

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАКТА ХЛОРОФИТУМА ХОХЛАТОГО (*CHLOROPHYTUM COMOSUM*) НА РОСТ МИКРООРГАНИЗМОВ-ПРОБИОНТОВ

Бондарева Н.И., Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Лыхварь А.В.

ФГАОУ ВПО «Северо-Кавказский федеральный университет», Ставрополь, Россия (355009, г. Ставрополь, ул. Пушкина, 1), e-mail: nadusha.bondareva@gmail.com

В настоящее время в биотехнологии расширяется тенденция к использованию ростостимуляторов микроорганизмов. Получен экстракт из тканей *Chlorophytum comosum* и изучено его влияние на рост штаммов микроорганизмов-пробионтов *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*. Подтвержден ростостимулирующий эффект по отношению к обоим микроорганизмам. При культивировании штаммов *E. coli* на среде с добавлением экстракта во всех исследуемых концентрациях достоверно увеличивается количество колоний по сравнению с контролем, наибольший ростостимулирующий эффект установлен при добавлении 1 % экстракта хлорофитума. Присутствие стимулирующего эффекта на *B. subtilis* установлено уже при малых концентрациях экстракта хлорофитума в среде. Однако наиболее интенсивный рост этого микроорганизма был отмечен на среде с добавлением экстракта в концентрации 10 %. Вышеуказанное позволяет рассматривать хлорофитум хохлатый не только как компонент новых питательных сред для наращивания бактериальной массы данных микроорганизмов и эффективный стимулятор роста при использовании *in vivo*, но и как перспективный сырьевой объект для пребиотиков.

Ключевые слова: растительный экстракт, *Chlorophytum comosum*, микроорганизмы-пробионты, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, стимулятор роста микроорганизмов, колониеобразующая единица (КОЕ).

RESEARCH OF CHLOROPHYTUM COMOSUM EXTRACT INFLUENCE ON GROWTH OF PROBIONT MICROORGANISMS

Bondareva N.I., Timchenko L.D., Rzhepakovskiy I.V., Likhvar A.V.

North-Caucasian Federal University, Stavropol, Russia (355009, Stavropol, street Pushkin, 1), e-mail: nadusha.bondareva@gmail.com

At present in biotechnology the tendency to use a microbial growth stimulants extends. *Chlorophytum comosum* tissue extract is received and its influence on growth of strains of microorganisms – probionts, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, is studied. The stimulating effect on both microorganisms is confirmed. During cultivation of *Escherichia coli* strains on a medium containing the *Chlorophytum comosum* extract in all tested concentrations the number of colonies increases compared to the control, the greatest growth stimulating effect is set by adding 1 % of *Chlorophytum comosum* extract. Stimulating effect on the *Bacillus subtilis* established already at low concentrations of *Chlorophytum comosum* extract in the medium. However, the most rapid growth of the microorganism was noted on medium supplemented with the extract at a concentration of 10 %. The result allows us to consider *Chlorophytum comosum* as a component of the new culture media for bacterial mass increasing and effective growth stimulator used for *in vivo*, but also as a promising object for prebiotics.

Keywords: plant extract, *Chlorophytum comosum*, probiont microorganisms, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, microorganisms growth stimulator, colony-forming unit (CFU).

В последние годы в связи с возрастанием значимости вопроса поддержания баланса кишечной микрофлоры на оптимальном уровне и активным поиском путей различной направленности решения данной проблемы, значительно вырос интерес исследователей к стимуляторам роста микроорганизмов-пробионтов.

Различные формы препаратов для поддержания микробной экологии организма зависят от природы составляющих их компонентов в сочетаниях или по отдельности и могут быть представлены живыми микроорганизмами, их структурными компонентами,

метаболитами этих микроорганизмов, а также другими соединениями, стимулирующими рост представителей нормальной микрофлоры.

Микроорганизмы–пробионты, используемые при производстве препаратов, представлены штаммами либо эндогенной микрофлоры (бифидо-, лактобактерии, кишечная палочка, др.), восполняющими нормофлору в макроорганизме, либо штаммами транзиторных микроорганизмов (например, апатогенных представителей рода *Bacillus*), подавляющих патогенные и условно-патогенные микробы (УПМ) [3].

Первыми препаратами, введёнными в клиническую практику для коррекции дисбиозов, были пробиотики на основе кишечной палочки. *Escherichia coli* (кишечная палочка) – вид грамотрицательных неспорообразующих палочковидных факультативных анаэробов, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*. Безвредные штаммы являются частью нормальной микрофлоры кишечника человека и животных [5]. Штамм *E. coli* М 17 – основной компонент для пробиотических препаратов Колибактерина, Бификола и др., а штамм *E. coli* DSM 4087 – продуцент важных составляющих компонентов пребиотического препарата Хилак форте. С помощью этих штаммов создают препараты с повышенной антагонистической активностью и резидентные на фоне антибиотикотерапии.

Несмотря на высокий лечебный эффект пробиотических препаратов, созданных на основе штаммов эндогенной микрофлоры, в случаях, сопровождающихся персистенцией патогенных и условно-патогенных бактерий и грибов, они оказываются неэффективными. При таких ситуациях показано применение пробиотиков на основе живых апатогенных спорообразующих бактерий, поскольку они обладают более широким спектром антагонистической активности. Выраженный антагонизм данные препараты проявляют в отношении *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans*, которые в настоящее время являются этиологически значимыми в развитии микрoэкологических нарушений, сопряженных с различными патологиями [4].

Анализ результатов научных исследований, проводимых у нас в стране и за рубежом, свидетельствует о масштабах использования бактерий рода *Bacillus* для получения продуктов из биомассы бактерий или их метаболитов. *Bacillus subtilis* (сенная палочка) – вид грамположительных спорообразующих палочковидных аэробных бактерий. Является продуцентом некоторых полипептидных антибиотиков, аминокислот, а также ферментов (амилазы, протеазы). Штаммы *B. subtilis* 26-Д и *B. subtilis* 1719 обладают пробиотическими свойствами, являются продуцентами антагонистически активной биомассы в отношении болезнетворных микроорганизмов, а также протеолитических, амилитических и липолитических ферментов [2, 8].

Основным условием производства препаратов на основе микроорганизмов-пробионтов является успешное наращивание их биомассы и поддержание активности штаммов. *In vitro* – главным является культивирование, в процессе которого происходит подбор питательных сред в соответствии с питательными и другими физиологическими потребностями микроорганизмов, а также использование питательных смесей, включающих различные ростостимулирующие компоненты. *In vivo* это обеспечивается использованием стимуляторов, применяемых в виде препаративных форм.

Значительным числом специалистов для большинства микроорганизмов лучшими признаны питательные компоненты из сырья животного происхождения: препараты крови, казеин, мясные гидролизаты и т.п. [10]. Однако имеющиеся проблемы, наблюдаемые при использовании данного сырья, с каждым годом только возрастают, например, наличие антибиотиков и токсических продуктов, трудности стандартизации и др.

Поскольку высшие растения доступны в качестве сырьевых источников и их специфическая особенность состоит в том, что они способны синтезировать и накапливать огромное количество биологически активных веществ (БАВ), являющихся известными природными стимуляторами роста, представляется перспективным продолжить поиск стимуляторов роста растительного происхождения [1]. Уже сегодня известны биопрепараты, содержащие экстракты из овощей, зелени, которые, благодаря применению оригинальных приемов переработки, становятся стимуляторами роста полезной для человека микрофлоры.

Перечень растительного сырья велик, однако потенциальный ресурс его не исчерпан. Так, в этом смысле представляет интерес малоизученное растение – хлорофитум хохлатый (*Chlorophytum comosum*). Хлорофитум хохлатый – многолетнее травянистое растение с клубневидно-утолщенными корнями, происходящее из Южной Африки и впервые описан в 1794 году учеником Карла Линнея, шведским ученым-натуралистом Карлом Питером Тунбергом. Этот вид является популярным комнатным растением, так как не требует тщательного ухода и легко адаптируется к различным условиям освещения, температуры и увлажненности. По некоторым данным он обладает свойствами биофильтра.

Хлорофитум содержит широкий перечень микроэлементов, таких как: железо, цинк, марганец, медь, бор, молибден, кобальт и др. Кроме того, ткани этого растения богаты аминокислотами. Особенно в высоких концентрациях в нем присутствуют: цистин, лейцин, валин, фенилаланин и гистидин. Кроме того, известно стимулирующее влияние хлорофитума хохлатого на эукариотические клетки, что показано в процессе репаративной регенерации гепатоцитов и клеток почек [9]. Такой биологический эффект дал предпосылки для изучения его влияния на прокариотические клетки, в частности на микроорганизмы-пробионты.

Вышеизложенные факты позволяют рассматривать данное растение как потенциальный сырьевой объект для получения субстанций, обладающих ростостимулирующими свойствами по отношению к микроорганизмам-пробионтам.

Цель исследования: изучение влияния экстракта из хлорофитума хохлатого на рост микроорганизмов-пробионтов.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на базе ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» центра коллективного пользования научным оборудованием СКФУ.

Приготовление экстракта хлорофитума хохлатого происходило в несколько этапов по модифицированной нами технологии [7].

Исследование влияния экстракта на рост микроорганизмов производили, применяя чашечный метод Коха [6]. В качестве исследуемых культур использовали тест-штаммы микроорганизмов: *Escherichia coli* М-17, *Escherichia coli* DSM 4087, *Bacillus subtilis* 26-Д, *Bacillus subtilis* 1719.

Полученный экстракт хлорофитума хохлатого добавляли в питательные среды – агар Эндо и агар Хоттингера в количестве 0,1 %, 1 % и 10 % от объема питательной среды. Контрольными служили те же среды, но без добавления данного экстракта.

Для посева на питательные среды в чашках Петри использовали бактериальные взвеси в концентрациях 1×10^3 м.к./мл – 1×10^4 м.к./мл, полученных в результате десятикратных разведений из взвесей с концентрацией 1×10^9 м.к./мл, приготовленных по отраслевому стандарту мутности ОСО 42-28-85-2015. Проведение исследования осуществляли в трехкратных повторах. Посевы культивировали в термостате при температуре 37 °С в течение 20–24 часов.

Количественный учет колоний микроорганизмов на питательных средах производили с помощью полуавтоматического счетчика колоний Scan 100 Interscience и сетки Вольфхюгеля. Подсчитывали количество колоний в квадратах по диагонали, после рассчитывали среднее арифметическое на один квадрат и пересчитывали на площадь всей чашки Петри, используя формулу $S = \pi r^2$.

Результаты исследований

Установлено, что при культивировании обоих штаммов *E. coli* на среде с добавлением экстракта хлорофитума во всех указанных концентрациях достоверно увеличивается количество колоний по сравнению с контролем (табл. 1).

Таблица 1

Количество колоний исследуемых штаммов *E. coli* под влиянием экстракта хлорофитума хохлатого, ($M \pm m$)

Степень разведения	Штамм <i>E. coli</i>	Контроль, КОЕ	С добавлением 0,1% экстракта, КОЕ	С добавлением 1% экстракта, КОЕ	С добавлением 10% экстракта, КОЕ
10 ³	М-17	31,0±1,4	40,7±2,2*	44,0±2,8*	39,1±2,1*
	DSM 4087	32,3±1,7	42,1±2,4*	45,5±3,0*	40,4±2,2*
10 ⁴	М-17	284,0±10,5	343,4±13,8*	358,2±18,4*	325,4±11,2*
	DSM 4087	290,4±11,8	349,1±14,4*	370,6±17,1*	338,4±12,5*

*P≤0,05 (по отношению к контролю).

При посеве микроорганизмов в концентрации 1×10^3 м.к./мл на среду с добавлением 0,1 % экстракта растения количество колоний *E. coli* М-17 и *E. coli* DSM 4087 увеличилось на 31 % и 30 % соответственно. При добавлении в питательную среду 1 % растительного экстракта установлено увеличение количества колоний *E. coli* М-17 на 42%, а *E. coli* DSM 4087 – на 41 %. При использовании экстракта хлорофитума в количестве 10 % к объему среды, количество колоний *E. coli*. М-17 увеличилось на 26 %, а *E. coli* DSM 4087 – на 25 %.

При посеве микроорганизмов в концентрации 1×10^4 м.к./мл на среде Эндо с добавлением 0,1 % растительного экстракта среднее количество *E. coli* шт. М-17 увеличилось на 21 %, в то время как количество колоний *E. coli* DSM 4087 увеличилось на 20 %. На питательной среде с добавлением 1 % экстракта хлорофитума установлено увеличение количества колоний *E. coli* М-17 на 26 %, и *E. coli* DSM 4087 – на 28 %. Среднее количество *E. coli* М-17 и *E. coli* DSM 4087 на среде с добавлением 10 % растительного экстракта увеличилось на 15 % и 17 % соответственно.

Таким образом, наибольший ростостимулирующий эффект на исследуемые штаммы установлен на питательной среде Эндо с добавлением 1 % экстракта хлорофитума, что позволяет его рассматривать как перспективный стимулятор роста пробионта *E. coli*.

На питательном агаре Хоттингера при добавлении экстракта хлорофитума во всех концентрациях количество колоний штаммов *B. subtilis* достоверно увеличивается по сравнению с контролем (табл. 2).

Таблица 2

Количество колоний исследуемых штаммов *B. subtilis* под влиянием экстракта хлорофитума хохлатого, (M±m)

Степень разведения	Штамм <i>B. subtilis</i>	Контроль, КОЕ	С добавлением 0,1 % экстракта, КОЕ	С добавлением 1 % экстракта, КОЕ	С добавлением 10 % экстракта, КОЕ
10 ³	26-Д	1,9±0,1	2,4±0,15*	2,8±0,31*	3,3±0,48*
	1719	1,8±0,1	2,3±0,14*	2,8±0,35*	3,0±0,42*
10 ⁴	26-Д	3,7±0,14	4,3±0,16*	4,9±0,4*	5,9±0,62*
	1719	3,8±0,15	4,4±0,15*	4,8±0,33*	5,7±0,56*

* $P \leq 0,05$ (по отношению к контролю).

При посеве микроорганизмов в концентрации 1×10^3 м.к./мл на среду с добавлением 0,1 % экстракта количество колоний *B. subtilis* 26-Д возросло на 26 % и *B. subtilis* 1719 – на 28 %. На среде с добавлением 1 % экстракта хлорофитума количество колоний *B. subtilis* 26-Д увеличилось на 47 %, в то время как количество колоний *B. subtilis* 1719 увеличилось на 55 %. При добавлении 10 % экстракта к среде количество колоний *B. subtilis* 26-Д возросло на 73 % и *B. subtilis* 1719 – на 67 %.

При посеве *B. subtilis* 26-Д и *B. subtilis* 1719 микроорганизмов в концентрации 1×10^4 м.к./мл на среду с добавлением 0,1 % экстракта хлорофитума констатирован равнозначный для обоих штаммов прирост числа колоний на 16 %. При добавлении в среду 1 % растительного экстракта количество колоний *B. subtilis* шт. 26-Д увеличилось на 32 %, а количество колоний *B. subtilis* 1719 увеличилось на 26 %. Количество колоний *B. subtilis* 26-Д при добавлении в среду 10 % экстракта хлорофитума увеличилось на 60 %, а *B. subtilis* 1719 – на 50 %.

В целом, результаты исследования свидетельствуют, что присутствие стимулирующего эффекта на *B. subtilis* при культивировании на среде Хоттингера с добавлением экстракта хлорофитума установлено уже при его малых концентрациях. Однако наиболее интенсивный рост этого микроорганизма был отмечен на среде с добавлением экстракта хлорофитума в концентрации 10 %.

Заключение

Таким образом, подтверждено выраженное ростостимулирующее влияние экстракта хлорофитума хохлатого на исследуемые штаммы *E. coli* и *B. subtilis*. С учетом дозозависимой от концентрации экстракта интенсивности прироста числа колоний, испытуемый субстрат можно рассматривать в качестве перспективного стимулятора роста *E. coli*. При культивировании *B. subtilis* проявление максимального стимулирующего эффекта в наиболее высоких концентрациях экстракта хлорофитума хохлатого позволяет рассматривать его как компонент новых питательных сред для наращивания бактериальной массы данного микроорганизма.

Полученные результаты свидетельствуют о значительных перспективах использования хлорофитума хохлатого в качестве сырьевого объекта для разработки пребиотических субстанций.

Исследование проведено при финансовой поддержке Минобрнауки России, в рамках выполнения базовой части государственного задания (2014/216).

Список литературы

1. Баронец Н.Г. Получение стимуляторов роста микроорганизмов из лекарственных растений: дис. ... канд. биол. наук. – М., 2004. – С. 132.
2. Гатауллин А.Г. Биологические свойства штаммов *Bacillus subtilis*, перспективных для создания новых пробиотиков: дис. ... канд. биол. наук. – М., 2005. – С. 131.
3. Гайдеров А.А. Изучение свойств штаммов *Escherichia coli* М-17 и *Bacillus subtilis* 1719 на модели экспериментального дисбиоза: дис. ... канд. биол. наук. – М., 2007. – С. 91.
4. Осипова И.Г. Экспериментально-клиническое изучение споровых пробиотиков: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2006. – 48 с.
5. Подопрigора Г.И. Иммуные и неспецифические механизмы колонизационной резистентности // Антибиотики и колонизационная резистентность // Труды ВНИИ антибиотиков. – М., 1990. – Вып. XIX. – С. 1525.
6. Сакович Г.С. Физиология и количественный учет микроорганизмов / Г.С. Сакович, М.А. Безматерных // ГОУ ВПО УГТУ - УПИ. – Екатеринбург, 2005. – С. 30.
7. Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Вакулин В.Н. и др. Способ получения биологически активного препарата для животных на основе каллизии душистой // Патент России № 2285434, 2006, Бюл. № 29.
8. Albot G. Nouveau traitement des diarrhes par les emulsiions de *Bacillus subtilis* / G. Albot, N. Bernard-Bruker // Extrait. de la Semaine des Hop. – de Paris, 1950. – N 5. – P. 613-623.
9. Areshidze D.A. Morphofunctional condition of hepatorenal system of rats at correction of the experimental ccl4-induced hepatorenal syndrome using an enzymatic hydrolyzate of chlorophytum comosum / D.A. Areshidze, L.D. Timchenko, I.V. Rzhepakovsky, M.A. Kozlova, I.A. Semin, S.I. Piskov // Bothalia. 2015. T. 45. № 4. С. 70-79.
10. Faine S. Guidelines for the control of Leptospirosis / S. Faine // W.H.O. – Geneva, 1982. – P. 170.

Рецензенты:

Тюменцева И.С., д.м.н., профессор, заведующая научно-производственной лабораторией препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь;

Жарникова И.В., д.б.н., старший научный сотрудник, ведущий научный сотрудник научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других

инфекций Федерального казенного учреждения здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ставрополь.