

УДК 613.6-616.33-579.61-57.043

**И.П. Высеканцев, Т.В. Дорофеева, Е.В. Кудокоцева,
И.А. Буряк, Л.Е. Шатилова, Т.Ф. Петренко**

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

СОХРАННОСТЬ ПРОБИОТИКА *ESCHERICHIA COLI M-17* ПОСЛЕ ИММОБИЛИЗАЦИИ В ПОЛИСАХАРИДНЫХ ГЕЛЯХ И ХРАНЕНИЯ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Изучена сохранность бактерий *E. coli M-17* после иммобилизации в полисахаридных гелях и хранения при температурах 4, -20, -80 и -196 °С в течение 1 суток и 1 месяца. Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммобилизация в гелях альгината и каррагинана и последующее низкотемпературное консервирование (-80 и -196 °С) обеспечивают достаточно высокую сохранность жизнеспособности и адгезивных свойств клеток пробиотического штамма *E. coli M-17*.

Ключевые слова: пробиотик, иммобилизация, гели, хранение.

Ряд факторов производственной сферы, оказывая прямое или опосредованное воздействие на организм работающих, может вызывать нарушения состава и функций микрофлоры человека в виде дисбиоза или дисбактериальных реакций. Под дисбактериальными реакциями понимают кратковременные изменения в составе кишечной микрофлоры, исчезающие после устранения неблагоприятного фактора, их вызвавшего. Дисбиозом (дисбактериозом) является клинико-лабораторный синдром, характеризующийся стойкими и длительными изменениями количественного и качественного состава микрофлоры с последующим развитием метаболических и иммунологических нарушений [1, 2]. Дисбактериальные реакции и дисбиоз могут быть вызваны такими профессиональными факторами, как неорганические и органические соединения, полимеры, антибиотики, инсектофунгициды, лучистая энергия, электромагнитные волны, высокие температуры и др. [2-5].

В комплексной терапии дисбиозов широко используют пробиотические препараты – пробиотики, пребиотики, синбиотики [1, 2]. В настоящее время большое внимание уделяют разработке пробиотических препаратов четвертого поколения – иммобилизованных форм

пробиотиков [6]. В основном разрабатывают препараты, иммобилизованные или на твердых носителях, как правило, на сорбентах, или в различных гелях [7, 8]. Остается малоизученным вопрос разработки технологий длительного хранения иммобилизованных препаратов пробиотиков. В ИПКиК НАН Украины проводят исследования по разработке экспериментальных препаратов пробиотиков, иммобилизованных на энтеросорбентах и в полисахаридных гелях, и технологий их хранения при низких температурах.

Целью работы явилось изучение влияния условий криоконсервирования на сохранность пробиотического штамма *Escherichia coli M-17* (*E. coli M-17*), иммобилизованного в гелях альгината натрия и каррагинана.

Материал и методы. Штамм *E. coli M-17* был высеян из препарата «Колибактерин», произведенного ОАО «Биомед» им. И.И. Мечникова (Московская обл., Красногорский р-н, с. Петрово-Дальнее).

Бактерии выращивали на скошенном криловом питательном агаре при температуре 37 °С на протяжении 24 часов. Затем клетки смывали с агара жидкой средой М9 [9] в количестве 5 мл. К полученной суспензии клеток в среде М9 добавляли в соотношении 1:1 (v/v) следующие гели: 2 % альгинат натрия,

© И.П. Высеканцев, Т.В. Дорофеева, Е.В. Кудокоцева и др., 2013

2 % каррагинан, 10 % желатин, 1 % агар-агар и 2 % крахмал.

Иммобилизацию клеток осуществляли путем их включения в гранулы альгината и каррагинана [10].

Жизнеспособность *E. coli M-17* изучали «чашечным методом» Коха. При этом гранулы альгината предварительно растворяли в 4 % растворе этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), а гранулы каррагинана – в физиологическом растворе.

Контролем служили суспензии клеток в соответствующих средах, не подвергавшиеся замораживанию.

Полученные образцы замораживали в криопробирках фирмы «Nunc» (США) объемом 1,8 мл. Для изучения влияния различных скоростей охлаждения на жизнеспособность клеток в различных гелях использовали три режима охлаждения: со скоростью 1 °С/мин до –40 °С с последующим погружением в жидкий азот; со скоростью 20 °С/мин до –40 °С с последующим погружением в жидкий азот; охлаждение до –196 °С неконтролируемой скоростью путем погружения в жидкий азот. Оттаивание образцов проводили на водяной бане при температуре 30 °С.

Влияние температуры хранения на жизнеспособность свободных и иммобилизованных клеток *E. coli M-17* исследовали путем выдерживания образцов при температурах 4,

–20, –80 и –196 °С в течение 1 суток и 1 месяца. Образцы, хранившиеся при –196 °С, замораживали путем прямого погружения в жидкий азот. Охлаждение до температур –20 и –80 °С осуществляли путем размещения образцов на полках холодильных камер.

Адгезию бактерий *E. coli M-17* к энтероцитам мышей до и после криоконсервирования определяли методом А.Н. Маянского [11]. Вычисляли средний показатель адгезии (СПА), т. е. среднее число клеток, которые прикрепилась к одному энтероциту.

Энтероциты из тонкого отдела кишечника белых лабораторных мышей выделяли по методу J.H. Carter [12].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, используя t-критерий Стьюдента [13].

Результаты и их обсуждение. Результаты экспериментов по изучению влияния различных режимов замораживания на жизнеспособность *E. coli M-17* в среде М9 и в гелях альгината натрия, каррагинана, желатина, агар-агара и крахмала представлены на рис. 1.

Установлено, что на жизнеспособность бактерий в процессе замораживания влияют скорость охлаждения и состав консервирующей среды. Минимальные показатели жизнеспособности были в образцах, замороженных со скоростью 1 °С/мин в среде М9 и в

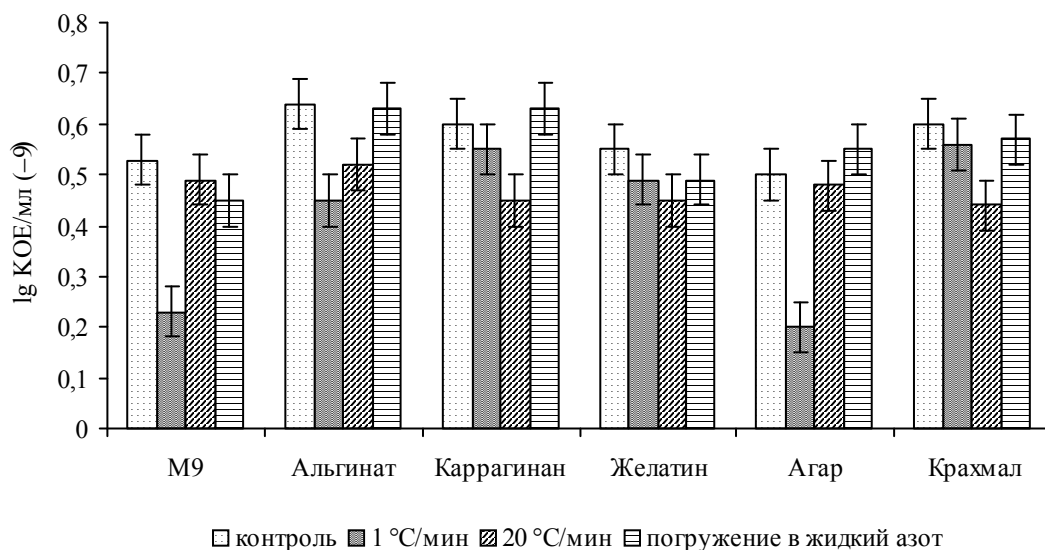


Рис. 1. Показатели жизнеспособности клеток *E. coli M-17* после замораживания в различных гелях со скоростями 1 и 20 °С/мин и погружением в жидкий азот

агарозном геле. В образцах, замороженных с этой скоростью в 1 % геле каррагинана, 5 % геле желатина и 1 % геле крахмала, количество жизнеспособных клеток достоверно не отличалось от контроля. После замораживания со скоростью 20 °С/мин в среде М9, 1 % геле альгината натрия, 0,5 % геле агара количество жизнеспособных клеток также не отличалось от контроля. После быстрого замораживания количество жизнеспособных клеток не изменялось во всех образцах.

Результаты исследования влияния температуры хранения на жизнеспособность клеток *E. coli M-17*, суспендированных в среде М9, иммобилизованных в блоках (1,8 мл) и гранулах гелей каррагинана и альгината натрия, представлены в таблице.

Жизнеспособность бактерий E. coli M-17 после хранения при различных температурах в течение 1 месяца, число КОЕ/мл

Температура хранения, °С	Срок хранения	<i>E. coli M-17</i>				
		+ среда М9 (1:1)	+ 2 % альгинат (1:1)	в гранулах альгината	+ 2 % каррагинан (1:1)	в гранулах каррагинана
Контроль		(1,63±0,14)·10 ⁹	(2,35±0,17)·10 ⁹	(2,85±0,19)·10 ⁷	(3,96±0,21)·10 ⁹	(3,14±0,18)·10 ⁷
4	1 сут	(1,51±0,09)·10 ⁹	(1,97±0,12)·10 ^{9*}	(2,93±0,14)·10 ^{7*}	(3,25±0,15)·10 ^{9*}	(2,75±0,18)·10 ^{7*}
	1 мес	(1,54±0,11)·10 ⁹	(1,39±0,08)·10 ^{9**}	(0,08±0,04)·10 ^{7**}	(2,98±0,13)·10 ^{9**}	(0,10±0,04)·10 ^{7**}
-20	1 сут	(1,46±0,12)·10 ^{9*}	(0,87±0,07)·10 ^{9*}	(0,43±0,06)·10 ^{7*}	(1,75±0,09)·10 ^{9*}	(0,65±0,05)·10 ^{7*}
	1 мес	(0,46±0,04)·10 ^{9**}	(0,34±0,05)·10 ^{9**}	(0,14±0,03)·10 ^{7**}	(1,20±0,12)·10 ^{9**}	(0,21±0,05)·10 ^{7**}
-80	1 сут	(0,91±0,08)·10 ^{9*}	(0,84±0,06)·10 ^{9*}	(0,80±0,05)·10 ^{7*}	(2,01±0,13)·10 ^{9*}	(0,97±0,08)·10 ^{7*}
	1 мес	(1,06±0,07)·10 ^{9*}	(0,94±0,08)·10 ^{9*}	(0,88±0,06)·10 ^{7*}	(1,97±0,14)·10 ^{9*}	(0,82±0,07)·10 ^{7*}
-196	1 сут	(1,68±0,15)·10 ⁹	(2,19±0,17)·10 ⁹	(0,97±0,06)·10 ^{7*}	(0,97±0,06)·10 ^{7*}	(1,32±0,08)·10 ^{7*}
	1 мес	(1,56±0,13)·10 ⁹	(1,85±0,12)·10 ⁹	(0,88±0,07)·10 ^{7*}	(0,88±0,07)·10 ^{7*}	(1,11±0,09)·10 ^{7*}

Примечание. Достоверные различия между показателями: * контроля и хранившихся образцов; # образцов, хранившихся 1 сутки и 1 месяц.

Каррагинан и альгинат натрия были выбраны нами в качестве носителей клеток в связи с тем, что данные гели получили наиболее широкое распространение в медицине, микробиологической и пищевой промышленности [14].

После охлаждения образцов до 4 °С (1-е сутки хранения) количество жизнеспособных бактерий, суспендированных в среде М9, не изменялось, а в гелевых носителях снижалось. После хранения в течение 1 месяца в среде М9 жизнеспособность бактерий также не изменялась, а в блоках и гранулах гелей альгината и каррагинана была ниже, чем в первые сутки хранения.

В процессе охлаждения до -20 °С бактерии в среде М9 не погибали, но при последующем хранении при этой температуре в те-

чение месяца их жизнеспособность снизилась. При хранении в гелях альгината и каррагинана бактерии погибали и на этапе охлаждения, и при последующем хранении при -20 °С.

При температуре -80 °С бактерии во всех образцах погибали только на этапе охлаждения. При последующем хранении их жизнеспособность не изменялась.

После замораживания до -196 °С по указанному режиму в образцах бактерий, иммобилизованных в гранулах гелей альгината и каррагинана, жизнеспособность клеток снижалась, в остальных случаях оставалась без изменений. Хранение при -196 °С в течение месяца дополнительной гибели клеток во всех образцах не вызывало.

Поскольку терапевтический эффект бактерий-пробиотиков зависит в первую очередь от колонизационных свойств, в дальнейших экспериментах оценивали сохранность адгезивной активности клеток *E. coli M-17* после замораживания до -196 °С в среде М9 и гелях 1 % альгината и каррагинана. Учитывая представленные данные, образцы замораживали погружением в жидкий азот. Полученные результаты отображены на рис. 2, 3.

Было установлено, что СПА бактерий был максимальным при суспендировании клеток *E. coli M-17* в среде М9 (рис. 3). СПА бактерий после криоконсервирования во всех образцах был ниже, чем контрольный.

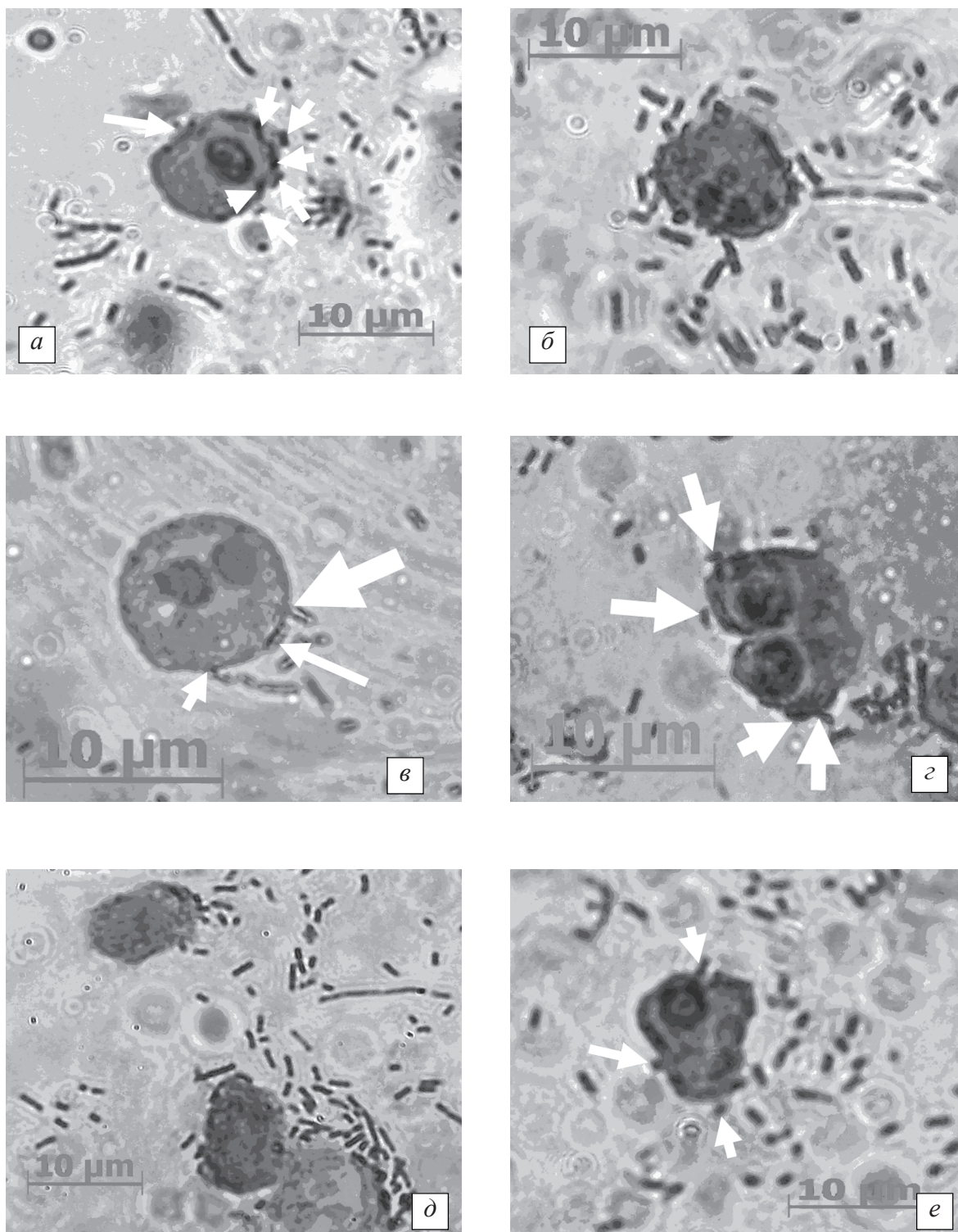


Рис. 2. Адгезія кліток *E. coli* M-17 к ентероцитам до заморожування (а, в, д) і після заморожування-оттаивання (б, г, е); в середі М9 (а, б); в 1 % гелі альгіната (в, г); в 1 % гелі каррагінана (д, е)

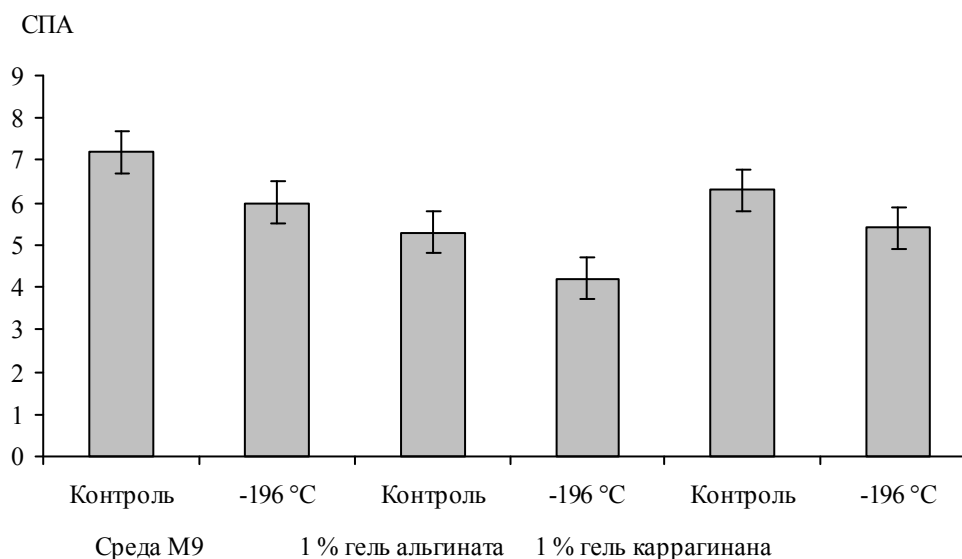


Рис. 3. Адгезия бактерий *E. coli M-17* к изолированным энтероцитам после замораживания до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ в разных средах консервирования

Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммобилизация в гелях альгината и каррагинана и последующее низкотемпературное консервирование (-80 и $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) обеспечивают достаточно высокую сохранность жизнеспособности и адгезивных свойств клеток пробиотического штамма

E. coli M-17. Это позволяет рекомендовать данные гели и низкотемпературное консервирование для разработки технологий производства иммобилизованных пробиотиков, которые могут быть использованы при лечении дисбиозов, вызванных воздействием профессиональных факторов.

Список литературы

1. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника : Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004 – 2003. – [Утв. приказом МЗ РФ от 9 июня 2003 г. № 231].
2. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / [под ред. Е. И. Ткаченко, А. Н. Суворова]. – [2-е изд., испр. и доп.]. – СПб. : ИнформМед, 2009. – 276 с.
3. Профессиональные болезни. Руководство для врачей / [под ред. А. А. Летавета, К. П. Молоканова, Э. А. Дрогигиной и др.]. – М. : Медицина, 1973. – 639 с.
4. Барановский А. Ю. Дисбактериоз кишечника / А. Ю. Барановский, Э. А. Кондрышина. – СПб. : Питер, 2000. – 224 с.
5. Intestinal flora under conditions of stress / W. Meng, E. Partala, H. Bernhardt, M. Kuoke // *Nahrung*. – 1984. – V. 28, № 6–7. – P. 615–617.
6. Захарова И. Н. Современные пробиотики для коррекции микробиоценоза кишечника у детей / И. Н. Захарова, Л. Н. Мазанкова, Ю. А. Дмитриева // *Вопросы современной педиатрии*. – 2009. – Т. 8, № 2. – С. 113–117.
7. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / [под ред. А. Н. Гольцева]. – Харьков, 2012. – С. 401–440.
8. Конструирование иммобилизованной формы жидкого пробиотика / И. В. Соловьева, А. Г. Точилина, И. В. Белова [и др.] // *Микробиология и эпидемиология. Вестник Нижегородского университета им. А. Н. Лобачевского*. – 2012. – № 2 (3). – С. 85–92.
9. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер ; [пер. с англ. под ред. С. И. Алиханяна]. – М. : Мир, 1976. – 436 с.
10. Freezing resistance improvement of *Lactobacillus reuteri* by using cell immobilization / J.-H. Tsen, H.-Y. Huang, Y.-P. Lin, V. A.-E. King // *J. of Microbiological Methods*. – 2007. – № 70. – P. 561–564.

11. *Маянский А. Н.* Способ оценки прочности адгезии *Candida albicans* на эпителиоцитах / А. Н. Маянский, Е. В. Салина, М. И. Заславская // Клиническая лабораторная диагностика. – 2003. – № 2. – С. 53–54.
12. *Carter J. H.* Isolation of hamster intestinal epithelial cells using hypoosmotic media and PVP / J. H. Carter, H. Carter, J. Nassbaum // J. Cel. Physiol. – 1982. – V. 111, № 1. – P. 55–67.
13. *Гланц С.* Медико-биологическая статистика / С. Гланц ; [пер. с англ. под ред. Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова]. – М. : Практика, 1999. – 460 с.
14. *Демаков В. А.* Иммуобилизация клеток микроорганизмов: биотехнологические аспекты / В. А. Демаков, Ю. Г. Максимова, А. Ю. Максимов // Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 30–45.

І.П. Висеканцев, Т.В. Дорофеева, О.В. Кудокотцева, І.А. Буряк, Л.Є. Шатілова, Т.П. Петренко
СХОРОННІСТЬ ПРОБІОТИКА *ESCHERICHIA COLI M-17* ПІСЛЯ ІММОБІЛІЗАЦІЇ
В ПОЛІСАХАРИДНИХ ГЕЛЯХ І ЗБЕРІГАННЯ ПРИ РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

Вивчено схоронність бактерій *E. coli M-17* після імуобілізації в полісахаридних гелях і зберіганні при температурах 4, –20, –80 та –196 °С упродовж 1 доби і 1 місяця. Отримані результати свідчать про те, що імуобілізація в гелях альгінату і карагінану та подальша низькотемпературна консервація (–80 і –196 °С) забезпечують досить високу схоронність життєздатності та адгезивних властивостей клітин пробіотичного штаму *E. coli M-17*.

Ключові слова: пробіотик, імуобілізація, гелі, зберігання.

I.P. Vysekantsev, T.V. Dorofeyeva, E.V. Kudokotseva, I.A. Buryak, L.E. Shatilova, T.F. Petrenko
PRESERVATION OF *ESCHERICHIA COLI M-17* PROBIOTIC AFTER IMMOBILIZATION
IN POLYSACCHARIDE GELS AND STORAGE UNDER DIFFERENT TEMPERATURES

The preservation of bacteria *E. coli M-17* after immobilization in polysaccharide gels and storage at 4, –20, –80 and –196 °C within 1 day and 1 month was studied. The results obtained testify to the fact, that the immobilization in alginate and carrageenan gels and following low temperature preservation (–80 and –196 °C) provide quite a high preservation of viability and adhesive properties of cells in *E. coli M-17* probiotic strain.

Key words: probiotic, immobilization, gels, storage.

Поступила 25.04.13