



123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

Тел: 193-30-01

Факс: 193-61-83

№ \_\_\_\_\_  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

<http://www.gamaleya.ru>

E-mail: [main@gamaleya.ru](mailto:main@gamaleya.ru)

1570.g23@g23.relcom.ru

## ОТЧЕТ

**Тема: “Изучение продукции антибиотикоподобных веществ и сорбции на волокнах Рекицена- РД различных штаммов лактобацилл”**

| Разделы    | Содержание  | Стр. |
|------------|---|------|
| Введение   | Цель и задачи исследования  | 2    |
|            | Материалы и методы  | 3    |
| Раздел 1   | Характеристика биокомплекса «Рекицен-РД –<br>лактобациллы»  | 5    |
| Раздел 2   | Электронно-микроскопические исследования<br>биокомплекса «Рекицен- РД-лактобациллы»                                 | 6    |
| Раздел 3   | Изучение жизнеспособности лактобацилл в биокомплексе<br>«Рекицен- РД-лактобациллы» в динамике хранения<br>препарата | 8    |
| Заключение |   | 9    |
| Литература |   | 10   |

## ВВЕДЕНИЕ

По данным многочисленных источников для коррекции нарушенного микробиоценоза желудочно-кишечного тракта применяют в том числе и биологически активные добавки, обогащенные пробиотическими бактериями, проявляющие свой лечебно-профилактический эффект через регуляцию функций микробиоты организма «хозяина».

Проведению данной НИР способствовало отсутствие необходимого энтеросорбента в качестве матрицы для использования с целью сорбирования пробиотических бактерий. В настоящее время используется *B.bifidum*1 на активированном косточковом угле. Активированный уголь гидрофобен и с него плохо десорбируются бифидобактерии. В препарате пробифор на угле сорбированы только бифидобактерии, второй компонент-лактобациллы: (бактериальный порошок производственного штамма *L.plantrum* 8РА-3) добавлен в виде простого порошка. По-видимому данная основа не может быть матрицей для лактобацилл. Возможно иммобилизованные на активированном угле бактерии находятся в другом физико-химическом состоянии и характеризуются более выраженной физиологической активностью в условиях желудочно-кишечного тракта по сравнению с планктонными.

С учетом вышесказанного, становится актуальным создание нового препарата на основе оригинального сорбента-носителя и штаммов лактобацилл, продуцирующих бактериоциноподобные вещества.

**Цель исследования:** Создание биоконплекса, содержащего жизнеспособные клетки бактериоциносинтезирующих лактобацилл, иммобилизованных на волокнах сорбента Рекицен-РД (производства ЗАО «Ягодное» г. Киров), и изучение его свойств.

**Задачи исследования:**

1.Отбор из коллекции высокоантагонистических штаммов лактобацилл потенциально производственных культур, продуцирующих бактериоциноподобные вещества.

2.Получение экспериментальных образцов иммобилизованных форм бактериальной культуры бактериоцинпродуцирующих лактобацилл и оценка степени их адсорбции с помощью микроскопии мазков и определения количества колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) бактериологическим методом.

3. Исследование состояния жизнеспособности сорбированных на волокнах Рекицена-РД лактобацилл путем определения количества колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) через 2 и 4 недели и спустя 3 и 6 месяцев хранения при температуре плюс  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  бактериологическим методом.

4. Электронно-микроскопический анализ процесса иммобилизации бактериоциногенных лактобацилл на волокнах Рекицена-РД через 30 мин и через 18 час после внесения суспензии лактобацилл.

## **Материалы и методы**

**Штаммы микроорганизмов.** Использовали бактерии 3-х производственных штаммов: *L.plantarum* 8РА-3, *L.fermentum* 90-4С (пробиотические штаммы препарата «Лактобактерин», РФ), *L.rhamnosum* GG (препарат-пробиотик «Бифиформ», Дания), и 2 новых - *L.plantarum* 206 и *L.casei* 33.

Продукцию лактобациллами бактериоциноподобных веществ определяли методом двухслойного агара (методом отсроченного антагонизма) на специальных средах в отношении 4 индикаторных культур: *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* 25923, *Salmonella typhimurium* 415 и *Shigella sonnei* 941. Положительный результат учитывали по появлению вокруг блешек лактобацилл, обработанных хлороформом, зоны отсутствия роста жизнеспособных клеток тест-культуры.

Продукция бактериоциноподобных (антибиотикоподобных) веществ у бактерий штаммов *L.rhamnosum* GG («Бифиформ», Дания), *L.plantarum* 8РА-3 (пробиотик «Лактобактерин», РФ) и *L.plantarum* 206 была выражена в большей степени, чем у бактерий *L.fermentum* 90-4С («Лактобактерин», РФ) и *L.casei* 33.

**Образцы Рекицена-РД.** В качестве матрицы-носителя использовали препараты Рекицена-РД трех серий (№1, №2 и №3 выпуска 2006г).

**Микробиологический метод.** Соотношение лактобацилл, находящихся в свободном и адсорбированном состоянии в образцах, ориентировочно оценивали с помощью приготовления обычных мазков, окрашиваемых по Граму, с параллельным расчетом КОЕ/мл планктонных микробных клеток, позволяющим определять титры адсорбированных лактобацилл при любом соотношении сорбента в образцах при бактериологическом методе исследования.

**Методика сорбции (иммобилизации).** Для отработки способа иммобилизации бактериальных клеток на волокнах Рекицена-РД в предварительных опытах использовали эталонную производственную культуру *L.plantarum* 8РА-3, входящую в состав коммерческого препарата «Лактобактерин» и серию №1 препарата Рекицен-РД.

Применяли 10% (в конечном объеме) суспензию Рекицена-РД на основе 0,9% физиологического раствора хлорида натрия. В опытные образцы с начальным объемом 4,5 мл вносили 0,5 мл бактериальной взвеси с концентрацией микробных клеток  $10^9$ /мл, перемешивали и ставили на инкубацию при 37°C на 30 и 60 минут. После инкубации пробирки откручивали при 3 тыс. об/мин в течение 1-2 минут. Осадок набирали

бактериологической петлей, наносили на предметное стекло, распределяя суспензию по поверхности стекла, мазок высушивали, фиксировали над пламенем горелки, окрашивали по Граму и микроскопировали.

С целью определения количества жизнеспособных клеток биокомплекса в процессе его хранения иммобилизацию бактериальных клеток на волокнах Рекицена-РД проводили путем приготовления аликвот образца сорбента в объеме 1 мл с 9 мл суспензии лактобацилл, содержащей  $10^8$  КОЕ/мл. Время инкубации составляло 1 час. Количество адсорбированной культуры определяли по разности концентрации микроорганизмов в исходной суспензии и в супернатанте после инкубации с образцом Рекицена-РД и далее рассчитывали количество жизнеспособных клеток в КОЕ/мл в динамике хранения образцов через 2 и 4 недели и затем через 3 и 6 месяцев хранения при температуре плюс  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ . Концентрацию бактериальных клеток в супернатанте определяли по результатам посева десятикратных разведений аликвот на агаризованную среду МРС-4 фирмы HiMedia (Индия).

### **Электронно-микроскопические методы.**

Использовали следующие электронно-микроскопические методы исследования:

*(1) позитивного окрашивания уранилацетатом*, позволяющий выявлять и оценивать их физиологическое состояние бактериальных клеток лактобацилл.

*(2) ультратонких срезов*, дающий возможность исследовать внутреннее содержимое клеток, выявить признаки деструкции клеточных компонентов, а также проанализировать характер взаимодействия клеток лактобацилл с волокнами сорбента.

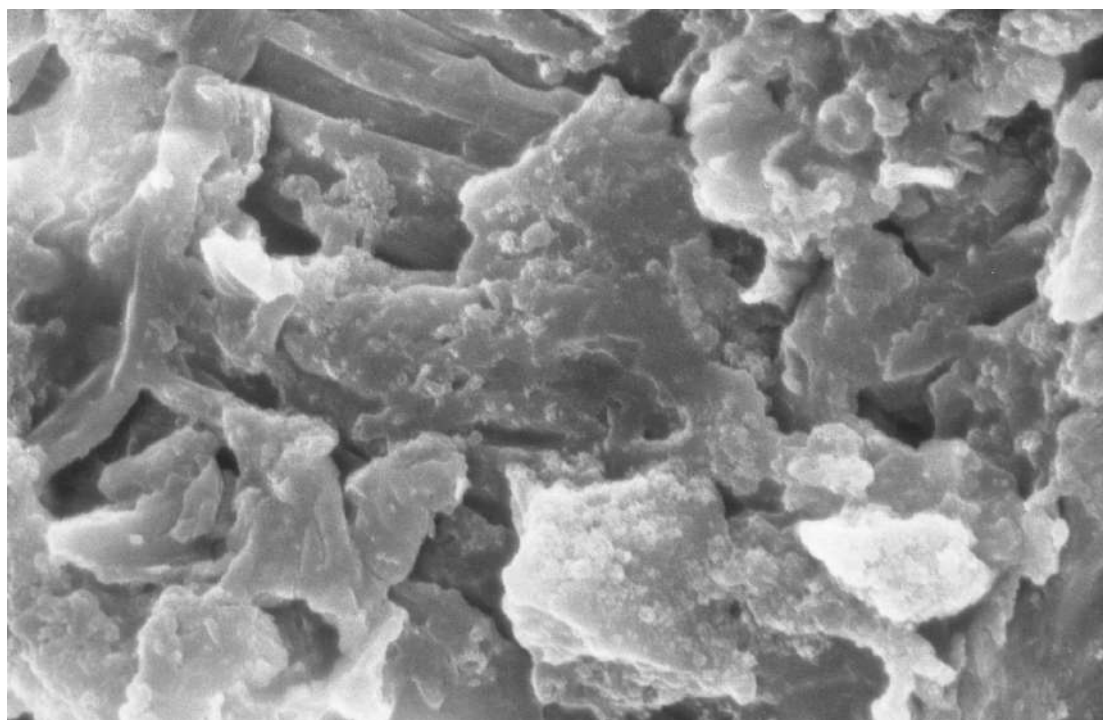
*(3) сканирующей электронной микроскопии*, выявляющий характер прикрепленных клеток лактобацилл на поверхности волокон.

Комплексное исследование позволяет получить достоверную информацию о структуре популяции, характере сорбции бактерий и физиологическом состоянии бактериальных клеток в препарате.

**Основные термины.** Титр: содержание жизнеспособных лактобацилл в КОЕ на 1 г или 1 мл образца и его изменение в процессе хранения образцов. Структура популяции: соотношение различных морфологических типов бактериальных клеток в исследуемом образце. Морфо-физиологическая характеристика: оценка морфологических свойств бактериальных клеток с анализом состояния их клеточных компонентов.

## **Раздел 1. Характеристика биокомплекса «Рекицен-РД-лактобациллы»**

Прежде всего, образцы Рекицена-РД подвергали стерилизации при кипячении ( $t^{\circ}$  100 $^{\circ}$ C) в течение 30 минут. После охлаждения образцы подвергали визуальному осмотру в световом микроскопе. Термическая обработка образцов Рекицена-РД при соблюдении данных параметров не сопровождалась деструкцией волокон. Типичная электронограмма нативных образцов Рекицена- РД представлена на рис.1.



**Рис.1. Электроно-микроскопическая картина волокон Рекицена-РД**

**Сорбцию бактерий** проводили на волокнах трех серий Рекицена-РД, используя отдельно 5 штаммов лактобацилл: *L.plantarum* 8PA-3, *L.fermentum* 90-4C, *L.rhamnosum* GG и новые штаммы *L.plantarum* 206 и *L.casei* 33. Установлено, что бактериальные клетки разных штаммов, в том числе *L.plantarum* 8PA-3, *L.fermentum* 90-4C, *L.rhamnosum* GG, *L.plantarum* 206 и *L.casei* 33 отличаются по уровню сорбции на волокнах препарата. Емкостные характеристики исследованных трех серий Рекицена-РД в отношении бактериальных клеток показали, что наибольшей адсорбционной активностью обладали бактерии штаммов *L.plantarum* 206 и *L.plantarum* 8PA-3. При 60 мин инкубации различных концентраций бактериальных клеток с волокнами Рекицена-РД в супернатантах обнаруживали свободные (планктонные) бактерии в пределах 70-80%, т.е. в среднем на волокнах фиксировалось от 20 до 30% клеток указанных двух культур (табл.1). Адсорбция бактериальных клеток *L.fermentum* 90-4C, *L.rhamnosum* GG и *L.casei* 33 была выражена значительно меньше и составляла 12, 16 и 14 % соответственно.

**Таблица 1. Процент оставшихся в супернатанте планктонных неадсорбированных клеток *L.plantarum* 206 и *L..plantarum* 8РА-3 после 1 час инкубации различных концентраций (КОЕ/мл) лактобацилл с 10% суспензией Рекицена-РД**

| Образец Рекицена -РД | <i>L. plantarum</i> 206                    |                                     | <i>L.plantarum</i> 8РА-3             |                                      |
|----------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                      | Исходная концентрация клеток, (КОЕ млн/мл) | % плактонных клеток в супернатанте* | Исходная концентрация клеток, млн/мл | % планктонных клеток в супернатанте* |
| Серия № 1            | 1.5  | 80 (20)                             | 1,5                                  | 82 (18)                              |
|                      | 5.0  | 76 (24)                             | 5.0                                  | 76(24)                               |
|                      | 15,0                                       | 72 (28)                             | 15.0                                 | 74(26)                               |
|                      | 150,0                                      | 72(28)                              | 150.0                                | 72(28)                               |
| Серия № 2            | 5.0  | 74(30)                              | 5.0                                  | 76(24)                               |
|                      | 15.0                                       | 72(28)                              | 15.0                                 | 72(28)                               |
| Серия № 3            | 15,0                                       | 70(30)                              | 15.0                                 | 74(26)                               |

**Примечание: \* в скобках указан % адсорбированных клеток лактобацилл**

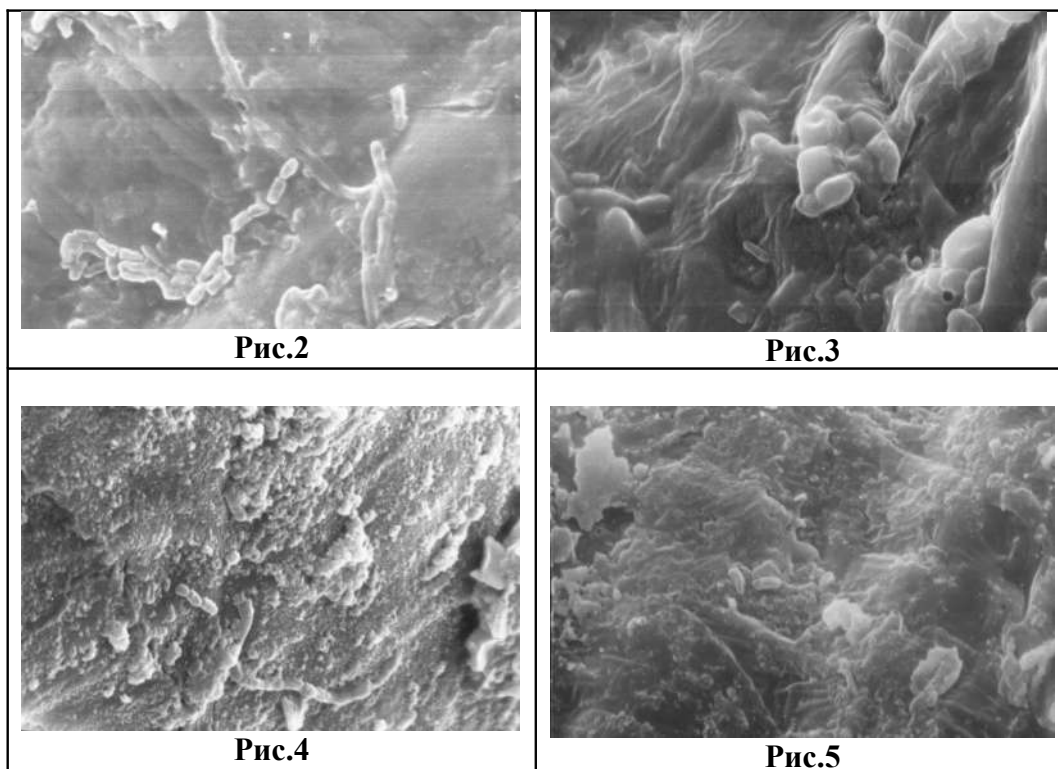
Как видно из данных табл.1, сорбционная емкость 3-х серий Рекицена-РД в отношении бактерий двух селекционированных штаммов лактобацилл, синтезирующих бактериоциноподобные вещества, была сходной, все серии препарата достаточно эффективно сорбировали бактериальные клетки, при этом, однако, адсорбция клеток штамма *L.plantarum* 206 была несколько более выражена, чем клеток *L. plantarum* 8РА-3. Выявлена также зависимость емкости сорбции Рекицена-РД от концентрации бактериальных клеток, которая вначале имела линейный участок, соответствующий классической изотерме.

## **Раздел 2. Электронно-микроскопические исследования биоконплекса «Рекицен-РД-лактобациллы»**

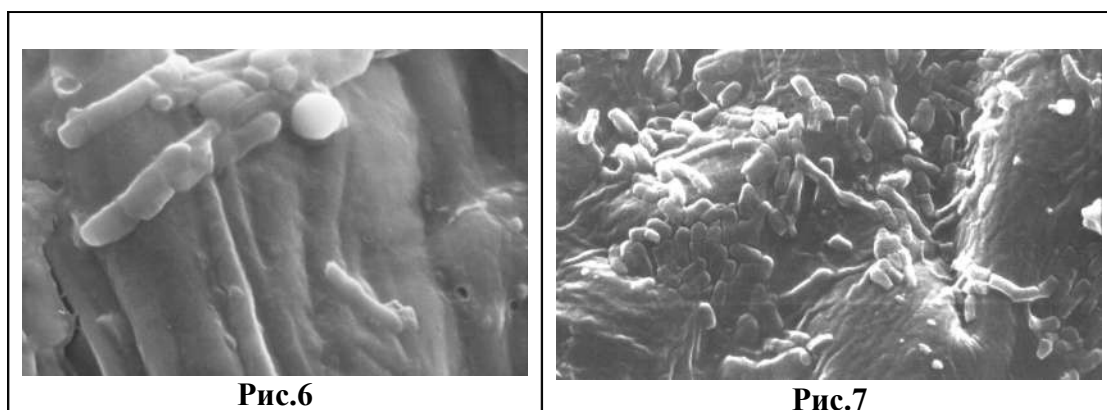
Данные, полученные методом сканирующей электронной микроскопии, показали, что процесс сорбции клеток лактобацилл на поверхности волокон Рекицена-РД происходит достаточно интенсивно как в течение 30 и 60 мин контакта бактерий с сорбентом и зависит от использованного штамма лактобацилл и степени разведения сорбента в 10, 100 или 1000 раз.

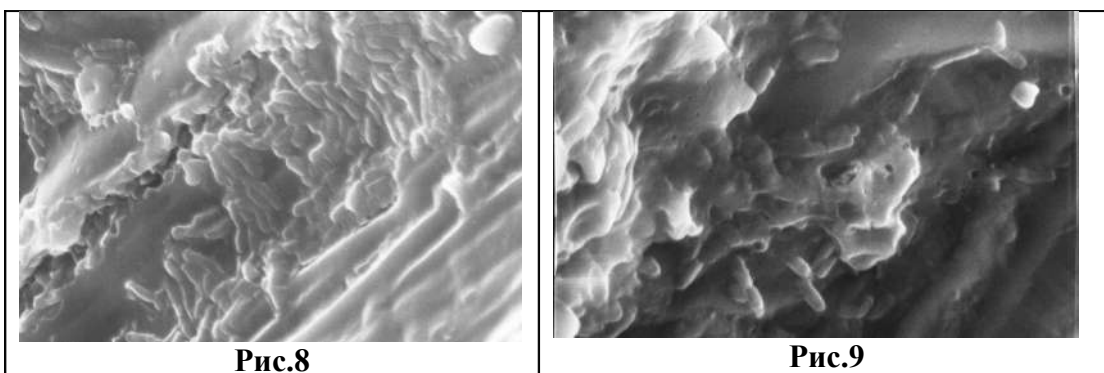
На ультратонких срезах было выявлено, что клетки лактобацилл прикреплены к поверхности волокон, при этом образуется тесная связь между поверхностью клеточной стенки лактобацилл и фибриллами волокон. На рис 2-6. представлены электронограммы

сорбированных в течение 1 часа на волокнах Рекицена-РД клеток лактобацилл различных штаммов: *L.plantarum* 8РА-3 (рис.2), *L.fermentum* 90-4С (рис.3), *L.rhamnosum* GG (рис.4), *L.plantarum* 206 (рис.5) и *L.casei* 33 (рис.6).



Через 18 часов в препаратах Рекиçена-РД, обработанных суспензией *L.plantarum* 206 и *L.plantarum* 8РА-3 и *L.casei* 33, наблюдали частичное размножение бактерий, представленное на рис.7, 8 и 9 соответственно.





Анализ морфологических свойств бактериальных клеток, проведенный с помощью метода позитивного окрашивания, позволил констатировать сохранение их физиологической активности на протяжении всех сроков опыта.

### **Раздел 3. Изучение жизнеспособности лактобацилл в биокомплексе «Рекицен- РД-лактобациллы» в динамике хранения препарата**

В следующей серии опытов был проведен анализ динамики жизнеспособности и степени адсорбции пробиотических культур биокомплекса «Рекицен-РД-лактобациллы» в течение 2 недель и затем через 3 и 6 месяцев хранения биокомплекса при температуре плюс  $4\pm 2^\circ\text{C}$ . С этой целью определяли изменение титра КОЕ/мл суспензии в процессе хранения биокомплекса «Рекицен-РД-лактобациллы» в объемах 25 мл взвеси в 50 мл бутылках. В опытах использована серия № 3 Рекицена-РД. Образцы по 25 мл отличались по видовой характеристике вносимых культур: *L.plantarum* 8РА-3, *L.rhamnosum* GG, *L.plantarum* 206 *L.fermentum* 90-4С и *L.casei* 33.

Титры лактобацилл в образцах, хранящихся при температуре плюс  $4\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 1 сут и 2 недель представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Титр лактобацилл в образцах биокомплекса «Рекицен-РД-лактобациллы», хранящихся при температуре плюс  $4\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 1 сут и 2 недель**

| Штамм<br>лактобацилл | КОЕ/ мл                         |                                       |                     |                        |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------|------------------------|
|                      | Исходный<br>титр<br>лактобацилл | Титр при<br>внесении в<br>Рекицен РД- | Титр через<br>сутки | Титр через 2<br>недели |
| 8РА-3                | $1,2 \times 10^8$               | $0,8 \times 10^8$                     | $1,2 \times 10^8$   | $1,2 \times 10^7$      |
| GG                   | $1,4 \times 10^8$               | $0,9 \times 10^8$                     | $1,2 \times 10^8$   | $1,2 \times 10^7$      |
| 206                  | $1,3 \times 10^8$               | $0,8 \times 10^8$                     | $1,2 \times 10^8$   | $1,2 \times 10^7$      |
| 90-4С                | $1,3 \times 10^8$               | $0,9 \times 10^8$                     | $1,2 \times 10^8$   | $1,2 \times 10^7$      |
| 33                   | $1,2 \times 10^8$               | $0,8 \times 10^8$                     | $1,2 \times 10^8$   | $1,2 \times 10^7$      |



Титры лактобацилл в образцах, хранящихся при температуре плюс  $4\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3 и 6 месяцев, представлены в таблице 3.

**Таблица 3. Титр лактобацилл в образцах биокомплекса «Рекицен-РД-лактобациллы», хранящихся при температуре плюс  $4\pm 2^\circ\text{C}$  в течение 3 и 6 месяцев**

| Штамм<br>лактобацилл | КОЕ/ мл                         |                                       |                        |                         |
|----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|
|                      | Исходный<br>титр<br>лактобацилл | Титр при<br>внесении в<br>Рекицен РД- | Титр через 3<br>месяца | Титр через 6<br>месяцев |
| 8РА-3                | $1,0 \times 10^8$               | $0,7 \times 10^8$                     | $1,4 \times 10^7$      | $1,2 \times 10^6$       |
| GG                   | $1,2 \times 10^8$               | $0,8 \times 10^8$                     | $1,5 \times 10^7$      | $0,8 \times 10^7$       |
| 206                  | $1,1 \times 10^8$               | $0,7 \times 10^8$                     | $1,2 \times 10^7$      | $0,9 \times 10^7$       |
| 90-4С                | $1,3 \times 10^8$               | $0,8 \times 10^8$                     | $1,0 \times 10^7$      | $0,6 \times 10^7$       |
| 33                   | $1,1 \times 10^8$               | $0,8 \times 10^8$                     | $0,9 \times 10^8$      | $1,1 \times 10^7$       |

Анализ морфологических свойств бактериальных клеток, проведенный с помощью метода позитивного окрашивания, позволил констатировать сохранение их физиологической активности на протяжении всего периода хранения (срок наблюдения 6 месяцев).

Сравнительный анализ данных высевов и электронограмм показал снижение количества жизнеспособных клеток лактобацилл при данных условиях хранения. По-видимому, без добавления питательных компонентов в образец условия выживания адсорбированных на поверхности волокон бактериальных клеток не являются оптимальными.

### **Заключение**

В качестве основных итогов проведенного исследования представляется возможным сделать следующие выводы:

1. Показана эффективность использования волокон препарата Рекицен-РД для иммобилизации лактобацилл различных видов.
2. Преимущественная сорбция бактерий штамма *L.plantarum* 8 РА-3 и *L.plantarum* 206 объясняется, по-видимому, особенностями метаболической активности лактобацилл данных культур.
3. Показано, что иммобилизация лактобацилл происходит в течение короткого времени (30 мин), что свидетельствует о возможности приготовления суспензии биокомплекса «Рекицен-РД-лактобациллы» *ex tempore*.
4. Из полученных результатов можно заключить, что важным фактором эффективности иммобилизации и дальнейшего существования культуры лактобацилл является

естественное регулирование активности продуктов их метаболизма, способствующее более выраженному сохранению их жизнеспособности по сравнению с их жизнеспособностью в растворе хлорида натрия. Этим обстоятельством объясняется отмеченный эффект пролонгации физиологически активного состояния лактобацилл в иммобилизованном состоянии на волокнах Рекицена-РД.

5. По данным электронной микроскопии большая часть клеток находится в физиологически активном состоянии. Лактобациллы, иммобилизованные на волокнах, длительное время сохраняют “нативную” структуру.

6. Из пяти культур лактобацилл отобрано 2 бактериоциногенных штамма *L. plantarum* 206 и *L. plantarum* 8РА-3, микробные клетки которых сохраняются в титре, незначительно сниженном в биокомплексе «Рекицен-РД-лактобациллы» в течение 6 месяцев хранения.

7. Полученные данные свидетельствуют о том, что добавление к Рекицену-РД пробиотических культур лактобацилл весьма целесообразно, что сохраняет их активность и открывают перспективы ближайшего создания нового биокомплекса «Рекицен-РД-лактобациллы» на основе производственного штамма *L. plantarum* 8РА-3 и Рекицена-РД.

### Литература

1. *Бондаренко В.М.* Роль условно-патогенных бактерий кишечника в полиорганной патологии человека. - М.-Тверь: ООО Издательство «Триада», 2007.- 64 с.
2. *Бондаренко В.М.* Прикладные аспекты молекулярной биологии бифидобактерий и лактобацилл. Журн.микробиол.2006, 7: 89-97.
3. *Бондаренко В.М., Воробьев А.А.* Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией. Журн. микробиол. 2004. 1: 84-92.
4. *Бондаренко В.М., Мацулевич Т.В.* Дисбактериозы кишечника как клинко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. ГЭОТАР-Медиа. М., 2007, 304с.
5. *Воробьев А.А., Бондаренко В.М., Лыкова Е.А. и др.* Микрoэкологические нарушения при клинической патологии и их коррекция пробиотиками. Вестн. РАМН, 2004, 2:13-17.
6. *Грачева Н.М., Бондаренко В.М.* Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника. Инфекц. болезни. 2004, 2(2):53-58.
7. *Рябиченко Е.В., Бондаренко В.М.* Роль кишечной бактериальной аутофлоры и ее эндотоксина в патологии человека. Журн. микробиол.2007, 3: 103-111.
8. *Червинец Ю.В., Бондаренко В.М., Шабанова Н.А. и др.* Бактериоциногенные высокоантагонистические штаммы лактобацилл. Журн.микробиол. 2007, 7: 78-82.

9. *Mc Auliffe O., Hill C., Ross R.P.* Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol.Rev. 2001. 25(3): 285-308.

10. *Papagianni M.* Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and application. Biotechnol.Adv. 2003, 21(6): 465-499.

Руководитель НИР, зав. лаб.генетики вирулентности  
бактерии НИИЭМ им.Н.Ф.Гамалеи РАМН,  
академик РАЕН и РАМТ, д.м.н., профессор



Бондаренко В.М.

Ответственный исполнитель начальник лаб. СИБ НИИ  
особо чистых препаратов, д.б.н. профессор

Рыбальченко О.В.