**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТАГОНИСТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ЛАКТОБАЦИЛЛ, ИММОБИЛИЗОВАННЫХ НА КАРБОНИЗОВАННОМ СОРБЕНТЕ**

И.С.Савицкая, А.С. Кистаубаева, К. Нигметова, Н.В.Воронова

Казахский национальный университет им.аль-Фараби

При пероральном приеме пробиотиков, содержащих живые микроорганизмы или их активные метаболиты, преодоление естественных барьеров (кислая среда и протеолитические ферменты желудка или секреты мембран кишечных и слизистых оболочек и ворсинок) сопровождается значительной потерей исходной активности готовых лекарственных форм. Клинико-экспериментальные исследования показали, что под действием желудочного сока и желчи пробиотики теряют более 90% своей активности еще до момента попадания в кишечник [1].

Для сохранения жизнеспособности клеток бактерий-пробиотиков их можно, но и закреплять на поверхности носителя-сорбента [2].

Среди сорбентов, которые могут быть использованы для иммобилизации пробиотиков особый интерес представляют активированные угли нового типа, полученные путем высокотемпературной карбонизации и последующей активации отходов растительного происхождения, таких как скорлупа грецких и кокосовых орехов, абрикосовые косточки, рисовая шелуха и т.п. Несомненным достоинством этих сорбентов является то, что производятся они из дешевого, причем ежегодно возобновляемого растительного сырья. Широкий диапазон размеров пор и большая удельная поглощающая поверхность карбонизованных материалов обеспечивают наличие у них высоких прикрепительных и детоксикационных свойств [3].

Это послужило основанием для изучения возможности иммобилизации клеток лактобацилл на сорбенте из зауглероженной рисовой шелухи (ЗРШ), полученной Институте проблем горения КазНУ им.аль-Фараби.

*Цель работы:* Исследовать влияние иммобилизации клеток лактобацилл на зауглероженной рисовой шелухе на их антагонистическую активность и устойчивость к неблагоприятным факторам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве пробиотического компонента использованы отобранные ранее 3 штамма бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащие к трем наиболее типичным видам интестинальной лактофлоры: *L.fermentum* АК-2R, *L.acidophilus* AA-1Rи *L.plantarum* AP-1R.

Иммобилизацию клеток лактобацилл проводили в течение 10 часов, затем носитель отмывали от слабо прикрепившихся клеток изотоническим раствором и использовали в дальнейших экспериментах. Эффективность сорбции бактерий рассчитывали по разнице концентраций клеток микроорганизмов в культуральной среде до и после сорбционного процесса [4]. Для определения степени устойчивости иммобилизованных клеток лактобацилл к биологическим жидкостям использовали желудочный сок (20-30%), который добавляли в среду, содержащую 109 КОЕ/мл бактериальных клеток. Клетки лактобацилл экспонировали с желудочным соком в течение 60 мин, после чего производили высев на твердую среду МРС-1 для определения количества жизнеспособных клеток. Антагонистическую активность определяли после совместного культивирования комплекса иммобилизованных клеток лактобацилл (КИКЛ) в жидкой питательной среде MRС-5 в течение 24 часов в отношении трех тест-культур *Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus и Candida albicans*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе встречаются разноречивые данные о времени установления сорбционного равновесия в системе клетка-носитель. Некоторые авторы считают, что сорбция клеток из концентрированной суспензии микроорганизмов обычно полностью проходит за 5-10 минут, дальнейшее продление времени контакта, как правило, не увеличивает количества сорбированных клеток. Однако, для некоторых микроорганизмов сорбционный процесс продолжался в течение более длительного взаимодействия клеточной суспензии с носителем [4]. В наших экспериментах количество сорбированных клеток после 10 часового контакта суспензии с носителем намного выше, чем после 1-2 часового, что может объясняется изменением свойств поверхности клеток в процессе длительной иммобилизации [5]. Однако, увеличение времени контакта суспензии микроорганизмов с носителем до 24 часов не приводило к возрастанию количества прикрепившихся клеток. На основании этого можно считать, что 10 часов - оптимальное время для иммобилизации клеток лактобацилл на ЗРШ в использованных условиях.

Для повышения эффективности иммобилизации иногда предлагается окислительная модификация сорбентов гипохлоритом натрия, озоном [6] или поверхность сорбционных материалов обрабатывают двухвалентными катионами или этанолом [7]. Такой способ может менять заряд на поверхности дисперсионных частиц и часто приводит к усилению взаимодействия с противоположно заряженными группами на поверхности клетки. В связи с этим, с целью увеличения удельной емкости сорбент ЗРШ предварительно обрабатывали этанолом. Для этого использовали сетчатый стакан (стакан Бернрейтера), замачивали 100 г сорбента в 500 мл 80% этанола, смесь перемешивали и оставляли на 3 часа, затем сорбенты извлекали из цилиндра, после чего промывали дистиллированной водой и автоклавировали при 1 атм. в течение 1 часа. Данные, иллюстрирующие способность клеток лактобацилл к иммобилизации на сорбенте ЗРШ, обработанным вышеуказанным способом, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Эффективность иммобилизации клеток лактобацилл на ЗРШ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Штаммы | Эффективность сорбции, % | | Десорбция клеток, % | |
| ЗРШ | ЗРШ после обработки этанолом | ЗРШ | ЗРШ после обработки этанолом |
| *L.acidophilus AA-1* | 44±0,2 | 65±8,0 | 10±0,4 | 2±0,1 |
| *L.plantarum AP-1* | 40±0,07 | 62±4,0 | 12±0,06 | 4±0,2 |
| *L.fermentum АК-2R* | 54±0,3 | 78±6,0 | 8±0,5 | 3±0,05 |

Установлено, что после обработки сорбента этанолом его клеточная загрузка увеличилась и достигает – 62-78%. Кроме того, при модифицировании поверхностей этанолом десорбция клеток также снижается, что свидетельствует о повышении прочности их прикрепления к носителю.

На поверхности носителя – ЗРШ была иммобилизована и смешанная культура лактобацилл, состоящая из всех трех штаммов. Оказалось, что бактерии хорошо адсорбируются на данном сорбенте, титр прикрепившихся клеток достигает 109 КОЕ/г.Однако, количество клеток штаммов *Lactobacillus fermentum* АК-2R было гораздо больше, чем *Lactobacillus acidophilus* AА-1 и *Lactobacillus plantarum* AР-1. Полученный биосорбент содержит 5,3х108 КОЕ/г клеток штамма АК-2R. Клетки двух остальных штаммов распределены поровну (2,5х108 КОЕ/г клеток штамма АА-1 и 2,2х108 КОЕ/г – АР-1). Следовательно, соотношение компонентов каждого вида составляет 2:1:1. Это может быть связано со штаммовыми различиями поверхностных сайтов бактериальных клеток. Клетки на поверхности ЗРШ расположены в основном в виде микроколоний. Этот факт может иметь существенное значение, поскольку межбактериальное агрегирование, происходящее в микроколониях - начальный этап образования биопленок, в которых бактерии значительно лучше защищены от неблагоприятных воздействий [8-10].

В наших экспериментах таковым является кислая среда желудка, при транзите через который большая часть микробных клеток погибает. Для изучения чувствительности свободных и иммобилизованных клеток к такому стрессовому воздействию использовался желудочный сок, который был пoлучен при гастроскопии. Его добавляли к культуре лактобактерий в среде МРС-1, содержащей 109 клеток/мл и инкубировали в течение часа, после чего определяли количество выживших клеток. При воздействии желудочного содержимого на жидкий концентрат лактобактерий их биотитр (концентрация живых клеток) уменьшается на 4 порядка (рис. 1). Это означает, что при пероральном применении суспензии лактобактерий следует ожидать, что лишь незначительная часть их жизнеспособных клеток достигает толстого кишечника. По этой причине его следует рассматривать скорее как ценный продукт питания, богатый ферментами, витаминами, но не как лекарственный препарат, предназначенный для активной колонизации кишечника лактобациллами. Использование в экспериментах с «модельным желудком» не свободных, а иммобилизованных клеток лактобацилл выявило, что прикрепление микробных клеток на сорбент ЗРШ оказывает защитное действие в отношении желудочного сока. Количество жизнеспособных клеток в этом случае снижается лишь на порядок. Скорее всего, это связано с тем, что клетки, входящие в состав образованных на сорбенте микроколоний, лучше защищены от бактерицидных факторов и неблагоприятного действия окружающей среды, поскольку покрыты дополнительной общей мембраной [1]. Поэтому иммобилизованные пробиотики по устойчивости к воздействию желудочного сока значительно превосходят жидкий концентрат на основе свободных клеток микроорганизмов и могут беспрепятственно преодолевать «желудочный» барьер при их пероральном введении.

Кроме того, их метаболитическая активность выше, поскольку в составе микроколоний и биопленок она контролируется на основе «Quorum sensing». Эта система носит такое название, поскольку она координирует работу генов, экспрессия которых происходит только при достижении определенной плотности микробной популяции (не менее 107 клеток/мл). Гены, кодирующие ферменты, обеспечивающие синтез лактобациллами таких антимикробных факторов как бактериоцины и микроцины, регулируются этой системой [1; 11].

Рисунок 1 - Влияние искусственной желудочной среды на жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток лактобацилл

Активность пробиотиков, определяемую в условиях *in vitro*, принято оценивать по титру микробных клеток в препарате или уровне их физиологической активности. Поскольку важнейшей характеристикой эффективности пробиотического действия является антимикробная активность, представлялось целесообразным изучение влияния иммобилизации на этот показатель. Антагонистическую активность определяли после совместного культивирования комплекса иммобилизованных клеток лактобацилл (КИКЛ) в жидкой питательной среде MRС-5 в течение 24 часов в отношении трех тест-культур *Salmonella typhimurium, Staphylococcus aureus и Candida albicans*. Ингибирующий эффект препарата определяли по количеству выживших клеток тест-штаммов (% к их уровню при выращивании в питательной среде без пробиотиков). Для этого в систему вносили 1 мл взвеси лактобацилл в концентрации 108 КОЕ/мл, 1 г КИКЛ или 1 г сорбента без клеток. Их добавляли к 10 мл суспензии тест-штаммов (108 клеток/ мл) в среде MРС-5, то есть соотношение культур составляло 0,1:1,0 (табл.2).

Таблица 2 – Антагонистическая активность комбинированного препарата при совместном культивировании с тест-организмами

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Вариант | Количество жизнеспособных клеток тест-штаммов, % к контролю | | |
| *Salmonella typhimurium 50-90* | *Staphylococcus aureus S60* | *Candida albicans*  *КАА88* |
| КИКЛ | 0,8±0,01 | 0,6±0,03 | 8,3±0,2 |
| КСК | 17,5±2,1 | 16,5±1,3 | 29,6±1,6 |
| ЗРШ | 67±2,6 | 70±4,6 | 72±5,3 |
| Контроль | 100 | 100 | 100 |
| Примечание: КИКЛ - комплекс иммобилизованных клеток лактобацилл; КСК-комплекс свободных клеток; ЗРШ – зауглероженная рисовая шелуха. | | | |

Видно, что комплекс из свободных клеток лактобацилл оказывает выраженное негативное действие на все 3 тест-культуры. В то же время и сам сорбент способен связывать до 28-33% клеток этих микроорганизмов. Поэтому при использовании комплекса иммобилизованных клеток лактобацилл происходит эффективное подавление роста тест-культур. Согласно стандартным требованиям, количество живых клеток тест-штаммов бактерий по истечении 24 часового совместного культивирования с лактобактериями не должно превышать уровень 2 % по сравнению с контролем. При определении антагонистической активности КИКЛ после его совместного культивирования с микроорганизмами – мишенями эта цифра многократно превышена, то есть, иммобилизованные клетки пробиотиков в условиях *in vitro* практически полностью подавляют рост и жизнеспособность данных тест-организмов.

Таким образом, при сравнительной оценке устойчивости свободных и иммобилизованных клеток лактобацилл к желудочному соку были получены результаты, свидетельствующие о достаточно высокой устойчивости иммобилизованных бактериальных препаратов к бактерицидному действию биологических жидкостей, вероятно, это связано с протективным действием карбонизированного носителя. Кроме того, клетки, образующие микроколонии, лучше защищены от бактерицидных факторов и неблагоприятного действия окружающей среды, что может способствовать преодолению «желудочного» барьера при их пероральном введении. Иммобилизация клеток лактобацилл повышает их антагонистическую активность

Литература

1 Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В. Дисбактериоз кишечника как клинико- лабораторный синдром: современное состояние проблемы. - М., Гэотар-Медиа. - 2007. – С. 304-305.

2 Решетников В.И. Разработка лекарственных форм препаратов с иммунобиологической и сорбционной активностью //Фармация. – 2002. - №5. – С. 40-44.

3 Емуранов М.М., Шилина Ю.А., Рябикин Ю.А., Зашквара О.В., Шабанова Т.А., Бийсенбаев М.А., Мансурова Р.М., Мансуров З.А. Физико-химическое исследование углеродных материалов на основе нетрадиционного растительного сырья // Материалы 4 международного симпозиума «Физика и химия углеродных материалов. Наноинженерия». – Алматы, 2006. – С. 168-171.

4 Курдиш И.К. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми материалами и его биотехнологическое значение // Микробиологический журнал. – 1999. - Т. 61, № 1. - С. 60-73.

5 Жубанова А.А., Шигаева М.Х. Иммобилизованные клетки микроорганизмов // Биотехнология. Теория и практика. - 1997. - № 2. - С. 3-12.

6 Тихонова Л. С., Белоцерковский М. Ц. Повышение эффективности сорбции микроорганизмов на активированном угле при поляризации сорбента // Прикладная биохимия и микробиология - 1995. - Т. XXV, №2. - C. 184 - 187.

7 Дигель И.Э., Жубанова А.А. Прикрепительная иммобилизация клеток микроорганизмов // Биотехнология. Теория и практика. - 1997. - №4. - С. 3-9.

8 Волков М.Ю. Эффективные формы пробиотиков, иммобилизованных на природных адсорбентах // Пищевые ингридиенты. Сырье и добавки. – 2007. - № 1. – С.48-51.

9 Dunne W.M.Jr. Bacterial adhesion; seen any good biofilms lately? // Clin. Microbiol. Rev. -2002. – Vol. 15. – P. 155-156.

10 Bhinu V.S. Insight into biofilm-associated microbial life. – J. Mol. Microbiol. – 2005. - Vol. 3. – P. 197-214.

11 Kuchma S.L., O’Toole G.A., Surface-induced and biofilm induced changes in gene expression // Curr. Opin Biotachnol. - 2000. – Vol. 11. – P. 429-433.

Түйін

Жоғары температурада көміртектеленген күріш кебегін этанолмен өңдегенде оның сорбциялық қасиеті 8% жоғарылайды. Иммобилизенген лактобацилла клеткалары қарын және өт сөліне тұрақты антагонистік бейсенділігі жоғары.

Summary

Etanol cultivation carbonized acid sorbent on the Rice Hush base prefer the sorbtion property in attidude *Lactobacillus* cells. Cells immobilization of  *Lactobacillus* is elevate their stability to gastrict juise, and stimulate antagonistic activity*.*