Науковий вісник Ужгородського університету
Серія Біологія, Випуск 22, 2008: 92-96
© Кривцова М.В., Воронич К.М., 2008

УДК: 546.47.+579.852.11+591.85

ДІЯ ПРОБІОТИКІВ ІЗ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS* СТОСОВНО ПОРУШЕНЬ МІКРОБІОЦЕНОЗУ КИШЕЧНИКУ МИШЕЙ СПРИЧИНЕНИХ ЦИНКОВОЮ ІНТОКСИКАЦІЄЮ

М.В. Кривцова, К.М. Воронич

Дія пробіотиків із бактерій роду Bacillus стосовно порушень мікробіоценозу кишечнику мишей спричинених цинковою інтоксикацією. – М.В. Кривцова, К.М. Воронич. *– Досліджено вплив експериментального цинкового отруєння на порожнинну мікрофлору кишечнику мишей. Показано, що цинкова інтоксикація, відтворена шляхом перорального введення сульфату цинку у щоденній концентрації 2 мг/кг ваги, спричинила суттєві порушення у кишковому мікробіоценозі. Пероральне введення Біоспорину отруєним тваринам протягом 7 днів призвело до нормалізації співвідношення симбіотичної мікрофлори кишечника. Профілактичне застосування пробіотиків у значній мірі попереджало порушення мікробіоценозу кишечнику тварин.*

Ключові слова: *цинкова інтоксикація, пробіотики, мікрофлора кишечнику.*

Адреса: *Ужгородський національний університет, біологічний факультет, вул. Волошина, 32, 88000, Україна, e-mail: f-k-m-79@rambler.ru*

Effect of Bacillus-based probiotics against the derangements in the intestinal microbiocenosis of mice caused by zinc intoxication. – M.V. Krivtsova, C.M. Voronich. *– The influence of experimental zinc intoxication upon normal intestinal microflora of mice has been studied. It was shown that zinc intoxication reproduced by oral administration of zinc sulphate in a daily concentration of 2mg/kg during 10- and 20 days caused disorders in mice's intestinal microbiocenosis. Therapeutic use of the Biosporine proved highly efficient against the derangements in the intestinal microbiocenosis caused by zinc intoxication. The intestinal microbiocenosis of the animals that had preventively been given bacterial preparations, tended to normalize.*

Key words: *zinc intoxication, probiotic, intestinal microflora.*

Address: *Uzhgorod National University, Biological Faculty, Voloshina str. 32, Uzhhorod, 88000, Ukraine, e-mail: f-k-m-79@rambler.ru*

Вступ

Явище мікробного антагонізму на сьогодні широко використовується при створенні пробіотиків − препаратів на основі живих мікробних культур. Зокрема бактеріальні біопрепарати із бактерій роду *Bacillus* є сучасними ефективними засобами підвищення опірності та мобілізації захисних систем організму, імунокорекції, профілактики та лікування дисбактеріозу кишечнику, захворювань шлунково-кишкового тракту різної етіології, порушень метаболізму, алергічних захворювань, показана ефективність застосування пробіотиків для корекції мікробіоценозу кишечнику при гіпо- та гіперфункції щитоподібної залози. Ці дослідження свідчать про те, що спектр застосування пробіотиків постійно розширюється [1, 5-8]. Однак на сьогоднішній день все більшу увагу дослідників привертає значення техногенної забрудненості довкілля у розвитку дисбактеріозу кишечнику, а відповідно і пошук заходів для нівеляції токсичної дії важких металів на кишковий мікробіоценоз [2, 4]. Результати експериментальних досліджень, які вказують на здатність бактерій роду *Bacillus* до підвищеної сорбції важких металів і радіонуклідів у поєднанні з швидкою елімінацією із шлунково-кишкового тракту, дозволяють розглядати їх в якості засобів, які сприяють виведенню важких металів з організму [6].

Метою нашої роботи було:

1. Вивчити зміни у порожнинній мікрофлорі товстого кишечнику мишей в умовах експериментальної цинкової інтоксикації.
2. Дослідити резистентність бактеріальної основи пробіотику Біоспорину до різних концентрацій солі цинку.
3. Встановити дію пробіотиків на фоні отруєння солями важких металів.

Матеріал і методики досліджень

Вплив сульфату цинку на бактерії роду *Bacillus* − активну основу пробіотику Біоспорину − вивчали на середовищі МПА, яке містило різні концентрації $ZnSO_4$ x $7H_2O$ (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.2 моль). Результати досліджень порівнювались із контролем. Ампулу з препаратом розводили 10 мл стерильної води і висівали на чашки

Петрі по 0,5 мл суспензії (250 млн.мікр.кл) з відповідними концентраціями $ZnSO_4$ x $7H_2O$. Культивування проводили при температурі 37°С протягом доби.

Вплив пробіотику на стан мікрофлори кишечнику за умов цинкової інтоксикації проводили на статевозрілих білих нелінійних мишах, середньою вагою 26,5 грам, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Контроль становили здорові тварини. Тварини групи КБ (введення Біоспорину здоровим тваринам) протягом 7 днів щоденно приймали по 1мл біопрепарату Біоспорин у дозі 10^9 мікробних клітин на 1 тварину. Відтворення цинкового отруєння здійснювали шляхом додавання у питну воду (дистильована вода) сульфату цинку із розрахунку 2 мг/кг ваги протягом 10 та 20 діб: групи Zn (10-інтоксикація) та Zn (20-інтоксикація). П'яту групу – Zn+Біоспорин (терапія) – становили отруєні миші, яким після 20-денного додавання у питну воду сульфату цинку протягом 7 діб вводили Біоспорин, шосту – Біоспорин+Zn (профілактика) – тварини, яким протягом 7 діб до відтворення інтоксикації вводили пробіотик з профілактичною метою. Забір крові здійснювали декапітацією тварин під легким ефірним наркозом; у тварин групи Zn (10-інтоксикація) – через 1 добу після останнього 10-денного введення сульфату цинку, Zn (20-інтоксикація) – через 1 та 7 діб після останнього 20-денного введення сульфату цинку, Zn+Біоспорин (терапія) – через 1 та 7 діб після припинення введення Біоспорину, Біоспорин+Zn (профілактика) – через 1 та 7 діб після останнього введення сульфату цинку.

Вивчення впливу сульфату цинку на кількісний та якісний склад мікрофлори кишечнику лабораторних тварин здійснювали шляхом проведення бактеріологічного аналізу випорожнень. Ідентифікацію мікроорганізмів проводили з врахуванням морфологічних, культуральних та біохімічних властивостей бактерій [3]. Для ідентифікації мікроорганізмів родини *Enterobacteriaceae* використовували „Системы индикаторные бумажные" виробництва Нижегородського державного підприємства по виробництву бактерійних препаратів (Росія).

Результати досліджень

Результати вивчення резистентності активної основи Біоспорину до солі цинку в експериментах *in vitro* показали, що бацили здатні нормально розвиватись при концентрації $ZnSO_4$ x $7H_2O$ 0,001 та 0,0001 моль (табл. 1).

При концентрації $ZnSO_4$ x $7H_2O$ 0,001 моль реєстрували ріст ізольованих колоній. Тобто розвиток бацил при цій концентрації можливий, але він не є масовим. Починаючи від концентрації $ZnSO_4$ x $7H_2O$ 0,01 моль і вище ріст культури припинявся. Потрібно відмітити, що на резистентність бактерій роду *Bacillus* до солей важких металів ($ZnSO_4$ x $7H_2O$) не впливає кількість мікробних одиниць, які висівалися на чашки з поживним середовищем МПА та відповідними концентраціями металів.

Таблиця 1 Характер росту активної основи Біоспорину на середовищі з різними концентраціями солі цинку

Концентрація $ZnSO_4$ x $7H_2O$	Характер росту колоній
контроль	суцільний ріст
0,0001 моль	суцільний ріст
0,001 моль	окремі колонії
0,01 моль	ріст відсутній
0,1 моль	ріст відсутній
0,2 моль	ріст відсутній

У дослідах на білих мишах нами встановлено порушення у складі досліджуваних представників нормальної мікрофлори товстої кишки в умовах цинкової інтоксикації (табл. 2). В результаті 10-денного введення мишам сульфату цинку у кишечнику отруєних тварин спостерігали зниження кількості біфідо- та лактобактерій, загальної кількості кишкової палички та підвищення відсотку лактозонегативних штамів на 10 %, появу гемолітичних штамів *E. coli* та стафілококу, збільшення кількості дріжджоподібних грибів та титру протею. Внаслідок 20-денного введення сульфату цинку відмічалось більш суттєве зниження кількості біфідо- та лактобактерій, лактозопозитивних штамів *E. coli*, при цьому лактозонегативні ешерихії складали 30% від загальної кількості проти 10 % у здорових тварин. Вміст ентерококу в умовах інтоксикації знижувався не суттєво. При розтині візуально спостерігали здуття та гіперемію слизової оболонки кишечнику отруєних мишей. Припинення введення сульфату цинку у групі отруєних тварин, яким пробіотик не вводили, не призвело до відновлення якісного та кількісного складу мікрофлори кишечнику: реєстрували патологічно підвищений відсоток лактозонегативних *E. coli*, протею, дріжджоподібних грибів, стафілококу. У отруєних тварин через тиждень після припинення введення солі цинку виявляли гемолітичні форми бактерій роду *Staphylococcus*, кількість гемолітичних штамів *E. coli* дещо підвищувалась.

Внаслідок 7-денної корегуючої терапії Біоспорином реєстрували тенденцію до нормалізації кількісного та якісного складу досліджуваних представників нормофлори товстої кишки мишей: підвищення кількості біфідо- та лактобактерій, зниження стафілококу, протею, відсотку лактозонегативних штамів ешерихій (табл. 3), що є виразною ознакою покращення стану мікробіоценозу. У отруєних тварин після тижневого введення пробіотику відмічали також значне зниження кількості дріжджоподібних грибів.

Гемолітичні форми *E. coli* та стафілококу після застосування Біоспорину не реєстрували.

Через тиждень після припинення введення пробіотику відмічали підвищення кількості біфідо- та лактобактерій, лактозопозитивних штамів кишкової палички та зниження вмісту дріжджоподібних грибів.

За умов профілактичного введення пробіотику кількість ешерихій, біфідо- та лактобактерій знижувалась меншою мірою, ніж у мишей, яким Біоспорин не застосовували; важливим також є значно нижчий відсоток лактозонегативних штамів кишкової палички. Слід також зауважити, що у випорожненнях тварин даної групи гемолітичних штамів ешерихій не реєстрували. Введення пробіотику за тиждень до відтворення інтоксикації впливало також на загальну кількість стафілококу, вміст якого також був нижчим, ніж у отруєних тварин, однак навіть за умов профілактичного застосування Біоспорину, у випорожненнях тварин реєстрували гемолітичні форми стафілококу, які вже через 7 діб після припинення введення токсиканту не виявляли. Через тиждень після припинення введення сульфату цинку у групі профілактичного застосування Біоспорину відмічали відновлення показників нормального мікробіоценозу кишечнику.

Суттєвих змін мікробіоценозу товстої кишки мишей за умов введення Біоспорину здоровим тваринам не виявлено.

Дисбактеріоз кишечнику, виявлений у отруєних сульфатом цинку тварин, є одним з наслідків інтоксикації організму, який в свою чергу ускладнює протікання патологічного процесу, обумовлює важкість і тривалість його протікання, в тому числі може спричинювати нові метаболітичні зміни в організмі. Мікробні метаболіти і токсини при дисбактеріозі кишечнику виявляють як місцеву, так і загальну дію на організм. Відомо, що одним із наслідків дисбактеріозу, який характеризується збільшенним грам негативних бактерій є транслокація бактерій та їх продуктів із кишечника у кровотік, що в свою чергу може призвести до значних ускладнень, спричинених ендотоксином, при цьому слід звернути увагу на те, що при дисбактеріозі спостерігається дефіцит імунітету до ендотоксину [2, 9]. Порушення кишкового мікробіоценозу призводить до активації умовно-патогенних бактерій, які знаходяться у кишечнику у відносно невеликій кількості, або не типових для даного біотипу мікроорганізмів, токсини яких суттєво впливають на секреторну, моторну функцію кишечника, імунні процеси макроорганізму, що, в свою чергу, може призводити до розвитку хронічного коліту, при цьому, здатність умовно-патогенних мікроорганізмів викликати гнійно-запальні ускладнення пов'язують не стільки з вірулентними властивостями збудника, скільки зниженням імунної реактивності організму [10].

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що надмірне потрапляння цинку в організм спричинює дисбіотичні зміни у кишечнику, при чому ступінь порушення співвідношення представників кишкового мікробіоценозу залежить від тривалості надходження токсиканту в організм і, безумовно, потребує корекції. Показана ефективність терапевтичного та профілактичного введення Біоспорину при інтоксикації сульфатом цинку, проте експерименти *in vitro* показали, що пробіотик можливо застосвувати тільки при отруєннях легкої та середньої важкості, а також після застосування сорбентів у хворих з гострим отруєнням. Слід зауважити, що профілактичне застосування Біоспорину у значній мірі попереджало розвито дисбіотичних змін при інтоксикації.

1. Бакулина Л.Ф., Тимофеев И.В., Перминова Н.Г., Подушкина А.Ф., Печоркина Н.И. Пробиотики на основе спорообразующих микроорганизмов рода *Bacillus* и их использование в ветеринарии // Биотехнология. – 2001. – № 2. – С. 48-56.
2. Бондаренко В.М., Боев Б.В., Лыкова Е.А., Воробьев А.А Дисбактериозы желудочно-кишечного тракта // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1998. - №1. – С. 66-70.
3. Краткий определитель бактерий Берги /Под. ред. Дж. Хоулта. – М.: Мир, 1980. – 495 с.
4. Кривцова М.В. Мікрофлора кишечнику лабораторних тварин за умов експериментальної цинкової інтоксикації та її корекція пробіотиком // Науковий вісник УжНУ, Серія Біологія. – 2005. – № 16. – С. 106-109.
5. Кудрявцев В. А., Сафронова Л. А., Осадчая А.И., Ганова Л.А., Смирнов В.В. Влияние живих культур *Bacillus subtilis* на неспецифическую резистентность организма // Мікробіологічний журнал. – 1996. – Т. 58, №2. – С. 46-55.
6. Смирнов В.В., Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Сорокулова И.Б., Самгородская Н.В., Тофан А.В. Современные представления о механизмах лечебно-профилактического действия пробиотиков из бактерий рода Bacillus // Микробиологический журнал – 1993. – Т. 55, № 4. – С. 92 – 112.
7. Смирнов В.В., Резник С.Р., Сорокулова І.Б. Високоефективний біологічний препарат Біоспорин // Лікарська справа. – 1994. – № 5-6. – С. 133 – 138.
8. Сорокулова И. Б. Сравнительное изучение биологических свойств биоспорина и других коммерческих препаратов на основе бацилл // Мікробіологічний журнал – 1997. – Т. 59, № 6. – С. 43 –49
9. Cebra J.J. Influences of microbiota on intestinal immune system development // Am. J. Clin. Nutr. – 1999. – Vol. 7, № 69. – P. 1046 – 1051.
10. Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A, Mitsuoka T Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children // Int J Food Microbiol. – 1998. – № 1-2, Vol. 42. – 39 – 44.

Отримано: 10 жовтня 2007 р.
Прийнято до друку: 1 листопада 2007 р.

Таблиця 2. Вплив експериментальної цинкової інтоксикації на мікрофлору кишечнику мишей, (M±m)

Група мікроорганізмів	Кількість КУО в 1 г вмісту порожнини товстої кишки			
	Контроль	Zn (інтоксикація)		
		доба введення сульфату цинку		7 діб після останнього введення сульфату цинку
		10	20	
Escherichia coli				
загальна кількість	$(7,90\pm0,14)\times10^{7}$	$(5,86\pm0,11)\times10^{7*}$	$(1,50\pm0,07)\times10^{7*}$	$(1,81\pm0,09)\times10^{7*}$
лактозопозитивні	$(7,11\pm0,25)\times10^{7}$	$(4,70\pm0,10)\times10^{7*}$	$(1,05\pm0,15)\times10^{7*}$	$(1,30\pm0,19)\times10^{7*}$
лактозонегативні % від загальної кількості	10 %	20%	30%	28%
гемолітичні	0	$(1,26\pm0,09)\times10^{1*}$	$(1,36\pm0,12)\times10^{2*}$	$(2,03\pm0,22)\times10^{2*}$
Бактерії роду *Staphylococcus*	$(1,55\pm0,10)\times10^{3}$	$(5,31\pm0,12)\times10^{3*}$	$(9,47\pm0,18)\times10^{3*}$	$(8,89\pm0,29)\times10^{3*}$
гемолітичні	0	$(1,29\pm0,07)\times10^{1*}$	$(1,14\pm0,11)\times10^{2*}$	$(1,10\pm0,09)\times10^{2*}$
Дріжджоподібні гриби	$(4,71\pm0,13)\times10^{4}$	$(1,56\pm0,09)\times10^{5*}$	$(6,85\pm0,17)\times10^{5*}$	$(5,08\pm0,17)\times10^{5***}$
Ентерококи	$(3,95\pm0,17)\times10^{7}$	$(2,46\pm0,14)\times10^{7*}$	$(7,91\pm0,24)\times10^{6*}$	$(8,73\pm0,16)\times10^{6***}$
Бактерії роду *Proteus*	10^{3}	10^{4}	10^{4}	10^{4}
Аеробні спороутворюючі бактерії	$(1,95\pm0,17)\times10^{2}$	$(1,10\pm0,05)\times10^{2}$	$(3,0\pm0,10)\times10^{1}$	$(1,5\pm0,08)\times10^{1}$
Біфідобактерії	10^{8}-10^{10}	10^{6}-10^{7*}	10^{6}-10^{5*}	10^{6}-10^{5*}
Лактобактерії	10^{8}-10^{9}	10^{6}-10^{7*}	10^{6}-10^{5*}	10^{6}-10^{5*}

Примітка: * - зміни показників достовірні у порівнянні з тваринами групи Контроль; ** - стосовно показників у тварин групи Zn (інтоксикація) через 1 добу після останнього введення сульфату цинку; *** - по відношенню до тварин обох зазначених груп, ($p<0,05$).

Таблиця 3. Корекція Біоспорином мікрофлори кишечнику мишей при експериментальній цинкової інтоксикації, (M±m).

Група мікроорганізмів	Кількість КУО в 1 г вмісту товстої кишки			
	Zn+Біоспорин(терапія) (доба після припинення введення пробіотику)		Біоспорин+Zn(профілактика) (доба після припинення введення сульфату цинку)	
	1	7	1	7
Escherichia coli				
загальна кількість	$(6,50\pm0,07)\times10^{7***}$	$(7,62\pm0,06)\times10^{7**}$	$(4,28\pm0,19)\times10^{7***}$	$(6,89\pm0,11)\times10^{7***}$
лактозопозитивні	$(5,73\pm0,23)\times10^{7***}$	$(6,78\pm0,27)\times10^{7**}$	$(3,59\pm0,17)\times10^{7***}$	$(6,13\pm0,18)\times10^{7**}$
лактозонегативні	12%	11%	16%	11%
гемолітичні	0	0	0	0
Бактерії роду *Staphylococcus*	$(1,73\pm0,06)\times10^{3**}$	$(1,65\pm0,21)\times10^{3**}$	$(3,95\pm0,14)\times10^{3***}$	$(1,97\pm0,13)\times10^{3**}$
гемолітичні	0	0	$(8,75\pm0,86)\times10^{1***}$	0
Дріжджоподібні гриби	$(4,23\pm0,20)\times10^{4**}$	$(2,48\pm0,15)\times10^{4***}$	$(8,36\pm0,26)\times10^{4***}$	$(5,30\pm0,16)\times10^{4**}$
Ентерококи	$(8,26\pm0,06)\times10^{6*}$	$(2,57\pm0,09)\times10^{7***}$	$(9,01\pm0,14)\times10^{6***}$	$(2,31\pm0,15)\times10^{7***}$
Бактерії роду *Proteus*	10^{3**}	10^{3**}	10^{3**}	10^{3}
Аеробні спороутворюючі бактерії	$(8,15\pm0,29)\times10^{7***}$	$(3,38\pm0,19)\times10^{6***}$	$(4,16\pm0,25)\times10^{6***}$	$(2,22\pm0,25)\times10^{5***}$
Біфідобактерії	10^{7}-10^{8***}	10^{8}-10^{10**}	10^{7}-10^{8***}	10^{8}-10^{10**}
Лактобактерії	10^{7}-10^{8***}	10^{8}-10^{9**}	10^{7}-10^{8***}	10^{8}-10^{9**}

Примітка: * - зміни показників достовірні у порівнянні з тваринами групи Контроль; ** - стосовно показників у тварин групи Zn (інтоксикація) через 1 добу після останнього введення сульфату цинку; *** - по відношенню до тварин обох зазначених груп, ($p<0,05$).

p.