

УДК 579.61

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ НА ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ У ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПРОЗООНОЗОВ

^{1,2}Бузолева Л.С., ^{1,2}Богатыренко Е.А., ¹Ким А.В.

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток;

²ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, Владивосток, e-mail: buzoleva@mail.ru

Возбудители сапрозоонозов способны адаптироваться к широкому спектру тяжелых металлов. Возможность выживания в присутствии поллютантов зависит от биологических свойств бактерий, вида и концентрации металла, в соответствии с чем, в ходе настоящих исследований подобраны максимальные концентрации тяжелых металлов, к которым устойчивы изучаемые бактерии. Установлено, что тяжелые металлы оказывают как стимулирующее, так и угнетающее воздействие на факторы патогенности. Показано, что тяжелые металлы усиливают адгезивные свойства иерсиний и сальмонелл. Высокой адгезивностью обладают штаммы, устойчивые к свинцу и никелю. Тяжелые металлы усиливают вирулентные свойства патогенных иерсиний и сальмонелл. Сокращение сроков гибели лабораторных животных и усиление вирулентности иерсиний и сальмонелл под воздействием свинца является результатом повышения адгезии – первого этапа в развитии инфекционного процесса, способствующего дальнейшей реализации патогенных свойств возбудителя.

Ключевые слова: сапрозоонозы, тяжелые металлы, факторы патогенности

THE INFLUENCE OF HEAVY METALS ON VIRULENCE FACTORS OF SAPROZOONOSIS AGENTS

^{1,2}Buzoleva L.S., ^{1,2}Bogatyrenko E.A., ¹Kim A.V.

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok;

²Research institute of epidemiology and microbiology n.a. G.P. Somov, Vladivostok, e-mail: buzoleva@mail.ru

Saprozoonosis agents are capable to adapt for a wide range of heavy metals. Possibility of a survival in the presence of pollution depends on biological properties of bacteria, type and concentration of metal. So during current researches the maximum concentration of heavy metals against which studied bacteria are steady were estimated. It is established heavy metals render both stimulating and oppressing impact on virulence factors. It is shown heavy metals strengthen the adhesive properties of *Yersinia* and *Salmonella* strains. The strains steady against lead and nickel possess the high adhesiveness. Heavy metals strengthen virulence properties of pathogenic *Yersinia* and *Salmonella* strains. Decreasing death period of laboratory animals and strengthening of *Yersinia* and *Salmonella* strains' virulence under the influence of lead is result of adhesion increase which is the first stage in development of the infectious process promoting further realization of pathogenic properties of the agent.

Keywords: saprozoonosis, heavy metals, virulence factors

Известно, что у патогенных бактерий биологические свойства проявляются как факторы патогенности. Наибольшее значение имеют бактериальные ферменты, обладающие токсическим действием. Вырабатываемые бактериями, они могут влиять на течение, исход болезни и на иммунитет макроорганизма. Многие энзимы патогенных и условно-патогенных микробов, катализирующие чуждые животному организму реакции, могут являться типичными токсинами, обладающими антигенными свойствами. Ферменты паразитирующих в организме микробов способны образовывать ядовитые продукты, как за счет распада своих составных частей, так и за счет разложения веществ животного организма [6].

Изучение влияния тяжелых металлов на ферментативную активность патогенных микробов является важным, так как многие наступающие при этом изменения в свойствах бактерий могут влиять на их вирулентность, а, следовательно, на скорость и качество течения инфекционного процесса.

Цель работы – изучить влияние ионов тяжелых металлов на ферментативную ак-

тивность и вирулентные свойства патогенных бактерий – возбудителей сапрозоонозов.

Материал и методы исследования

В качестве объектов исследований были использованы следующие микроорганизмы: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*; *Yersinia pseudotuberculosis*: штамм H-2781, 282. Эксперименты проводили в условиях острого опыта.

Уровень индивидуальной устойчивости бактериальных штаммов к ионам тяжелых металлов: Ni²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ оценивали на основе определения максимальной концентрации соли каждого металла, при которой не был отмечен эффект подавления роста культуры [1]. Посев производили в трех повторностях методом отпечатков чистых культур на среду МПА (для *Yersinia* и *Salmonella*) с добавками солей металлов в возрастающих концентрациях. Подобраны максимальные концентрации тяжелых металлов, к которым были устойчивы выбранные патогенные бактерии.

Для оценки адгезивной активности в качестве клеточного объекта нами были использованы эритроциты, а показателем адгезии служил СПА – средний показатель адгезии, то есть среднее количество адгезированных клеток штамма на одном эритроците. Адгезивность считали нулевой при СПА от 0 до 1,0; низкой при СПА от 1,01 до 2,0; средней при СПА от 2,01 до 4,0; высокой при СПА больше 4 [2].

**Результаты исследования
и их обсуждение**

Анализ определения максимальных концентраций солей тяжелых металлов, к которым были резистентны исследуемые тест-микроорганизмы показали, что все взятые в эксперимент штаммы обладали наибольшей устойчивостью к свинцу и никелю, а бактерии рода *Salmonella* – еще и к меди. При сравнении максимальных концентраций солей тяжелых металлов, к ко-

торым устойчивы исследуемые бактерии, были выявлены существенные отличия (табл. 1). Так, штаммы *Y. pseudotuberculosis* были наименее устойчивы ко всем тяжелым металлам, по сравнению со штаммами бактерий рода *Salmonella*. По степени уменьшения резистентности штаммов *Y. pseudotuberculosis* к тяжелым металлам их можно расположить в следующей последовательности: Pb > Ni > Zn > Cu > Co > Cd. Для сальмонелл выявлена другая последовательность: Pb > Ni = Cu > Zn = Co > Cd.

Таблица 1

Максимальные концентрации солей тяжелых металлов (мг/л в пересчете на безводную соль), к которым устойчивы исследуемые штаммы бактерий

Штамм	Pb(NO ₃) ₂	NiCl ₂	CdCl ₂	ZnCl ₂	CoCl ₂ · 6H ₂ O	CuCl ₂ · 2H ₂ O
<i>Y.pseudotuberculosis</i> штамм H- 2 781	800	300	20	200	100	200
<i>Y.pseudotuberculosis</i> штамм 282	800	300	20	200	100	200
<i>S.typhimurium</i>	1000	400	60	200	200	400
<i>S. enteritidis</i>	1000	400	60	200	200	400

На втором этапе исследований адаптировали экспериментальные штаммы к максимальным концентрациям поллютантов путем шестикратных ежедневных пассажей (пересевов) на среды, содержащие соли тяжелых металлов. В качестве контроля были взяты эти же штаммы, но не пассированные на средах с тяжелыми металлами. Характер роста культур исследуемых бактерий на среде с металлами не отличался от контроля. Следует отметить наличие коричневого пигмента у исследуемых штаммов бактерий, выросших на среде со свинцом в отличие от контроля.

При изучении влияния ионов тяжелых металлов (Ni⁺, Zn⁺, Co²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺) на биологические свойства исследуемых патогенных бактерий, было установлено, что последние подвергались изменениям.

Нами была исследована активность следующих ферментов, являющихся факторами патогенности для бактерий: гиалуронидазы, плазмокоагулазы, липазы, фосфатазы, лецитиназы, нитратредуктазы, оксидазы, каталазы, а также было изучено влияние ионов тяжелых металлов на гемолиз и адгезивные свойства исследуемых штаммов (табл. 2).

Таблица 2

Влияние солей тяжелых металлов на средний показатель адгезии у исследуемых бактерий

Штамм	Контроль	Pb	Ni	Cd	Zn	Co	Cu
<i>Y.pseudotuberculosis</i> штамм H- 2781	2,6 ± 0,3	16,9 ± 1,7	13,1 ± 2,1	11,4 ± 1,5	12,4 ± 1,8	12,2 ± 1,7	10,4 ± 1,0
<i>Y.pseudotuberculosis</i> штамм 282	10,6 ± 0,7	16,1 ± 1,4	16,3 ± 1,5	15,6 ± 1,8	12,2 ± 1,2	13,8 ± 2,1	13,4 ± 1,8
<i>S. typhimurium</i>	10,7 ± 1,1	14,1 ± 0,7	13,5 ± 1,9	5,5 ± 0,7	8,2 ± 1,2	6,7 ± 0,8	6,3 ± 0,6
<i>S. enteritidis</i>	10,2 ± 1,3	16,4 ± 1,9	13,2 ± 1,5	10,1 ± 1,4	10,3 ± 1,3	10,9 ± 1,4	10,5 ± 1,6

Адгезивная активность микроорганизмов является одним из персистирующих признаков, предназначенная для выполнения их селективной адсорбционно-инвазивной функции по отношению к определенной ткани [5].

Было установлено, что под воздействием ионов тяжелых металлов показатели адгезии для *Y. pseudotuberculosis* штамм H-2781

возросли в среднем в 4 и более раз по сравнению с контролем (табл. 2). Наибольшим СПА обладал штамм, подвергавшийся действию ионов свинца. Его СПА соответствовал высокой адгезивности, тогда как контроль обладал средней адгезивностью.

Для сальмонелл, в общем, характерно было угнетающее воздействие металлов на адгезивные свойства, по сравнению

с контролем. У обоих штаммов стимулировали адгезию только Pb и Ni. Максимальные значения СПА проявились под воздействием ионов свинца.

Под влиянием тяжелых металлов изменялась гиалуронидазная активность у исследуемых микроорганизмов (табл. 3). Из литературных источников известно, что

особенности биологического действия гиалуронидазы обусловлены специфической каталитической активностью этого фермента. Расщепление гиалуроновой кислоты – основного строительного элемента соединительнотканых структур, является той функцией, которая обеспечивает микробу продвижение в тканях [7].

Таблица 3

Влияние солей тяжелых металлов на проявление гиалуронидазной активности у исследуемых бактерий*

Штамм	Контроль	Pb	Ni	Cd	Zn	Co	Cu
<i>Y.pseudotuberculosis</i> штамм H- 2 781	–	++	–	–	++	–	++
<i>Y.pseudotuberculosis</i> штамм 282	+	+	–	++	–	–	–
<i>S.typhimurium</i>	–	++	++	++	–	–	–
<i>S. enteritidis</i>	–	+++	+	+	–	–	–

Пр и м е ч а н и е . * результаты оценивали по 3-кrestной системе (+ слабая реакция; ++ средняя реакция; +++ активная реакция).

Сравнительный анализ результатов показал, что ионы тяжелых металлов могут, как стимулировать, так и угнетать активность гиалуронидазы исследуемых бактерий. При этом не было выявлено закономерности в проявлении активности фермента в зависимости от вида микроорганизма и тяжелого металла.

Было показано, что для *Y.pseudotuberculosis* только Pb, Zn и Cu стимулировали активность гиалуронидазы у штамма H-2781 по сравнению с контролем. У штамма 282 Ni, Zn, Co, Cu подавляли активность этого фермента. Повышение активности гиалуронидазы наблюдали у сальмонелл под влиянием Pb, Ni и Cd.

Известно, что липаза расщепляет жирные кислоты, способствуя тем самым разрушению липидных компонентов клеточной стенки [5]. В результате исследований липазной активности было отмечено, что тяжелые металлы не вызывали стимуляцию активности этого фермента у иерсиний и сальмонелл по сравнению с контролем.

Следует отметить, что у всех исследуемых патогенных бактерий ионы тяжелых металлов не оказывали никакого воздействия на такие ферменты как фосфатаза, лецитиназа, каталаза, оксидаза, а также не стимулировали усиление гемолитической активности штаммов.

В результате изучения нитратредуктазной активности было обнаружено, что тяжелые металлы влияли на активность энзима бактерий. Нитратредуктаза синтезирует аммиак, служащий исходным материалом для синтеза аминокислот, амидов и белков

[4]. Так появление нитратредуктазной активности наблюдали только у иерсиний, которую стимулировали медь, кадмий и свинец у шт. H-2781 и шт. 282. У остальных тест-микроорганизмов активность фермента не усиливалась в присутствии тяжелых металлов.

Штаммы, которые обладали наиболее выраженными ферментативными свойствами в присутствии тяжелых металлов, были исследованы в отношении изменения вирулентных свойств по сравнению с контролем.

Для постановки опыта были отобраны следующие штаммы бактерий: Cu-устойчивый и Pb-устойчивый штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* H-2781; Cd- и Ni-резистентные штаммы *Yersinia pseudotuberculosis* 282; Ni-устойчивый штамм *Salmonella typhimurium*, Pb-устойчивый штамм *Salmonella enteritidis*. Контроль – штамм, культивируемый на среде, не содержащей металл (табл. 4).

Интересные результаты были получены в опыте с Pb-устойчивым штаммом *Y.pseudotuberculosis* H-2781. Так, через сутки после заражения пали мыши, зараженные псевдотуберкулезным микробом, выращенным на свинце. В контроле мыши пали на девятые сутки. На более поздних сроках наблюдали гибель животных от штамма, отягощенного металлом. Большинство мышей пало от малой дозы Pb-устойчивого штамма. Гибель животных в контроле после девятих суток зарегистрирована не была.

Таким образом, мыши, зараженные Pb-устойчивым штаммом *Y.pseudotuberculosis* H-2781 погибали быстрее, чем в контроле.

При этом максимальное количество животных пало от малой дозы металл-резистентного штамма. Это свидетельствует о том,

что свинец усиливал вирулентность псевдо-туберкулезного штамма *H-2781*, по сравнению с контролем.

Таблица 4

Влияние тяжелых металлов на вирулентные свойства исследуемых бактерий

Штамм		LD ₅₀	Сроки гибели 50% мышей (дни)
<i>Y.pseudotuberculosis H-2781</i>	контроль	10 ⁴ –10 ⁶	30
	Си-устойчивый	10 ⁴ –10 ⁶	30
	Pb-устойчивый	10 ² –10 ⁴	17
<i>Y.pseudotuberculosis 282</i>	контроль	юМо ⁴	29
	Ni- устойчивый	юМо ⁴	15
	Cd- устойчивый	10 ² –10 ⁴	19
<i>Salmonella typhimurium</i>	контроль	10 ⁴ –10 ⁶	28
	Ni- устойчивый	10 ⁴ –10 ⁶	20
<i>Salmonella enteritidis</i>	контроль	10 ⁴ –10 ⁶	20
	Pb-устойчивым	10 ² –10 ⁴	6

В эксперименте с Cd- и Ni-устойчивыми штаммами *Y. pseudotuberculosis 282*, Ni-резистентным штаммом *Salmonella typhimurium* было установлено, что они не изменили своих вирулентных свойств по сравнению с контролем (штамм без металла), но уменьшили сроки гибели 50% животных.

В результате эксперимента со Pb-устойчивым штаммом *Salmonella enteritidis* было установлено, что свинец ускорял гибель опытных животных. Так, через шесть суток после заражения пали мыши, зараженные максимальной дозой штамма, отягощенного металлом. При этом в контроле мыши гибли на десятые и двадцать четвертые сутки. На более поздних сроках наблюдали гибель животных от более слабых доз Pb-устойчивой культуры. Контрольные мыши не погибали.

Заключение

У иерсиний и сальмонелл адгезия на эритроцитах обеспечивается пиллями, расположенными на поверхности клеток [3, 5]. Адгезируясь, на эпителии ЖКТ, они проникают внутрь клетки посредством действия фермента гиалуронидазы, где, размножаясь и разрушая клетку, попадают в кровоток, реализуя там основные факторы патогенности -энтеротоксины и экзотоксины. Таким образом, тяжелые металлы, вызывая усиление адгезивных и инвазивных свойств иерсиний и сальмонелл, увеличивают количество микроорганизмов, проникающих в клетки эпителия, способствуя этим ускорению развития иерсиниозной и сальмонеллезной инфекции. Следовательно, взаимодействие тяжелых металлов с возбудителями сапрозоонозов, при их обитании в объектах окружающей среды, способствует появлению эпидемически опасных штаммов, представляющих угрозу для здоровья человека.

Список литературы

1. Безвербная И.П., Бузолева Л.С., Христофорова Н.К. Металлоустойчивые гетеротрофные бактерии в прибрежных акваториях Приморья // Биология моря. – 2005. – Т. 31. – № 2. – С. 89–93.
2. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П., Ленцнер А.А. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лабораторное дело. – 1986. – № 4. – С. 210–212.
3. Лабинская, А.С., Блинкова Л.П. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. – М.: Медицина, 2005. – 600 с.
4. Львов Н. П. Молибден и ассимиляция азота у растений и микроорганизмов // 43 Баховские чтения. – М.: Наука, 1989. – 86 с.
5. Поздеев О.К., Покровский В.И. Медицинская микробиология: учебное пособие для ВУЗов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2001. – 765 с.
6. Супотницкий М.В. Микроорганизмы, токсины и эпидемии. – М.: Изд-во «Вузовская книга», 2000. – 376 с.
7. Самойленко И.И., Белодед А.В., Цепилов Р.Н. Синтез и деградация гиалуроновой кислоты бактериями рода *Streptococcus* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2010. – № 5. – С. 83–90.

References

1. Bezverbnaya I.P., Buzoleva L.S., Khristoforova N.K., Marine biology, 2005, vol. 31, no. 2, pp. 89–93.
2. Brilis V.I., Brilene T.A., Lentsner H.P., Lentsner A.A., Laboratornoe delo [Laboratory work]. 1986, no. 4, pp. 210–212.
3. Labinskaya A.S., Blinkova L.P. Obschaya i sanitarnaya mikrobiologiya s tehnikoi mikrobiologicheskikh issledovaniy [General and sanitary microbiology with technique of microbiological research]. Moscow, Meditsina Publ., 2005. 600 p.
4. Lvov N.P. 43 Bahovskie chtenie [43 Bach's readings]. Moscow, Nauka Publ, 1989. 86 p.
5. Pozdeev O.K., Pokrovskii V.I. Meditsinskaya mikrobiologiya [Medical microbiology]. Moscow, GEOTAR-Media Publ., 2001. 765 p.
6. Supotnitskii M.V. Microorganizmy, toksiny i epidemii [Microorganisms, toxins and epidemics]. Moscow, Vuzovskaya kniga Publ., 2000. 376 p.
7. Samoilenko I.I., Beloded A.V., Tsepilov R.N., Zhurnal mikrobiologii i immunologii [Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology], 2010, no. 5, pp. 83–90.

Рецензенты:

Мартынова А.В., д.м.н., профессор кафедры эпидемиологии и военной эпидемиологии, ГБОУ ВПО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» министерство здравоохранения России, г. Владивосток;

Кузнецова Т.А., д.б.н., зав. лабораторией иммунологии, ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, г. Владивосток.

Работа поступила в редакцию 05.12.2013.