coli* has significantly low values against the background of cobalt intoxication by 25.27% ($p < 0.05$). An increase in the cell population of this microorganism can be associated with a decrease in competitiveness for nutrients against the background of a decrease in the population of other microorganisms, as evidenced by the results of counting *Enterococcus* sp.

KEY WORDS: cobalt, copper, acute intoxication, bioaccumulation.