

ВЛИЯНИЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТОБАКТЕРИЙ

Столбова М.Г.¹, Несчисляев В.А.¹, Мокин П.А.¹, Орлова Е.В.¹, Маслов Ю.Н.²

¹Филиал АО «НПО «Микроген»» в г. Пермь, «Пермское НПО «Биомед»», Пермь, e-mail: maryscu@mail.ru;

²ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера, Пермь, e-mail: maslov_1@mail.ru

Цель данной работы – исследование влияния иммобилизации на устойчивость к действию модельных сред, имитирующих условия пищеварения в желудке и кишечнике человека, и на антагонистические свойства лактобактерий. В работе использовали штамм *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и сорбенты на основе гомогената бурых водорослей, альгината натрия, отрубей пшеничных ферментированных, лигнина гидролизного, микрокристаллической целлюлозы и каолина. В качестве модельных сред использовали кислый раствор пепсина, щелочной раствор панкреатина и желчь медицинскую консервированную. Определение антагонистической активности проводили с помощью теста отсроченного антагонизма и теста подавления биолюминесценции индикаторного штамма *Escherichia coli lum*⁺. Установлено, что иммобилизация клеток позволяет повысить резистентность лактобактерий к действию модельных сред, имитирующих секреты желудочно-кишечного тракта человека. Выраженными протективными свойствами обладают сорбенты на основе бурых водорослей (ламинарии и фукуса). Данные, полученные при использовании двух методических подходов, свидетельствуют о наличии выраженных антагонистических свойств у всех изученных образцов лактобактерий, а процесс иммобилизации клеток не оказывает негативного влияния на их биологическую активность.

Ключевые слова: лактобактерии, иммобилизация, антагонистическая активность.

EFFECT OF IMMOBILIZATION ON THE BIOLOGICAL PROPERTIES OF LACTOBACTERIA

Stolbova M.G.¹, Neschislyayev V.A.¹, Mokin P.A.¹, Orlova E.V.¹, Maslov Yu.N.²

¹Perm Branch «Biomed» of «Microgen» Company, Perm, e-mail: maryscu@mail.ru;

²Academician Ye.A. Vagner Perm State Medical University, Perm, e-mail: maslov_1@mail.ru

The purpose of this research was to determine the effect of immobilization on the survival lactobacteria under the conditions in vitro, simulating digestion in human stomach and intestine and on the antagonistic properties of lactobacteria. The strain of probiotic microorganism was *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. Samples of lyophilized biomass of lactobacteria immobilized on various sorbents (brown algae homogenate, sodium alginate, wheat fermented bran, lignin, microcrystalline cellulose, kaolin) and lactobacterin preparation were used in the study. The study of survival of lactobacteria was carried out under the in vitro conditions in the acid solution of pepsin, alkaline solution of pancreatin and bile. The antagonist properties were assayed by the deferred antagonism method and by the bioluminescence inhibition test. The work revealed high protective properties of the sorbent on the basis of brown algae (laminaria and fucus). High sensitivity of the test-strains *E. coli* 157 and *E. coli lum*⁺ to samples of immobilized lactobacteria was revealed. The research demonstrates that the immobilization of lactobacteria does not have a negative effect on their biological activity.

Keywords: lactobacteria, immobilization, antagonistic activity.

Кишечная микрофлора является важнейшим составным компонентом сложной экологической системы организма человека. В настоящее время отмечается пристальное внимание к проблеме дисбиотических нарушений желудочно-кишечного тракта человека и способам их коррекции. Современные принципы восстановления нормального микробиоценоза включают широкий арсенал мероприятий, среди которых важная роль отводится применению биологических препаратов – пробиотиков [1, 2].

Лекарственные средства на основе лактобактерий находят широкое применение в составе комплексной терапии различных заболеваний и обеспечивают нормализацию

микробиоты кишечника. Устойчивость лактобактерий к действию ингибирующих факторов желудочно-кишечного тракта человека и антагонизм в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, связанные с выработкой молочной кислоты, перекиси водорода, лизоцима и продуктов с высокой антибиотической активностью, определяют клиническую эффективность пробиотических препаратов на их основе [3].

Цель исследования

Оценка влияния иммобилизации на устойчивость к действию модельных сред, имитирующих условия пищеварения в желудке и кишечнике человека, и на антагонистические свойства лактобактерий.

Материал и методы исследования

В работе использовали производственный штамм лактобактерий *Lactobacillus plantarum* 8P-A3. В качестве сорбентов применяли гомогенат бурых водорослей, альгинат натрия, отруби пшеничные ферментированные, лигнин гидролизный, микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) и каолин. Для сравнения использовали препарат лактобактерин с иммобилизованными клетками (АО НПО «Микроген», Россия).

Для проведения процесса иммобилизации раствор сорбента добавляли к нативной взвеси лактобактерий и перемешивали в течение 30 мин. После этого культуру иммобилизованных клеток выдерживали в течение 5 суток при температуре (5 ± 3) °С и визуально оценивали полноту иммобилизации по характеру расслоения исследуемой взвеси с последующим определением количества живых бактерий в надосадочной жидкости. Расслоение взвеси на плотный осадок и прозрачную надосадочную жидкость свидетельствует о том, что большая часть лактобактерий находится в связанном состоянии.

Для получения сухой биомассы бактериальную суспензию разливали в металлические кассеты с толщиной слоя до 15 мм и подвергали лиофильному высушиванию в сублимационной установке ТГ-50 (Германия) в течение не менее 44 ч с предварительным замораживанием при температуре $-(50\pm 10)$ °С. В качестве ксеропротектора использовали сахарозо-желатино-молочную среду. Лиофилизированную биомассу извлекали из кассет, протирали через сито с ячейками на 0,25 мм и хранили в герметично закрытых контейнерах при температуре (5 ± 3) °С.

При моделировании условий пищеварения использовали кислый раствор пепсина (3 г пепсина, 6 мл концентрированной соляной кислоты, до 1 л воды очищенной, pH $1,8\pm 0,2$), щелочной раствор панкреатина (3 г панкреатина, 15 г натрия гидрокарбоната, до 1 л воды очищенной, pH $8,2\pm 0,2$) и желчь медицинскую консервированную (ООО «САМСОН-МЕД», pH 7,2). Образцы сухой биомассы регидратировали в растворе натрия хлорида 0,9%-ном и инкубировали при (37 ± 1) °С в кислом растворе пепсина в течение 30 мин, в щелочном

растворе панкреатина и желчи – в течение 2 ч, контрольные образцы – в растворе натрия хлорида 0,9%-ном. Для определения показателя КОЕ до и после окончания инкубации в модельных средах использовали стандартную методику посева последовательных десятикратных разведений на плотную питательную среду МРС-4.

Определение антагонистических свойств образцов проводили с использованием методики отсроченного антагонизма [4] и теста подавления биолюминесценции индикаторного штамма *Escherichia coli lum+* [5].

Экспериментальные образцы лактобактерий регидратировали раствором натрия хлорида 0,9%-ного и высевали по периметру чашки Петри бактериологической петлей на плотную среду МРС-5. Посевы инкубировали в аэробных условиях в течение 2 суток при температуре (37 ± 1) °С. Индикаторную культуру штамма *E. coli* 157 выращивали на мясо-пептонном агаре в течение 1 суток в аэробных условиях, затем смывали раствором натрия хлорида 0,9%-ного, доводили оптическую плотность до 5 единиц по СО 42-28-86-86 и подсеивали в виде «перпендикулярных штрихов» к выросшей культуре лактобактерий. Результаты учитывали через 1 сутки инкубации при температуре (37 ± 1) °С по размеру зон подавления роста тест-штамма.

Для исследования антагонистической активности в экспресс-тесте угнетения биолюминесценции экспериментальные образцы и индикаторный штамм *E. coli lum+* регидратировали раствором натрия хлорида 0,9%-ным. Регидратированную тест-культуру выдерживали не менее 30 мин при температуре (5 ± 3) °С и доводили ее объем до 50 мл. При подготовке опытной пробы 0,5 мл исследуемого образца лактобактерий, разведенного раствором натрия хлорида 0,9%-ного в 10 раз, смешивали с 0,5 мл штамма-индикатора. При подготовке контрольной пробы к 0,5 мл индикаторной культуры добавляли 0,5 мл раствора натрия хлорида 0,9%-ного. Через определенные промежутки времени (10 мин, 1, 2, 4, 6 и 24 ч) проводили регистрацию уровня свечения тест-штамма с помощью люминометра «Биотокс-10М» (ООО «НЕРА-С», Россия), который автоматически вычислял индекс антагонистической активности (ИАА). ИАА представляет собой безразмерную величину, численно равную проценту подавления свечения индикаторного штамма по сравнению с исходным уровнем.

Обработку полученных данных проводили в программе MS Excel. Результаты представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Полученные результаты исследования процесса иммобилизации клеток свидетельствуют о высокой эффективности всех использованных сорбентов – полнота

связывания составила более 90%, наиболее эффективными являются носители на основе фукуса лиофилизированного, отрубей ферментированных и полифепана (табл. 1).

Таблица 1

Иммобилизация лактобактерий

Сорбент	Концентрация сорбента в рабочем растворе	КОЕ/мл		Полнота иммобилизации, %
		Взвесь иммобилизованных клеток <i>L. plantarum</i> 8P-A3	Надосадочная жидкость	
Ламинария лиофилизированная	2,5%	$5,60 \times 10^9$	$1,75 \times 10^8$	> 95
Ламинарии слоевища измельченные	5%	$4,30 \times 10^9$	$0,93 \times 10^8$	> 95
Фукус лиофилизированный	5%	$5,35 \times 10^9$	$1,05 \times 10^8$	> 98
Альгинат натрия	2,5 %	$4,25 \times 10^9$	$2,00 \times 10^8$	> 95
Отруби пшеничные ферментированные	5%	$5,03 \times 10^9$	$0,95 \times 10^8$	> 98
Лигнин гидролизный	10%	$5,40 \times 10^9$	$0,65 \times 10^8$	> 98
МКЦ	15%	$4,45 \times 10^9$	$1,00 \times 10^8$	> 95
Каолин	15%	$6,50 \times 10^9$	$1,90 \times 10^8$	> 95
Контроль (бакт. взвесь без сорбента)	–	$5,80 \times 10^9$	$1,90 \times 10^9$	–

Следующим этапом исследований было изучение устойчивости иммобилизованных лактобактерий к действию модельных сред, имитирующих условия пищеварения в желудке и кишечнике человека. До экспозиции в модельных средах количество жизнеспособных лактобактерий в регидратированных образцах иммобилизованной биомассы и в контрольном образце составляло не менее 10^9 КОЕ/мл. После инкубации в кислом растворе пепсина показатель КОЕ снизился на 3 порядка в образцах с сорбентами на основе ламинарии лиофилизированной, термически высушенного порошка ламинарии и фукуса лиофилизированного. Сорбенты на основе альгината натрия, отрубей пшеничных ферментированных и лигнина гидролизного оказали менее выраженный протективный эффект – после действия кислого раствора пепсина количество жизнеспособных лактобактерий в этих образцах сохраняется на уровне не ниже 10^5 КОЕ/мл (снижение показателя КОЕ на 4 порядка). Выраженная чувствительность к действию кислого раствора пепсина отмечена в образцах биомассы с МКЦ, каолином и в контрольном образце без сорбента.

После 2-часовой экспозиции в желчи показатель КОЕ сохраняется на уровне 10^9

КОЕ/мл в образцах биомассы лактобактерий, иммобилизованных с применением лиофилизированного порошка ламинарии и фукуса, снижение выживаемости на один порядок отмечено в образцах с ламинарией и лигнином гидролизным.

Щелочной раствор панкреатина не оказал значительного влияния на выживаемость лактобактерий – уровень показателя КОЕ снизился на 1 порядок во всех испытуемых образцах после 2-часовой экспозиции (табл. 2).

Таблица 2

Выживаемость иммобилизованных лактобактерий в модельных средах

Сорбент	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл			
	Исходное	Кислый раствор пепсина, экспозиция 30 мин при (37±1) °С	Желчь, экспозиция 2 ч при (37±1) °С	Щелочной раствор панкреатина, экспозиция 2 ч при (37±1) °С
Ламинария лиофилизированная	3,25(±1,19)×10 ⁹	3,58(±1,06)*×10 ⁶	2,10(±0,42)×10 ⁹	2,67(±0,49)*×10 ⁸
Ламинарии слоевища измельченные	4,33(±1,29)×10 ⁹	2,50(±0,65)*×10 ⁶	3,50(±0,65)*×10 ⁸	2,33(±0,61)*×10 ⁸
Фукус лиофилизированный	3,58(±0,59)×10 ⁹	3,40(±0,91)*×10 ⁶	1,85(±0,72)*×10 ⁹	2,57(±0,33)*×10 ⁸
Альгинат натрия	4,18(±0,44)×10 ⁹	0,93(±0,12)*×10 ⁶	1,93(±0,05)*×10 ⁷	1,80(±0,47)*×10 ⁸
Отруби пшеничные ферментированные	4,60(±0,70)×10 ⁹	1,45(±0,22)*×10 ⁵	1,40(±0,24)*×10 ⁷	1,85(±0,32)*×10 ⁸
Лигнин гидролизный	3,67(±0,67)×10 ⁹	1,60(±0,47)*×10 ⁵	1,75(±0,30)*×10 ⁸	2,22(±0,57)*×10 ⁸
МКЦ	3,33(±0,88)×10 ⁹	1,53(±0,21)*×10 ⁴	1,35(±0,24)*×10 ⁷	1,90(±0,46)*×10 ⁸
Каолин	3,90(±0,42)×10 ⁹	1,70(±0,26)*×10 ⁴	2,88(±0,30)*×10 ⁷	1,64(±0,15)*×10 ⁸
Контроль	4,00(±0,41)×10 ⁹	2,88(±0,30)*×10 ⁴	3,35(±0,47)*×10 ⁷	2,00(±0,77)*×10 ⁸

* – p<0,05 по сравнению с исходным значением

Защитные свойства носителей на основе ламинарии, фукуса и альгината натрия можно объяснить тем, что данные сорбенты, взаимодействуя с желудочным соком, образуют изотропный гель с включенными в него лактобактериями. Получаемая «гелевая капсула» защищает клетки от дальнейшего воздействия соляной кислоты и пепсина желудочного сока, сохраняя их выживаемость. В тонком кишечнике «капсула» растворяется, происходит высвобождение лактобактерий.

Лигнин гидролизный и отруби пшеничные ферментированные представляют собой растительные волокна, на поверхности которых сорбируются бактерии, что способствует их устойчивости к действию желудочного сока и желчи.

Результаты контроля антагонистической активности иммобилизованных лактобактерий методом «перпендикулярных штрихов» представлены в таблице 3.

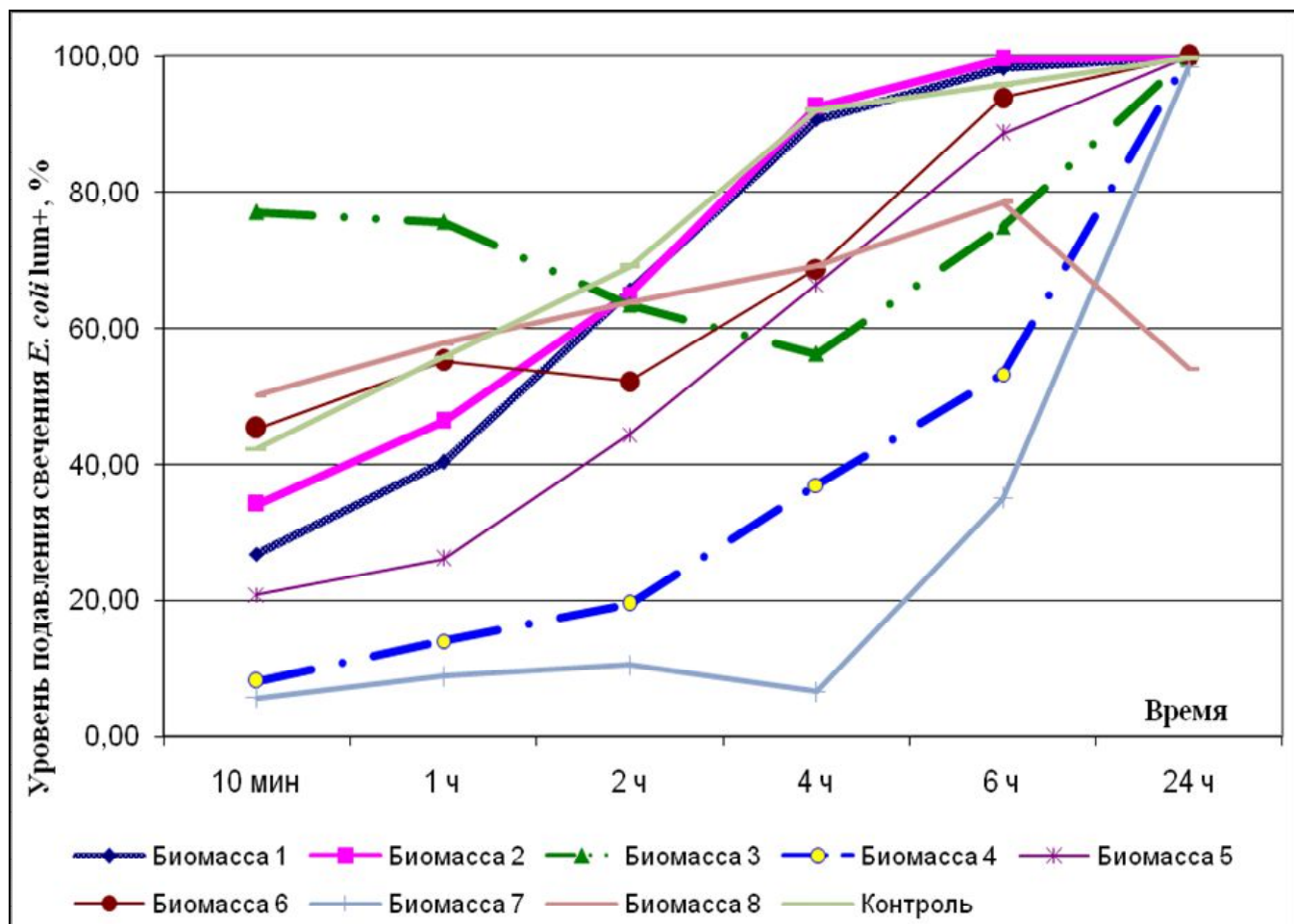
Таблица 3

Антагонистическая активность иммобилизованных лактобактерий
по отношению к *E. coli* 157

№ серии биомассы	Сорбент	Зона задержки роста тест-штамма, мм
1	Ламинария лиофилизированная	40,14±0,40
2	Ламинарии слоевища измельченные	39,57±0,69
3	Фукус лиофилизированный	41,17±0,70
4	Альгинат натрия	39,33±0,95
5	Отруби пшеничные ферментированные	39,17±1,08
6	Лигнин гидролизный	40,33±0,99
7	МКЦ	37,83±0,91
8	Каолин	39,40±1,08
Контроль		39,67±0,49

У всех образцов зона подавления роста тест-штамма превышала нормируемый минимум (20 мм) примерно в 2 раза. Статистически значимых различий между активностью иммобилизованных и свободных клеток не выявлено.

В экспресс-тесте подавления билюминесценции индикаторного штамма *E. coli lum+* все исследуемые образцы лактобактерий проявляли схожую динамику ингибирования свечения, которая характеризовалась последовательным увеличением ИАА, максимум которого (практически 100% подавления) наблюдали к 24 ч экспозиции, за исключением биомассы № 8 с сорбентом на основе каолина (рис. 1).



Влияние лактобактерий на биолюминесценцию *E. coli lum+*

Различия между образцами наблюдались в степени подавления свечения индикаторного штамма в течение 4 ч экспозиции. Низкий уровень подавления свечения (меньше 40%) отмечен у образцов иммобилизованных лактобактерий с сорбентом на основе альгината натрия и каолина. Средний уровень угнетения биолюминесценции (от 40 до 80%) проявляли образцы с сорбентом на основе фукуса, отрубей пшеничных ферментированных, лигнина гидролизного и каолина. Образцы лактобактерий, иммобилизованных на ламинарии, и лактобактерин (контроль) подавляли свечение тест-штамма на уровне выше 80%.

Заключение

Таким образом, эксперименты по изучению выживаемости лактобактерий в модельных средах показали, что иммобилизация клеток позволяет повысить резистентность лактобактерий к действию модельных сред, имитирующих секреты желудочно-кишечного тракта человека. Установлено, что выраженными протективными свойствами обладают сорбенты на основе бурых водорослей (ламинарии и фукуса).

Данные, полученные при использовании двух методических подходов, свидетельствуют о наличии выраженных антагонистических свойств у всех изученных

образцов лактобактерий, а процесс иммобилизации клеток не оказывает негативного влияния на их биологическую активность.

Список литературы

1. Ардатская М.Д. Дисбиоз (дисбактериоз) кишечника: современное состояние проблемы, комплексная диагностика и лечебная коррекция / М.Д. Ардатская и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2015. – № 117 (5). – С. 13–50.
2. Барановский А.Ю. Дисбактериоз кишечника / А.Ю. Барановский, Э.А. Кондрашина. – СПб: Питер, 2008. – 240 с.
3. Новокшенов А.А. Физиологические функции лактобактерий в организме и эффективность их применения в составе пробиотиков в педиатрической практике / А.А. Новокшенов, Н.В. Соколова // Эпидемиология и инфекции – 2012. – № 1. – С. 52–56.
4. ОФС.1.7.2.0009.15 Определение специфической активности пробиотиков / Государственная фармакопея РФ, изд. XIII / Т. 1, 2 <http://www.femb.ru/feml>
5. Несчисляев В.А., Пшеничнов Р.А., Арчакова Е.Г., Чистохина Л.П., Фадеева И.В. Способ определения антагонистической активности пробиотиков // Патент на изобретение № 2187801 от 20.08.2002 г. Бюл. № 23.