

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ КАДМИЕМ С УЧЕТОМ КСЕНОБИОТИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ РАЗЛИЧНЫХ РАЙОНОВ ОРЕНБУРГСКОЙ ОБЛАСТИ

Сизенцов А.Н., Сальникова Е.В.

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: asizen@mail.ru

В статье представлены данные по изучению уровня антропогенной нагрузки кадмием и перспективе использования, в качестве детоксикационных, пробиотических препаратов на основе бактерий рода *Bacillus*. В результате первой серии эксперимента было установлено, что у животных, разведение которых осуществляется в районах расположенных в непосредственной близости с Челябинской областью (Кваркенский и Светлинский), наблюдается повышенное содержание кадмия в организме. Во второй серии эксперимента было установлено, что применение пробиотических препаратов позволяет существенно снизить уровень ксенобиотической нагрузки на организм животных. Так, применение препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* снижает уровень кадмия в тканях лабораторных животных в среднем более чем на 50 %, при этом наиболее эффективным препаратом является «Споробактерин».

Ключевые слова: кадмий, биосубстраты, Оренбургская область, пробиотические препараты, биоаккумулирующая способность.

ASSESSMENT OF EFFECTIVENESS OF APPLICATION OF PROBIOTIC STRAINS OF MICROORGANISMS AT INTOXICATION CADMIUM TAKING INTO ACCOUNT KSENOBIOTIC LOADING OF VARIOUS AREAS OF THE ORENBURG REGION

Sizentsov A.N., Salnikova E.V.

FGBOU «The Orenburg state university», Orenburg, e-mail: asizen@mail.ru

Data on studying of level of anthropogenous loading by cadmium and the prospect of use, in quality the detoksikatsionnykh, probiotic medicines on the basis of sort *Bacillus* bacteria are presented in article. As a result of the first series of an experiment it was established that at animals cultivation of which is carried out in the areas located in close proximity with Chelyabinsk region (Kvarkensky and Svetlinsky), the increased content of cadmium in an organism is observed. In the second series of an experiment it was established that use of probiotic medicines allows to reduce significantly the level of ksenobioticheskoy load of an organism of animals. So use of medicines on the basis of bacteria of the sort *Bacillus* reduces cadmium level in tissues of laboratory animals on average more than by 50 %, at the same time the most efficient medicine is *Sporobakterin*.

Keywords: cadmium, biosubstrata, the Orenburg region, probiotic medicines bioaccumulating ability.

Оренбургская область, обладая крупным многоотраслевым промышленным и топливно-энергетическим комплексом, занимает одно из первых мест среди регионов России по загрязнению окружающей природной среды [1]. Особенно эта проблема актуальна для восточной части Оренбургской области. Деятельность предприятий электроэнергетики, добычи и переработки минерального сырья, черной и цветной металлургии, нефтепереработки приводит к загрязнению вредными веществами атмосферного воздуха, почвенного покрова, поверхностных водных объектов с образованием геохимических аномалий техногенного характера.

В природе существуют различные механизмы устойчивости к воздействию неблагоприятных факторов, так, например, представители рода *Ascophyllum* свободно

адсорбируют свинец и кадмий, которые накапливают эти металлы в количестве больше, чем 30 % от веса сухой биомассы [2]. Такой запас чаще всего является способом детоксикации, защиты от неблагоприятных концентраций ионов тяжелых металлов, которые оказывают на организмы токсичное воздействие.

Так, например, токсичное действие кадмия проявляется в ингибировании синтеза ДНК, белков и нуклеиновых кислот, в изменении активности ферментов, нарушении усвоения и обмен других микроэлементов, что может вызывать их дефицит [3].

В природных условиях встречается большое количество микроорганизмов, которые адсорбируют от 30 до 40 процентов ионов тяжелых металлов на своей поверхности.

Интерес к микроорганизмам рода *Bacillus* в отношении их способности к накоплению ионов тяжелых металлов возник в связи с данными, которые были получены на кафедре микробиологии Университета Порт-Харкорт в Нигерии, где были проведены исследования по изучению аккумуляции кадмия бактериями рода *Bacillus*, которые использовались в качестве сорбентов кадмия в речной воде с целью их очистки. По результатам исследований доля накопления исследуемого металлов после 24 часов воздействия составила до 71,6 % [4].

В связи с этим целью нашего исследования явилось: изучение способности к аккумуляции тяжелых металлов пробиотическими штаммами микроорганизмов в условиях *in vitro* и *in vivo*

Исходя из поставленной цели, нами были определены следующие задачи:

1) оценить уровень загрязненности кадмием различных районов Оренбургской области по средству определения концентрации исследуемого металла в тканях сельскохозяйственных животных;

2) определить минимальные подавляющие концентрации кадмия на рост бактерий в периодической культуре, его влияние на динамику роста исследуемых микроорганизмов и оценить способность исследуемых пробиотических штаммов в условиях *in vitro*;

3) изучить эффективность применения пробиотических штаммов исследуемых микроорганизмов при интоксикации кадмием по средству изучения биохимических показателей крови и способности спорообразующих бактерий рода *Bacillus* к накоплению кадмия по средству определения концентрации тяжёлых металлов в тканях лабораторных животных.

Объекты и методы исследования. На первом этапе в качестве объектов исследования были отобраны образцы тканей сельскохозяйственных животных из районов, которые расположены в Центральном и Восточном Оренбуржье. К ним относятся Сакмарский, Соль-Илецкий, Сорочинский, Кваркенский и Светлинский районы.

Определение содержания кадмия в исследуемых объектах проводили по

стандартизированным методикам в аккредитованной лаборатории Испытательного Центра ГНУ «Всероссийский НИИ мясного скотоводства» РАСХН (аттестат аккредитации И.Л. NPOOCRU 000121 ПФ 59) методом атомно-абсорбционной спектrophотометрии [5, 6].

На втором этапе исследования нами оценивалась биоаккумулирующая способность ионов кадмия микроорганизмами, входящими в состав пробиотических препаратов.

В работе использовались 3 пробиотических препарата: «Ветом 2» на основе *B. subtilis* ВКПМ В 7048 и *B. licheniformis* ВКПМ В 7038, «Споробактерин жидкий» – *B. subtilis* 534, и «Бактисубтил» на основе *B. cereus* IP 5832. В качестве регулирующего фактора в работе использовали $CdSO_4 \times 8H_2O$ – восьмиводный сульфат кадмия.

Для реализации поставленной цели нами использовались атомно-абсорбционный метод и методы биохимического исследования крови [7, 8].

Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования нами определялся уровень загрязненности кадмием районов Оренбургской области по средству изучения биосубстратов сельскохозяйственных животных в различных районах Оренбургской области (таблица 1).

Таблица 1

Содержание кадмия в биосубстратах животных из разных районов Оренбургской области,

мг/г

Район	исследуемые биосубстраты			
	Мышцы	Печень	Сердце	Почки
Сакмарский	0,005±0,002	0,31±0,01	0,05±0,014	0,51±0,014
Сорочинский	0,007±0,001	0,30±0,04	0,06±0,001	0,30±0,04
Соль-Илецкий	0,007±0,01	0,31±0,02	0,06±0,01	0,31±0,02
Кваркенский	0,009±0,01	0,41±0,02	0,06±0,01	0,59±0,01
Светлинский	0,01±0,001	0,25±0,02	0,05±0,001	0,25±0,02

Представленные данные свидетельствуют, что максимальный уровень загрязненности кадмием зарегистрирован в Кваркенском районе, при этом максимальной биоаккумулирующей способностью обладают почки и печень исследуемых животных.

Для решения второй и третьей задач нами использовались следующие методы: выделения чистых культур, последовательного разведения, фотоэлектроколориметрический и атомно-адсорбционный [7]. Биохимические (сахар, холестерин, мочевины, общий белок, аланинаминотрансфераза, билирубин, креатинин, щелочная фосфатаза) показатели крови исследовались в соответствии с общепринятыми методиками [8].

Относительно значений накопления ионов кадмия, в соответствии с данными, представленными на рисунке 1, можно отметить, что они намного ниже, чем значения накопления остальных металлов, и штаммовых различий не наблюдается.

Так, содержание ионов кадмия в биомассе *B.subtilis* 534 и *B.subtilis* ВКПМ В 7048 составляет 5,68 и 4,93 процента, а в биомассе *B.cereus* IP 5832 и *B.licheniformis* ВКПМ В 7043 4,3 и 3,88 процента соответственно.

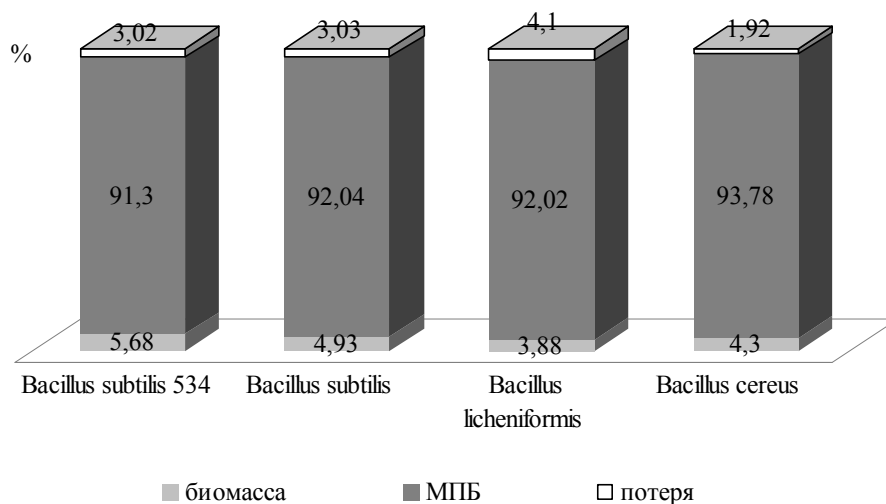


Рис. 1. Содержание кадмия в биомассе бактерий рода *Bacillus* и в супернатанте

Одним из факторов оценки эффективности применения пробиотических препаратов при интоксикации тяжелыми металлами являлась определение колониеобразующих единиц (КОЕ) исследуемых микроорганизмов в крови и фекалиях (рисунок 2, 3) экспериментальных животных.

В ходе проведенных исследований нами было установлено, что во всех опытных группах и группах контроля пробиотических препаратов на протяжении всего эксперимента регистрируется увеличение КОЕ с пиком значений к 21.

Близкая по значению тенденция зарегистрирована при определении КОЕ пробиотических штаммов в фекалиях исследуемых животных.

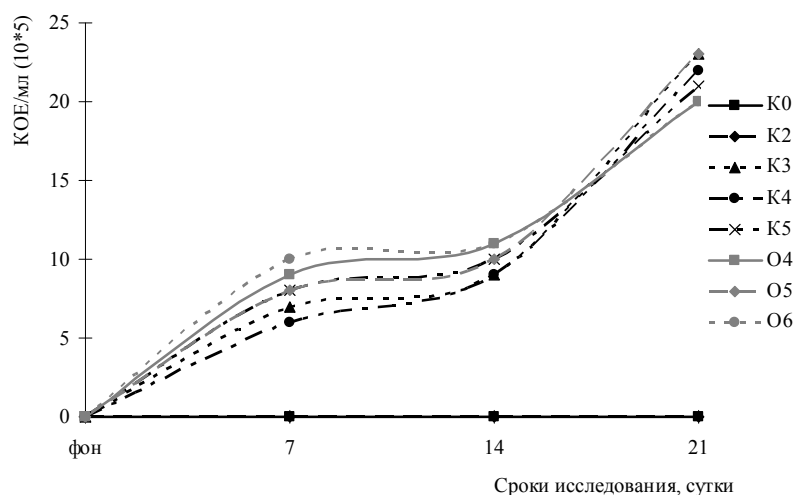


Рис. 2. Динамика КОЕ исследуемых микроорганизмов в крови лабораторных животных при интоксикации кадмием

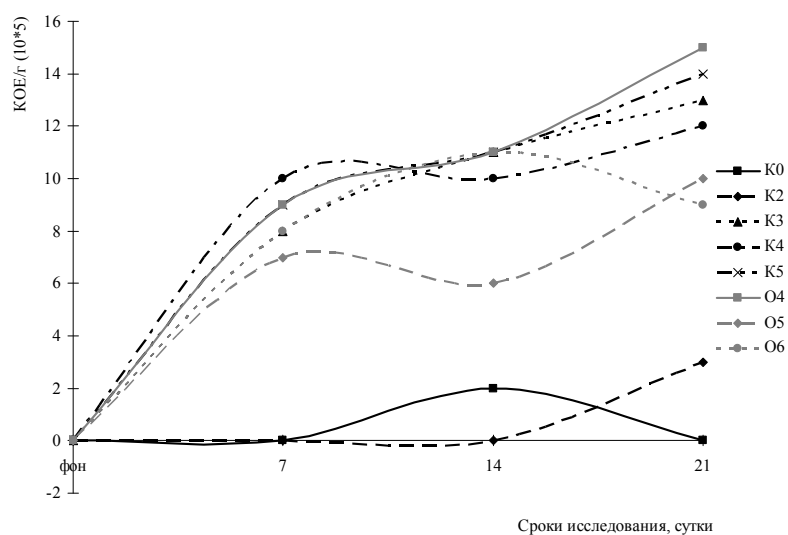


Рис. 3. Динамика КОЕ исследуемых микроорганизмов в фекалиях лабораторных животных при интоксикации кадмием

Биохимическое исследование сыворотки крови экспериментальных животных позволяет оценить как степень влияния ксенобиотиков на метаболические процессы, так и наличие патологических изменений со стороны внутренних органов, в частности наличие возможных дегенератических изменений со стороны органов, отвечающих за детоксикацию (печень, селезенка). Исходя из вышеизложенного, следует, что наиболее показательными являются общий билирубин, АлАТ и щелочная фосфатаза.

Как известно, билирубин является одним из промежуточных продуктов распада гемоглобина, происходящего в макрофагах селезенки, печени и костном мозге. Он

образуется путём ферментативного восстановления биливердина. Исходя из этих данных, можно предположить, что повышение концентрации этого показателя крови может свидетельствовать о токсическом повреждении печени (рисунок 4).

В случае с интоксикацией кадмием картина динамики не выглядит столь однозначно. Содержание билирубина в опытных группах на протяжении всего эксперимента имело более высокие значения, как в отношении группы общего контроля, так и в отношении группы контроля интоксикации кадмием. С сохранением тенденции к увеличению в группе, где применялся «Споробактерин». В то время как в группе, где в качестве лекарственного препарата применялся «Ветом 2», на заключительном этапе исследования уровень билирубина имел более низкие значения по сравнению с группой К₀.

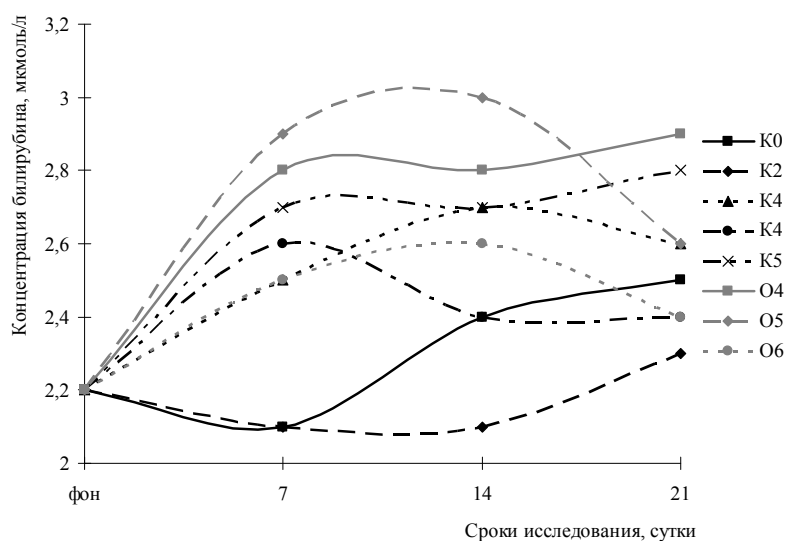


Рис. 4. Динамика изменения концентрации общего билирубина в крови лабораторных животных при интоксикации кадмием

Анализ динамики АлАТ, как и в случае с общим билирубином имеет идентичную закономерность к увеличению данного показателя на 7 день эксперимента, однако следует отметить, что в опытных группах его концентрация была ниже контрольного значения (К₁) с последующей нормализацией к 21 дню эксперимента до уровня физиологической нормы.

Щелочная фосфатаза участвует в обмене фосфорной кислоты, расщепляя ее от органических соединений и способствуя транспорту фосфора в организме. У человека щелочная фосфатаза представлена во всех тканях, особенно высокая концентрация в печени, желчном протоке, почках, костях и плаценте. Её повышение может свидетельствовать о патологии печени (рисунок 5).

Представленные на графике данные подтверждают наши предположения о развитии токсического эффекта при интоксикации свинцом, причем фаза обострения регистрируется

на 7 день эксперимента. Однако в опытных группах значения данного показателя, как и ряда других проанализированных показателей, снижается к финалу эксперимента.

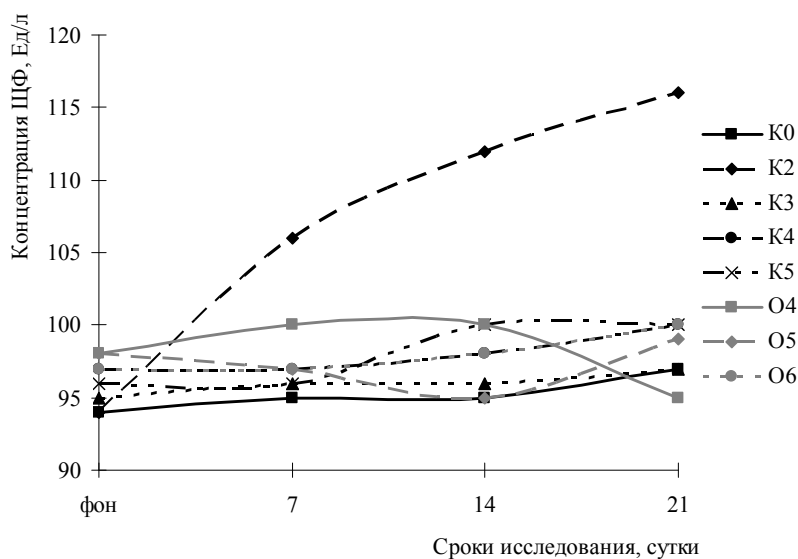


Рис. 5. Динамика изменения концентрации щелочной фосфатазы в крови лабораторных животных при интоксикации свинцом

Оценка биоаккумулирующей способности на модели *in vivo* оценивалась путем определения кадмия в мышечной и костной тканях, а также кожном покрове. Количество кадмия в мышечной ткани лабораторных животных на 7 день исследования в опытных группах (О₄, О₅, О₆) превышало значения К₀ на 89; 61 и 84 процента соответственно, однако, уровень показателей оказался ниже значений группы К₁, в группе О₄ на 17; О₅ на 10 и О₆ на 7 процентов. После 14 дня эксперимента содержания кадмия уменьшилось по сравнению с опытными группами 21 дня в О₄ на 25; О₅ на 6 и О₃ на 11 процентов, соответственно. Как и при выведении кадмия из костной ткани к 21 дню эксперимента наблюдается уменьшение количества выведенного кадмия из мышечной ткани, при этом на 21 день эксперимента по сравнению с 14 днем содержание кадмия уменьшилось в опытных группах на 6; 7 и 7 процентов соответственно. К 21 дню К₁ превышает показатели опытных групп на 40 процентов для О₄, на 43 – О₅ и 20 процентов для О₆.

Аналогичная динамика изменения концентрации ионов кадмия наблюдалась при исследовании костной ткани и кожном покрове. В таблице 2 представлены суммарные значения выведения кадмия в опытных группах на 21 день эксперимента в сравнении с группой К₁ (интоксикация кадмием).

Таблица 2

Сравнительный анализ биоаккумуляции пробиотических штаммов в условиях *in vivo* и *in vitro*

Препарат	Аккумуляция кадмия, %	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
Споробактерин	61,5	5,7
Бактисубтил	57,7	4,4
Ветом 2	44,3	4,3

Таким образом, в результате первой серии эксперимента было установлено, что у животных, разведение которых осуществляется в районах, расположенных в непосредственной близости с Челябинской областью (Кваркенский и Светлинский), наблюдается повышенное содержание кадмия в организме.

Во второй серии эксперимента было установлено, что применение пробиотических препаратов позволяет существенно снизить уровень ксенобиотической нагрузки на организм животных. Так, применение препаратов на основе бактерий рода *Bacillus* снижает уровень кадмия в тканях лабораторных животных в среднем более чем на 50 %, при этом наиболее эффективным препаратом является «Споробактерин».

Список литературы

1. Абрамова Л.Л. Оценка эффективности применения пробиотических препаратов при лечении сальмонеллеза на основании исследования показателей крови / Л.Л. Абрамова, А.Н. Сизенцов, Н.В. Шеботина // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 2. – № 30-1. – С. 249-253.
2. Будников Г.К. Тяжелые металлы в экологическом мониторинге водных систем / Г. К. Будников // Соревольный образовательный журнал. – 2000. – № 5. – С. 23-29.
3. Государственный доклад. О состоянии и об охране окружающей среды Оренбургской области в 2009 году. – Оренбург, 2010. – 261 с.
4. Сальникова Е.В. Сравнительная оценка содержания цинка в питьевых водах и почвах Оренбургской области / Е.В. Сальникова, Е.А. Осипова, Н.В. Заболотная // Вестник ОГУ. – 2014. – № 6 (167)/июнь. – С.155-157.
5. Сальникова Е.В., Сизенцов А.Н. Оценка загрязненности Оренбургской области свинцом и кадмием и перспективы использования пробиотиков для снижения ксенобиотической нагрузки // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5; URL: <http://science-education.ru/ru/article/view?id=25188>.
6. Сизенцов А.Н. Аккумуляция тяжелых металлов пробиотическими препаратами на основе бактерий рода *Bacillus* в условиях *in vitro* / А.Н. Сизенцов, Т.А. Гальченко, Ю.И. Мартынович // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – № 216. – С. 303-307.

7. Green-Ruiz, C. Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus sp.* from a tropical estuary / C. Green-Ruiz // *Bioresource Technology*. – 2006. – V. 97. – No. 10. – pp. 1907-1911.
8. Volesky B. Biosorption of Heavy Metals / B. Volesky, Z. Holan // *Biotechnology Progress*. – 2008. – V. 11. – No. 3. – pp. 235 – 250.