

УДК 602.4

А.А. Жубанова^{1*}, З.А. Мансуров¹, И. Дигель², И.С. Савицкая¹, Н.Ш. Акимбеков¹¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан²Аахенский Университет прикладных наук, г. Юлих, Германия*e-mail: azhar_1941@mail.ru**Конструирование гетерогенных нанобиокмполитов для использования в биотехнологии**

Исследования по конструированию новых биокмполитов с направленным действием на основе функционализации карбонизированного сорбента – КРШ, созданного на основе вторичного растительного сырья – рисовой шелухи, клетками микроорганизмов, обладающих специфической метаболической активностью, растительными экстрактами с высокой противовоспалительным и бактерицидным действием, показали перспективность их использования для создания эффективных биопрепаратов для решения медицинских и экологических проблем и расширили горизонты целенаправленного применения дешевого, экологически чистого, ежегодно возобновляемого вторичного растительного сырья.

Ключевые слова: Гетерогенный биокмполит, сорбент, конструирование, пробиотики, энтеросорбция, эфферентная терапия, гнойные раны, элиминация, эндотоксин, биоремедияция.

A.A. Zhubanova, Z.A. Mansurov, I. Digel, I.S. Saviskaya, N.Sh. Akimbekov

Designing of Heterogeneous Nanobiocomposites for Biotechnology

Researches on designing of new biocomposites on the basis of a functionalization of carbonized sorbent (CRH) created from the rice husk; cells of microorganisms possessing specific metabolic activity; plant extracts with high anti-inflammatory and bactericidal activity showed prospects of their use for creation of effective biological products for the solution of medical and environmental problems and expanded the horizons of purposeful use of cheap, environmentally friendly, annually renewable secondary vegetable raw materials.

Keywords: heterogeneous biocomposite, sorbent, designing, probiotics, enterosorption, efferent therapy, purulent wounds, elimination, endotoxin, bioremediation.

А.А. Жұбанова, З.А. Мансуров, И. Дигель, И.С. Савицкая, Н.Ш. Акимбеков

Биотехнологияда қолдануға арналған гетерогенді нанобиокмполиттерді құрастыру

Күріш қауызы негізіндегі карбонизделген сорбент, ерекше метаболиттік қасиеті бар микроорганизмдер клеткалары, қабынуға қарсы және бактерицидті қасиеті бар өсімдік сығындылары негізіндегі жаңа биокмполиттерді құрастыру мақсатында жасалған жұмыстар олардың эффективті биопрепараттар құруда медицина мен экологиялық проблемаларды шешуде перспективті материалдар екендігін көрсетті.

Түйін сөздер: гетерогенді биокмполит, сорбент, құрастыру, пробиотиктер, энтеросорбция, эфференттік терапия, ірінді жара, элиминация, эндотоксин, биоремедияция.

Карбонизацию подготовленных образцов сырья (частицы размером 2-4 мм) проводили в изотермических условиях при температурах от 500 до 900°C во вращающемся реакторе, в инертной среде (аргон) в Институте проблем горения (проф. З.А.Мансуров). Установлено, что такая операция сопровождается увеличением количества пор и активных сайтов на поверхности сорбентов (рисунок 1). Как видно из рисунков, уже при температуре 500°C на поверхности сорбентов начинается образование прозрачных тонких мембранных пленок толщиной (μ) 20-40 нм. При температуре 600°C

и времени карбонизации 30 мин. эти тонкие прозрачные пленки сворачиваются в углеродные одностеночные нанотрубки с толщиной (μ) 10 нм, диаметром (d) 400-500 нм, длиной (l) 1400 нм, а при последующем увеличении температуры до 700°C и выше наблюдается образование фуллеренов - химически стабильных, замкнутых поверхностных структур, в которых атомы углерода расположены в вершинах правильных шестиугольников или пятиугольников, регулярным образом покрывающих поверхность сферы или сфероида. Благодаря наличию на поверхности макро-, мезо- и микропор, полученные таким образом материалы обладают высокой сорбционной активностью в отношении различных атомов и групп атомов, что позволяет получать на основе их функционализации получать новые гетерогенные биоконкомпозиты с заданными свойствами.

1. Разработка композиционных материалов для медицины на основе сорбента – карбонизированной рисовой шелухи (КРШ). Композиционные материалы на основе КРШ могут использоваться в медицине в различных направлениях.

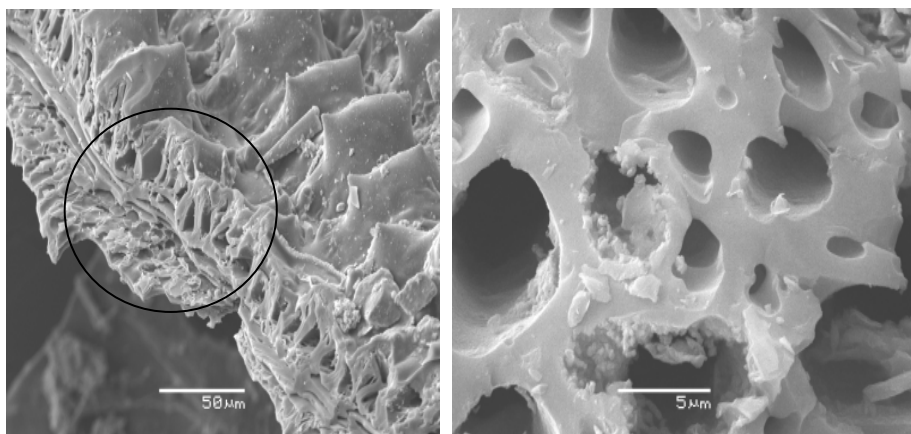


Рисунок 1 – Снимки образцов КРШ полученных методом СЭМ

а) Теоретические предпосылки и практические аспекты использования сорбированных пробиотиков. Интенсивно развивающаяся биотехнология пробиотиков требует создания лекарственных форм, обеспечивающих успешную доставку экзогенных бактерий в целевой орган – толстый кишечник.

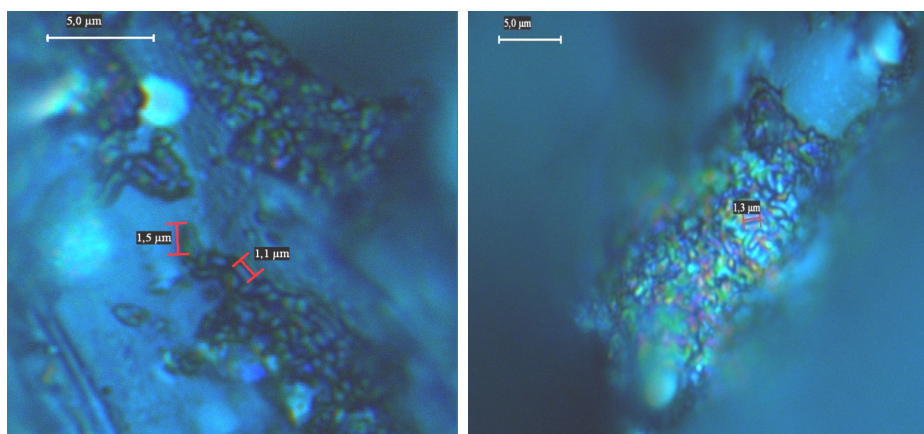


Рисунок 2 – Микроколонии лактобацилл на поверхности КРШ

Как известно, для сохранения жизнеспособности клеток бактерий-пробиотиков их либо заключают внутрь макро- или микрокапсул, либо закрепляют на поверхности сорбента. Первым из сорбированных пробиотиков был препарат «Бифидумбактерин форте» на основе активированного

угля типа «Карболонг», производимого ЗАО «Партнер» из косточек персиков и разрешенного для медицинского применения.

Нами при разработке сорбированного на КРШ пробиотика в качестве биологического компонента использованы штаммы бактерий рода *Lactobacillus*, принадлежащие к трем наиболее типичным видам интестинальной лактофлоры: *L.fermentum* АК-2R, *L.acidophilus* АА-1 и *L.plantarum* АР-1 и обладающие выраженными пробиотическими свойствами.

Установлено, что иммобилизованные клетки лактобацилл находятся на поверхности сорбента в виде микроколоний, в которых они хорошо защищены от неблагоприятных воздействий внешней среды (рисунок 2).

Для изучения судьбы вводимых перорально лактобацилл при прохождении их через верхние отделы желудочно - кишечного тракта использовался специально селекционированный нами штамм *Lactobacillus fermentum* АК-2R, который обладал высоким уровнем резистентности к антибиотику ципрофлоксацину, причем, установлено, что этот показатель контролируется хромосомными генами. Согласно полученным результатам, во-первых, эффективность заселения слизистой кишечника экзогенными лактобактериями значительно выше и сохраняется дольше при введении их в организм хозяина в виде микроколоний, т.е. в иммобилизованном состоянии, а, во-вторых, сорбент КРШ обеспечивает не только доставку микроколоний пробиотиков в целевой орган, но и связывает клетки микроорганизмов и их токсины, находящиеся в просвете кишечника.

Подтверждение этих результатов было получено в экспериментах *in vitro*, проведенных в лаборатории клеточной биологии и микробиологии Аахенского университета прикладных наук (Германия), в которых изучалось влияние КРШ на адгезию клеток лактобактерий *Lactobacillus fermentum* АК-2R к эпителиальным клеткам кишечника крыс, Установлена положительная корреляция между концентрацией биосорбента и количеством прикрепленных клеток лактобацилл.

2. Использование КРШ в эфферентной терапии гнойных ран. В последние десятилетия наблюдается рост частоты и тяжести гнойных инфекций, вследствие чего, пациенты с гнойно-воспалительными заболеваниями стали составлять треть хирургических больных. Для успешного лечения гнойных ран целесообразна процедура вальверносорбции, т.е. выведения токсичных компонентов через раневую поверхность или очаг воспаления и ускорения транспорта токсичных веществ из крови путем их связывания сорбентом. Благодаря развитию такого подхода, в медицине сформировалось новое направление – эфферентная терапия, основным способом лечения при которой, является – сорбционно-аппликационный.

Как показала медицинская практика, почти все углеродные материалы медицинского назначения обладают выраженными адсорбционными свойствами по отношению к раневому экссудату.

Нами в экспериментах *in vivo* на 15 беспородных белых крысах-самцах (вес 200-230 г) изучалось влияние КРШ на заживление гнойных ран.

Установлено, что использование сорбционно-аппликационного метода на основе карбонизованных сорбентов заметно тормозит развитие гнойной инфекции на коже, снижая тем самым риск распространения гнойного процесса. Высокий лечебный эффект КРШ в отношении заживления гнойных ран можно объяснить наличием на ее поверхности большого количества макро, мезо- и микропор, которые участвуют в процессах сорбции с раневой поверхности токсикантов различной природы (микроорганизмы и компоненты гнойного экссудата).

3. Использование КРШ для элиминации бактериального эндотоксина – ЛПС из биологических жидкостей. В последние годы отмечается увеличение количества больных с тяжелыми заболеваниями, вызванными эндотоксинами грамотрицательных бактерий, которые представляют собой несекретируемые термостабильные липополисахариды (ЛПС), являющиеся основным компонентом внешней мембраны клеточной стенки этих бактерий. Освобождение эндотоксина, наблюдающееся при гибели патогенных микроорганизмов, вызывает развитие генерализованных инфекций, высшим проявлением которых является эндотоксический шок.

Химически ЛПС представляет собой 3 ковалентно-связанных компонента: липид А, центральный олигосахарид и О-антиген.

Несмотря на достигнутый в последние годы прогресс в понимании патофизиологических механизмов сепсиса, уровень смертности, связанной с септическим шоком, остается удручающе высоким во всем мире.

Нами в лаборатории клеточной биологии и микробиологии Аахенского университета прикладных наук (Германия) проводились исследования по разработке способов элиминации эндотоксина из биологических жидкостей с помощью КРШ. Концентрацию липополисахарида в среде определяли фотометрически при помощи детекционного набора Швейцария) и фотометрического сканера (Bio-Rad Co., США).

Результаты определения сорбционной активности КРШ в отношении ЛПС показали, что уже в течение первых 10 минут процесс связывания ЛПС протекает активно и концентрация ЛПС в растворе уменьшается на 90%. Через 40 минут этот препарат в растворе вообще не обнаруживается. В последующих экспериментах, изучались процессы сорбции ЛПС на КРШ из растворов, имитирующих кровь, например, в присутствии сывороточного белка – альбумина.

Установлено, что присутствие белков не препятствует элиминации ЛПС. Это означает, что карбонизованная рисовая шелуха с наноструктурированной поверхностью является перспективным сорбентом для селективной сорбции ЛПС из биосуспензий и может служить основой для создания методов элиминации эндотоксина ЛПС из биологических жидкостей.

Изучение кинетических параметров связывания ЛПС в условиях проточной колонки (рисунок 3) показало, что эффективность извлечения ЛПС из растворов колоночным методом значительно выше, чем при использовании стационарных условий. Такие результаты открывают хорошие перспективы для развития методов эфферентной терапии вообще.



Рисунок 3 – Экспериментальная установка для изучения процесса связывания ЛПС с КРШ в непрерывном режиме (в колонке)

4. Конструирование и использование новых биоконкомпозитов для решения экологических проблем. Как известно, микроорганизмы обладают, с одной стороны, высокой прикрепительной способностью, а, с другой, - разнообразием метаболических возможностей. Вследствие этого, микробные клетки могут быть использованы для целевой функционализации сорбентов с целью получения новых биоконкомпозитов специального назначения.

Как известно, добыча нефти, ее транспортировка по железнодорожным и водным путям и последующая переработка сопровождаются значительными выбросами в окружающую среду высокотоксичных веществ.

Существующие физико-химические методы очистки почв и водоемов от нефти и нефтепродуктов, характеризуются высокой стоимостью, сложностью исполнения, вторичным загрязнением токсичными продуктами и твердыми остатками.

Наиболее перспективными на сегодняшний день представляются методы биоремедиации

(восстановления) загрязненных объектов внешней среды при помощи биопрепаратов на основе штаммов микроорганизмов, способных использовать органические загрязнители в качестве источника углерода и сорбировать тяжелые металлы из различных сред.

Многокомпонентность и разнородность составляющих нефть веществ, диктует необходимость создания биопрепаратов на основе консорциума микроорганизмов, способных окислять различные классы углеводородов.

Нами для создания биоконкомпозита-нефтедеструктора использовались 7 новых штаммов бактерий *Pseudomonas mendocina* H3, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* H7, *Pseudomonas stutzeri* H10, *Pseudomonas alcaligenes* H15, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* H16, *Pseudomonas mallei* 36K и

Micrococcus luteus 37K из коллекции кафедры, которые были выделены из нефтезагрязненных почв Кумкольского месторождения нефти.

Для конструирования биокомпозита–нефтедеструктора клетки микроорганизмов иммобилизовали на поверхность КРШ. Установлено, что использование полученного таким образом биопрепарата, обеспечивает высокую концентрацию микробных клеток в зоне загрязнения, защиту их от действия высоких концентраций нефти и поскольку нефть сорбируется и носителем, заметно увеличивается ее доступность для клеток микроорганизмов. Кроме того, сорбент сам по себе, как минеральное вещество, может использоваться микроорганизмами в качестве источника минерального питания. Вследствие суммарного действия всех этих факторов, увеличивается скорость и эффективность ремедиационных процессов.

Анализ ИК-спектрограмм культуральной среды, содержащей нефть, до и после роста на ней свободных и иммобилизованных клеток углеводородокисляющих микроорганизмов свидетельствует о заметной деструктивной активности свободных и иммобилизованных клеток, причем, клетки, иммобилизованные на КРШ, утилизировали нефть более интенсивно.

Результаты этих экспериментов легли в основу создания препаратов - биосорбентов для очистки почв (Жанажол), балластного слоя железнодорожных путей, водных акваторий (Актау), водоемов очистных сооружений, загрязненных различными токсикантами.

Следует сказать, что для очистки водных акваторий необходимо учитывать локализацию токсикантов в толще воды, вследствие чего, в этом случае, в качестве носителей используют материалы с различной погружающей способностью. К примеру, нами для очистки поверхностного нефтяного пятна, клетки нефтеокисляющих микроорганизмов были иммобилизованы на полиуретановую губку, в толще воды – на различные синтетические волокна, в нижних слоях – на цеолит и керамзит. Именно в таких условиях будет наблюдаться активная сорбция нефтяных углеводородов по всей толще загрязненной воды.

б) Конструирование биокомпозитов для биоремедиации почв и водоемов, загрязненных тяжелыми металлами.

В предыдущих работах показано, что карбонизованные сорбенты, имеющие на поверхности карбоксильные, карбонильные, фенольные, аминные и другие группы, способны сорбировать ионы свинца, кобальта, никеля, кадмия, меди и даже золота. Как известно, среди микроорганизмов также встречаются штаммы, отличающиеся повышенной сорбцией ионов различных металлов.

В коллекции нашей кафедры имеются штаммы, обладающие высокой металлсорбирующей активностью - *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Pseudomonas mendocina*, которые были выделены из сточных вод металлургического предприятия. Функционализацией карбонизованных сорбентов клетками этих микроорганизмов нами были сконструированы биокомпозиты, специфическая активность которых изучалась на лабораторной установке.

Согласно полученным результатам, в этих условиях из растворов свободными клетками металлсорбирующих микроорганизмов извлекаются более 70% ионов меди, кадмия и свинца. При использовании иммобилизованных на КРШ микробных клеток этот показатель превышает - 90%, причем, интенсивность этого процесса константна.