

УДК: 546.47.+579.852.11+591.85

ВИВЧЕННЯ ЧУТЛИВОСТІ МІКРОФЛОРИ КИШЕЧНИКУ ДО СОЛЕЙ ВАЖКИХ МЕТАЛІВ В ЕКСПЕРИМЕНТАХ *IN VITRO*

Ніколайчук В. І., Кривцова М. В., Колесник А. В.

Вивчення чутливості мікрофлори кишечника до солей важких металів в експериментах *in vitro*. — В. І. Ніколайчук, М. В. Кривцова, А. В. Колесник. — В експериментах *in vitro* встановлено, що додавання важких металів (сульфату цинку, міді та кобальту) у середовище культивування у концентрації 0,2; 0,1; та 0,01 моль призводило до затримки росту бактерій, ізольованих із кишечника лабораторних тварин. 0,005 молярна концентрація сульфату міді та сульфату кобальту затримувала ріст всіх досліджуваних культур. Водночас на середовищі, що містило 0,005 моль сульфату цинку виявляли пригнічений ріст стафілококу, кишкової палички та бактерій роду *Bacillus*. Більшість культур були резистентними до 0,001 молярної концентрації солей важких металів.

Ключові слова: мікрофлора кишечника, важкі метали.

Адреса: Ужгородський національний університет, кафедра генетики, фізіології рослин і мікробіології, біологічний факультет, вул. Волошина, 32, м. Ужгород; e-mail: f-k-m-79@rambler.ru

Sensitiveness of intestine microflora to heavy metals salts in vitro. — V. Nikolaychuk, M. Krivtsova, A. Kolesnik. — Heavy metal salts (cobalt, copper, and zinc sulfate) in 0.2, 0.1 and 0.01 M concentrations prevented growth of bacteria, isolated from intestine of laboratory animals, in culture medium. 0,005 M of cobalt- and copper sulfate suppressed growth of all investigated cultures. While upon media, containing 0,005 M of zinc sulfate, growth of *Staphylococci*, *E.coli* and *Bacillus* bacteria was only delayed. Most of applied bacterial cultures were resistant to 0,001 M heavy metal salts concentration.

Key words: intestinal microflora, heavy metals.

Address: Uzhgorod National University, Department of Genetics, Plant Physiology and Microbiology, Biological Faculty, Voloshina St. 32, Uzhhorod; e-mail: f-k-m-79@rambler.ru

Вступ

Макроорганізм та його нормальна мікрофлора настільки взаємопов'язані, що часто важко визначити що первинно: фізіологічні порушення в організмі "хазяїна" чи зміни мікрофлори. Під впливом численних ендо- та екзогенних факторів якісний і кількісний склад нормофлори може змінюватись, тобто формується дисбактеріоз кишечника [1].

Згідно літературних даних [1, 6] порушення нормофлори кишечника викликають різні фактори, зокрема: кліматичні, соціальні, екологічні, довготривалий прийом антибіотиків та імунодепресантів, інфекційні та соматичні захворювання, інші. Крім того, на стан нормофлори впливають також такі чинники як вік, харчування, сезон, професія, рентгено- і радіотерапія, хіміотерапія, хірургічні втручання, техногенне навантаження тощо. При перевищенні порогових концентрацій впливу шкідливих екзо- або/та ендогенних факторів на організм, мікробіоценози виходять із стану рівноваги, що викликає мікроекологічні та імунні порушення. Це призводить до домінування в біотопі потенційно небезпечних (умовно-патогенних) мікроорганізмів, посилення генетичного обміну та формування клонів, що несуть генетичні детермінанти патогенності та множинну резистентності до лікарських препаратів, в основному антибіотиків. Процес може призвести до серйозних зрушень, які прийнято відносити

до дисбіозів або дисбактеріозів. Дисбактеріоз кишечника, в свою чергу, ускладнює перебіг патологічного процесу основного захворювання, обумовлює важкість і тривалість його протікання [1, 5].

Як правило, при виникненні інфекційних процесів, в організмі відбувається активація імунної системи, факторів специфічного і неспецифічного захисту, індукованих бактеріальними антигенами [6]. Однак, на сьогоднішній день є і дані, які свідчать про імуносупресію на фоні розвитку інфекційного процесу, що пов'язують перш за все з негативним впливом техногенного навантаження на організм людини та тварин [1]. Саме тому, все більшу увагу дослідників привертає значення техногенної забрудненості довкілля у розвитку дисбіозу та дисбактеріозу кишечника.

У ряді робіт нами було показано, що експериментальне введення в організм лабораторних тварин солей цинку та міді призводить до якісних та кількісних змін кишкового мікробіоценозу [2–4]. У зв'язку з цим, представляло інтерес дослідити вплив солей важких металів на бактерії-коменсали кишечника в експериментах *in vitro*.

Матеріал та методика досліджень

В експериментах *in vitro* вивчали чутливість бактерій ізольованих із кишечника здорових кролів до солей важких металів на щільному поживному середовищі

МПА та лактобакагарі (для лактобактерій) з різними концентраціями (0,001; 0,005; 0,01; 0,1; 0,2 моль) солей важких металів – сульфату цинку ($ZnSO_4 \times 7H_2O$), сульфату міді ($CuSO_4 \times 5H_2O$) та сульфату кобальту ($CoSO_4 \times 7H_2O$). У якості контролю використовували середовище без солі металу.

Чашки Петрі, що містили щільне поживне середовище з відповідною концентрацією солей важких металів, ділили на декілька секторів та висівали бактерії, ізолювані із кишечника кролів.

У зв'язку з тим, що в експериментах на лабораторних тваринах нами була показана ефективність застосування пробіотиків із бактерій роду *Bacillus* при дисбактеріозі, який був спричинений отруєнням організму важкими металами, представляло інтерес дослідити дію важких металів на активну основу пробіотику Біоспорину в експериментах *in vitro*. З цієї метою вміст ампул з препаратом розводили стерильною водою та висівали на чашки Петрі з відповідними концентраціями солей важких металів.

Культивування проводили при температурі 37°C протягом 24 годин. За наявності та характером росту культури судили про резистентність або чутливість її до досліджуваної солі металу.

Результати дослідження їх обговорення

Дослідження проводили з ізолюваними із кишечника здорових кролів культурами: *Bacillus spp.*; *Enterobacter spp.*; *Citrobacter spp.*; *Staphylococcus aureus*; *E. coli*; *Staphylococcus spp.*; *Lactobacillus spp.*; дріжджоподібними грибами.

Результати експериментів *in vitro* показали, що бактерії-комесали кишечника, ізолювані із організму здорових тварин, не формували колонії за наявності в середовищі 0,2 та 0,1 молярної концентрації $ZnSO_4 \times 7H_2O$. На середовищі з концентрацією 0,01 моль сульфату цинку відмічено лише пригнічений ріст стафілококу (рис. 1). При культивуванні бактерій на середовищі, що містило 0,005 моль сульфату цинку, виявляли пригнічений ріст стафілококу, кишкової палички та бактерій роду *Bacillus* (рис. 2).

При дослідженні характеру росту культур, ізолюваних із кишечника здорових тварин, на середовищі з концентрацією сульфату цинку 0,001 моль виявлено пригнічений ріст лактобактерій, відсутність росту цитробактера. Всі інші, взяті в експеримент культури, були резистентними до даної концентрації металу (рис. 3).

Дослідження чутливості бактерій – представників нормофлори до сульфату міді показало, що всі культури були чутливими, тобто не росли на середовищі з 0,2; 0,1; 0,01; 0,005 молярною концентрацією сульфату міді. Водночас, всі відібрані для експерименту культури, крім *Citrobacter spp.*, були резистентними до концентрації 0,001 моль сульфату міді.

На середовищі, що містило 0,2; 0,1; 0,01 та 0,005 моль сульфату кобальту, росту досліджуваних культур виявлено не було. Встановлено ріст *E. coli*, грибів роду *Candida*, *Lactobacillus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Staphylococcus spp.* при культиву-

ванні на середовищі, що містило з 0,001 молярну концентрацію сульфату кобальту.



Рис. 1. Пригнічений ріст *Staphylococcus aureus*, ізолюваного із кишечника здорових кролів, за наявності у середовищі 0,01 моль сульфату цинку

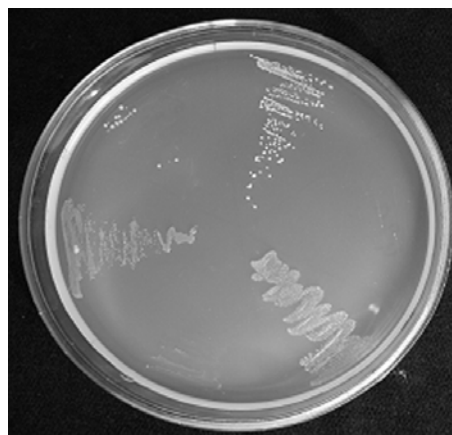


Рис. 2. Пригнічений ріст культур, ізолюваних із кишечника здорових кролів, за наявності у середовищі 0,005 моль сульфату цинку



Рис. 3. Ріст культур, ізолюваних із кишечника здорових кролів, за наявності у середовищі 0,001 моль сульфату цинку

Попередньо проведені нами експериментальні роботи з вивчення впливу солей важких металів на мікробіоценоз кишечника лабораторних тварин показали, що під впливом введення сульфату цинку та міді (у кількості, що відповідає 0,01 моль солі металу на 1 кг маси тіла тварини), формувався дисбактеріоз кишечника, який супроводжувався зниженням кількості біфідо- та лактобактерій, зменшенням загальної вмісту *E. coli*, збільшенням кількості умовно-патогенних бактерій родів *Proteus*, *Staphylococcus*, а також дріжджоподібних грибів [2, 3, 4]. У випорожненнях отруєних тварин реєстрували також гемолітичні штами *E. coli* та бактерій роду *Staphylococcus*.

Отже результати експериментів *in vitro* в певній мірі узгоджуються з даними, отриманими на лабораторних тваринах, а саме: представники облигатної мікрофлори є більш чутливими до солей важких металів, ніж представники факультативної мікрофлори, що відносяться до умовно-патогенних мікроорганізмів.

Результати вивчення чутливості бактерії роду *Bacillus* до солей важких металів показали, що за

концентрації у середовищі 0,001 та 0,01 моль $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, а також 0,001 моль $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ та $\text{CoSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ реєстрували суцільний ріст бактерій. Проте, вже при концентрації 0,01 моль сульфату цинку та сульфату кобальту, а також 0,05 моль $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ спостерігався ріст лише окремих колоній. При більш високих концентраціях солей важких металів ріст бацил не спостерігався. Отже бактерії роду *Bacillus*, що входять до складу пробіотику Біоспорину, були більш чутливими до сульфату цинку та кобальту. Таким чином, застосування біопрепаратів із бацил буде доцільним тільки при надходженні в організм таких концентрацій важких металів, до яких активна основа біопрепарату є резистентною.

Висновки

В експериментах *in vitro* встановлено, що 0,2; 0,1; та 0,01 молярна концентрація солей важких металів у середовищі затримувала ріст бактерій, ізольованих із кишечника лабораторних тварин. Більшість культур були резистентними до 0,001 молярної концентрації солей важких металів.

1. Веселов А. Я. Современные представления о нормальной микрофлоре пищеварительного тракта взрослого человека и изменениях ее в норме и при некоторых заболеваниях органов пищеварения (обзор литературы) // Лабораторное дело. – 1988. – № 4. – С. 3–11.
2. Кривцова М. В. Ефективність дії Біоспорину та Моноспорину-ПК стосовно порушень кишкової мікрофлори при експериментальній цинковій інтоксикації // Довкілля та здоров'я. – № 4. – 2006. – С. 15–20.
3. Кривцова М. В., Воронич К. М. Дія пробіотиків із бактерій роду *Bacillus* стосовно порушень мікробіоценозу кишечника мишей спричинених цинковою інтоксикацією // Вісник УжНУ: Серія Біологія, Випуск 23. – 2008. – С. 92–96.
4. Krivcova M. V. Disorders of the intestinal microflora of laboratory animals poisoned with copper and zinc salts / Young Scientists and Students international scientific conference "Modern problems of microbiology and biotechnology". – Odessa 22–23 травня 2007р. – Р. 255.
5. Смирнов В. В., Резник С. Р., Сорокулова І. В. Високоєфективний біологічний препарат біоспорин // Лікарська справа. – 1994. – № 5–6. – С. 133–138.
6. Федоровская Е. А., Немировская Л. И. Взаимосвязь микробных экосистем и иммунитета человека // Микробиологический журнал – 1999. – Т. 61, № 5. – С. 85–95.

Отримано: 10 червня 2010 р.

Прийнято до друку: 24 червня 2010 р.