Науковий вісник Ужгородського університету
Серія Біологія, Випуск 22, 2008: 104-109

УДК 579.81.21

ДОСЛІДЖЕННЯ АЕРОСИЛУ ДЛЯ СТВОРЕННЯ КОМПЛЕКСНИХ ПРОБІОТИКІВ НА ОСНОВІ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS*

Л.А. Сафронова., А.І. Осадча, В.М Іляш, В.О. Приходько

Дослідження аеросилу для створення комплексних пробіотиків на основі бактерій роду Bacillus. − Л.А. Сафронова, А.І. Осадча, В.М Іляш, В.О. Приходько. *– Вивчали вплив аеросилу А-300 на ріст та біологічну активність пробіотичних штамів Bacillus subtilis, деяких представників індигенної мікрофлори кишечнику та ентеропатогенних E.coli в умовах глибинного культивування. Отримані дані свідчать про позитивний вплив аеросилу на пробіотичні штами бацил, представників кишкової нормофлори та інгибуючу дію високодисперсного кремнезему щодо ростової активності ентеропатогенних штамів кишкової палички. Проведені дослідження показали перспективність використання даного сорбенту для створення комплексних пробіотичних препаратів.*

Ключові слова: *аеросил, Bacillus subtilis, пробіотики, ростова активність, індигенна мікрофлора, E.coli.*

Адреса*: Інститут мікробіології і вірусології НАН України, вул. академіка Заболотного, 154, Київ ГСП, Д03680, Україна; E-mail: safronova_larisa@ukr.net*

Investigation of aerosil for development of complex probiotics on base of bacteria Bacillus genus. – L.A. Safronova, A.I. Osadcha, V.M. Ilyach, V.O. Pryxodko. *– Aerosil A-300 have been studied for their effect on growth and biological activity of probiotic strains Bacillus subtilis, some representatives obligatory microflora of intestines and pathogenic strains of E.coli under conditions of deep cultivation. It is shown that aerosil positively influences on probiotic strains of the family Bacillus, representatives of intestinal microflora and inhibits growth activity enteropathogenic strains of E.coli. The conducted researches have shown availability of use of the given sorbent for development complex probiotic preparations.*

Key words: *aerosil, Bacillus subtilis, probiotic, growth activity, obligatory microflora, E.coli.*

Address: *Zabolotnogo Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine , 154, Zabolotni str., Kyiv, Д03680, Ukraine; E-mail: safronova_larisa@ukr.net*

Вступ

Сьогодні в усьому світі активно вирішується проблема створення нових більш досконалих і ефективних пробіотиків.

В останні роки розроблено ряд препаратів сорбційної дії на основі високодисперсного пірогенного кремнезему - аеросилу А-300, які мають високу ефективність при застосуванні їх у тваринництві та птахівництві [4,16]. Одним з таких препаратів є сорбопром, створений на основі молочнокислих бактерій і аеросилу А-300 для лікування дисбактеріозів телят [8]. Нова технологія за рахунок вибору сорбенту дозволила отримати більш досконалий комплексний пробіотик з високою життєздатністю мікроорганізмів, що входять до його складу.

Крім того, аеросил характеризуючись гідрофільністю, може зв'язувати вільну воду, що дозволяє запобігати злипанню та злежуванню сухої біомаси бактеріальних клітин і збільшувати термін збереження готового препарату [4, 6].

Показана висока ефективність полісорбу- препарату, отриманого з аеросилу, при лікуванні дітей з важкими формами кишкового токсикозу. Сорбент нейтралізує велику кількість патогенних ентеробактерій, гальмує їхню адгезію до слизової кишечнику, сорбує мікробні токсини та виявляє високий антиоксидантний ефект, сприяючи більш швидкій корекції показників перекисного окислювання ліпідів [9]. Властивість аеросилу швидко і міцно приєднувати на свою поверхню білки робить його унікальним серед сорбентів [5]. Аеросил А-300 не виявляє прямої антибактеріальної дії, але здатний незворотне зв'язувати величезну кількість мікроорганізмів, адсорбувати фактори їх росту і розмноження, мікробні екзотоксини, а також істотно обмежувати прояв патогенних властивостей мікроорганізмами [6]. Навіть невеликі дози кремнезему (50 -100 мг/кг), введені перорально в макроорганізм, зв'язують практично всі ентеропатогенні кишкові палички, золотистий стафілокок, вульгарний протей, синегнійну паличку [13].

Властивість високодисперсних кремнеземів (ВДК) адсорбувати мікроорганізми будь-яких видів пояснюють тим, що на їх поверхні завжди існують білкові субстанції. В залежності від умов максимальна сорбція білку на ВДК досягає 300-1100 мг/г (6,15). У Вінницькому державному медичному університеті розроблені препарати на основі ВДК високоефективні при лікуванні гнійних ран, гострих кишкових інфекцій, атеросклерозу та інших захворювань [5, 13].

Даних про взаємодію бактерій з високодисперсними кремнеземами поки що небагато. Однак встановлено, що диоксид кремнія істотно стимулює ростову активність та продукцію біологічно активних речовин деяких видів бактерій [3 ,7 ,11].

Метою даної роботи було вивчення впливу аеросилу А-300 на ріст та біологічну активність пробіотичних штамів *Bacillus subtilis*, деяких представників індигенної мікрофлори кишечнику та ентеропатогенні *E.coli* для з'ясування можливості створення ефективного комплексного препарату на основі бацил та високодисперсного пірогенного кремнезему.

Матеріали і методи

В роботі використовували штами бактерій *Bacillus subtilis* 39 і 51 з колекції живих культур ІМВ НАН України, що є основою пробіотику ендоспорину (14), культури молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* (*L. plantarum* 49, *L. fermentum* 71)- представники індигенної мікрофлори кишечнику та ентеропатогенні штами бактерій *E.coli* 8*K* і 12*K*.

Бактерії вирощували в глибинних умовах при 37°С впродовж 24 год на наступних середовищах: *B. subtilis* і *E. coli* - на синтетичному середовищі, що включає як джерело вуглецю глюкозу, молочнокислі бактерії - на середовищі МРС і оптимізованому синтетичному середовищі [10].

В роботі використовували як сорбент аеросил А-300, який є високодисперсним порошком диоксиду кремнію з розміром часток від 4 до 40 нм з високою сорбційною активністю, що вносили в середовища для культивування в концентрації від 0,05 до 3,0 %.

Вихідна концентрація клітин бактерій складала 10^6-10^7 КУО/ мл. Кількість життєздатних клітин у культуральній рідині визначали шляхом висіву відповідних розведень суспензії на МПА - для *B. subtilis* і *E. coli* і лактобакагар - для бактерій роду *Lactobacillus* з наступним підрахунком кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 мл середовища.

Кислотоутворення культур визначали титрометричним методом та виражали його в градусах Тернера (°Т), рН середовища – потенціометричним методом.

Вплив аеросилу на ростову активність бактеріальних культур оцінювали за допомогою показнику відносного приросту чисельності мікроорганізмів за добовий період їх росту (Y) [1]:

$Y= N_{24}/N_0$, (де N_0 і N_{24} - вихідна і кінцева (через 24 год росту) концентрації клітин мікроорганізму), а також показнику стимуляції (індекс стимуляції - ІС):

$ІС = Y_{досл.} / Y_{контр.}$, де $Y_{досл.}$ і $Y_{контр.}$- відносний приріст чисельності бактерій в досліді та контролі (без аеросилу) відповідно. ІС у контрольному середовищі приймали за одиницю.

Антагоністичну активність, що виявляється в затримці росту тест-культур (*Staphylococcus aureus* 209, *Salmonella typhi* 11, *Shigella flexneri* 36/39, *Escherichia coli* 028, *Proteus vulgaris U*-8 *і* 72, *Candida albicans* 690 *і Pseudomonas aeruginosa* 4141), досліджували загальноприйнятим методом відстроченого антагонізму на твердому живильному середовищі Гаузе-2. Для визначення антимікробної дії досліджуваних штамів бактерій роду *Lactobacillus* використовували метод агарових блоків .

Досліди проводили в трьох повторностях. Результати статистично обробляли, використовуючи комп'ютерну програму Microsoft Exsel 97.

Результати дослідження та їх обговорення

Першочерговою задачею наших досліджень було вивчення впливу аеросилу А-300 на ріст бактерій *B. subtilis*, основи пробіотика ендоспорину, при культивуванні їх у глибинних умовах (табл. 1).

Таблиця 1.Залежність ростових показників штамів бактерій *Bacillus subtilis* від концентрації аеросилу в середовищі

Концентрація аеросилу в середовищі, %	*B. subtilis* 39		*B. subtilis* 51	
	Індекс стимуляції (ІС)**	рН	Індекс стимуляції (ІС)	рН
0,05	0,65±0,11	7,0	0,26±0,05	6,2
0,1	0,91±0,07	6,95	0,70±0,03	6,4
0,3	1,53±0,41	6,75	0,95±0,07	5,9
0,5	1,85±0,71	6,8	1,33±0,14	6,0
1,0	1,70±0,53	7,0	1,0±0,10	6,0
3,0	0,50±0,10	7,4	0,50±0,15	6,8
Середовище без аеросилу (К) *	1,0	7,2	1,0	7,2

* - контрольне синтетичне середовище з глюкозою.

** - $ІС = Y_{досл.} / Y_{контр.}$, де $Y_{досл.}$ і $Y_{контр.}$- відносний приріст чисельності бактерій в досліді та контролі .

Отримані результати показали, що найбільш оптимальною для росту бактерій концентрацією аеросилу в середовищі є 0,5 %. За 24 год росту кількість бактеріальних клітин збільшилася і склала 1,8-3,2·109 КУО/мл (табл. 2).

Таблиця 2. Вплив аеросилу (0,5%) на ріст бактерій *Bacillus subtilis* (через 24 год. росту)

Середовище культивування	*B. subtilis* 39			*B. subtilis* 51		
	Кількість живих клітин, КУО/ мл	Відносний приріст чисельності клітин (Y) *	pH середовища	Кількість живих клітин, КУО/ мл	Відносний приріст чисельності клітин (Y)	pH середовища
Середовище з аеросилом (0,5%)	3,2±0,61*10^9	152,8±27	6,8±0,2	1,78±0,15*10^9	148,3±12,5	6,0
Середовище без аеросилу (К)	2,88±0,55*10^9	137,1±25	7,2±0,2	1,49±0,31*10^9	124,2±20	7,2

- - $Y= N_{24}/N_0$, де N_0 і N_{24} - вихідна і кінцева (через 24 год росту) концентрації клітин мікроорганізму
-

Відносний приріст чисельності клітин, за яким ми оцінювали дію аеросилу на ріст, склав у *B. subtilis* 39 152,8±27, що на 11% вище показників контролю, тобто без внесення аеросилу. Аналогічну картину спостерігали у *B. subtilis* 51 - відносний приріст клітин (148,3 ±12,5) на дослідному середовищі (з аеросилом) перевищував на 19% дані контролю.

І якщо прийняти індекс стимуляції росту бактерій на середовищі без сорбенту за одиницю, то при оптимальній концентрації внесеного в середовище аеросилу (0,5%) він виявився максимальним і склав 1,85± 0,71 для *B. subtilis* 39 і 1,33± 0,14 – для *B. subtilis* 51. При збільшенні ж дози сорбенту в середовищі до 1% ростова активність бактерій практично не змінювалася, але при концентрації його вище 1% - різко знижувалася.

При використанні препаратів з живих мікроорганізмів для лікування дисбактеріозів головне їх призначення щодо відновлення складу мікрофлори кишечнику виконується тією незначною частиною клітин бактерій, яка зосереджена на його слизовій оболонці [15]. Як правило, при внесенні у кишечник ліофільно висушених пробіотичних препаратів тільки 10% бактеріальних клітин прикріплюється на його поверхні, колонізуючи слизову оболонку [12] . Решта кількість клітин виводиться зовні. Тому одне з основних завдань, яке виникає при розробці ефективних пробіотиків є досягнення максимальної кількості живих клітин в 1 дозі готового препарату. Встановлена пряма залежність між числом мікробних клітин бацил, які потрапляють до організму,та ступенем їх адгезії до слизової оболонки кишечнику.

Отримані нами результати дозволили зробити висновок про біосумісність пробіотичних штамів *B. subtilis* та аеросилу А-300. Тому на нашу думку диоксид кремнію є перспективним сорбентом для створення ефективних комплексних препаратів на основі аеробних спороутворюючих бактерій. Аеросил характеризується здатністю сорбувати шкідливі токсичні речовини, а також сприяє підвищенню життєздатності корисних для організму бактерій і перерозподілу останніх з хімуса до слизової оболонки. Створення таких комплексних препаратів для корекції порушень мікробіоценозу кишечнику є сьогодні дуже важливим і актуальним питанням. У комбінованому препараті, який буде включати і пробіотик і сорбент, досить значна частина клітин бактерій може адсорбуватися на сорбенті, утворюючи більшу площу дотику зі слизовою оболонкою, і таким чином підсилювати колонізаційну резистентність останньої.

Дослідження антагоністичної активності пробіотичних штамів бацил показало, що їх здатність пригнічувати розвиток умовно патогенної мікрофлори стабільно зберігається і після контакту з аеросилом (табл. 3).

Цікаво було також дослідити, як впливає аеросил на ріст і фізіологічну активність деяких представників індигенної мікрофлори кишечнику.

Встановлено, що штами молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* інтенсивно росли і накопичували біомасу на поживному середовищі, в яке вносили аэросил у концентрації 0,5% (табл. 4). При цьому концентрація життєздатних клітин бактерій перевищувала на 6,4-30,8%, в залежності від штаму молочнокислих бактерій, аналогічний показник на контрольних середовищах. Кислотоутворення та антимікробна активність культур, вирощених на середовищах з аеросилом, були на рівні контрольних показників (табл. 4, 5).

Таблиця 3. Антагоністична активність бактерій *Bacillus subtilis*, що культивувалися на середовищі з аеросилом

Штам бактерій	Зони затримки росту тест-культур, в мм						
	Staphylococcus aureus 209	*Salmonella typhimurium* 11	*Escherichia coli* 028	*Proteus vulgaris* U-8	*Proteus vulgaris* 72	*Candida albicans* 690	*Pseudomonas aeruginosa* 4141
Середовище з аеросилом							
B. subtilis 39	21	19	18	23	23	26	1
B. subtilis 51	13	10	12	25	25	27	13
Середовище без аеросилу (контроль)							
B. subtilis 39	20	17	16	21	22	>25	0
B. subtilis 51	15	9	11	23	22	>25	11

Таблиця 4. Вплив аеросилу на ріст і кислотоутворення молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* (через 24 год. росту)

Середовище культивування	Концентрація аеросилу в середовищі, %	*Lactobacillus fermentum 71*				*Lactobacillus plantarum 49*			
		Кількість живих клітин		Кислотоутворення, T^0	pH середовища	Кількість живих клітин		Кислотоутворення, T^0	pH середовища
		КУО/мл	% від контролю			КУО/мл	% від контролю		
МРС (контроль)	-	$1{,}3\pm0{,}07 \cdot 10^8$	100	105±20	4,2	$3{,}1\pm0{,}30 \cdot 10^9$	100	160±17	3,7-5,1
МРС+ аеросил	0,5	$1{,}7\pm0{,}11 \cdot 10^8$	130,8	110±30	4,6	$3{,}3\pm0{,}09 \cdot 10^9$	106,4	145±20	4,0-4,2

Таблиця 5. Порівняння антагоністичної активності молочнокислих бактерій при вирощуванні на середовищах з додаванням аеросилу та контрольному

Штам бактерій	Середовище культивування	Зони затримки росту тест-культур, в мм								
		Staphylococcus aureus 209	*Salmonella typhimurium* 11	*Shigella flexneri* 36/39	*Escherichia coli* 028	*Proteus vulgaris* U-8	*Proteus vulgaris* 72	*Candida albicans* 690	*Pseudomonas aeruginosa* 4141	*Pseudomonas aeruginosa* 20
Lactobacillus fermentum 71	Середовище без аеросилу	14	18	21	19	23	24	0	21	-
	Середовище з аеросилом	15	20	25	17	24	26	2	23	-
Lactobacillus plantarum 49	Середовище без аеросилу	22	24	21	-	18	19	1	23	30
	Середовище з аеросилом	20	22	21	4	15	17	0	22	27

Внесення аеросилу в середовище для культивування ентеропатогенної кишкової палички сприяло зниженню титру життєздатних клітин бактерій на 50,5-58,1 % відповідно для штамів E. coli 8K та 12K у порівнянні з контрольним середовищем (табл. 6).

Таблиця 6. Вплив аеросилу на ростові показники штамів *Escherichia coli*

Середовище культивування	*E. coli* 8K			*E. coli* 12K		
	Кількість живих клітин, КУО/мл	% від контролю	pH	Кількість живих клітин, КУО/мл	% від контролю	pH
З аеросилом, (0,5 %)	$5{,}1\pm0{,}21*10^9$	50,5	4,2-4,5	$4{,}5\pm0{,}32*10^9$	58,1	4,0-4,2
Без аеросилу	$1{,}01\pm0{,}9*10^9$	100	6,2-6,3	$7{,}75\pm0{,}53*10^9$	100	6,1-6,3

Деякі автори вважають, що підвищення фізіологічної активності мікроорганізмів на середовищах з високодисперсними кремнеземами обумовлено контактною взаємодією між ними, заснованою на розходженні їх електрокінетичних властивостей [17]. Встановлено, що заряд поверхні клітин формується за рахунок кислотних або основних груп і варіює в залежності від видової належності, а також від фази росту, складу середовища та умов культивування [2]. Поверхня мікробних клітин, як і багатьох сорбентів, несе негативний електрокінетичний заряд, що перешкоджає їх зближенню. У середовищах, що характеризуються лужною або нейтральною реакцією, взаємодія мікроорганізмів з твердими матеріалами нерідко ускладнена через виникнення високого енергетичного бар'єру [6].

Деякі дослідники показали, що при зсуві pH середовища в кислу сторону знижується величина заряду поверхні бактерій, а негативний заряд поверхні часток диоксиду кремнію зростає, що супроводжується посиленням взаємодії клітин з твердими матеріалами [18].

В процесі культивування бактерій *B. subtilis* на середовищі з аеросилом спостерігали тенденцію до зміни pH у кислу область: у середньому до 6,8 у випадку штаму 39 і до 6,0 у штаму 51 (початкове pH 7,2). Можливо, в даному випадку зниження pH сприяє посиленню сорбційної взаємодії клітин з діоксидом кремнію та стимуляції ростової активності штамів бацил.

При вирощуванні штамів молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* спостерігається помітне зниження pH , тому контакт клітин з аеросилом може бути більш значним (див. табл.4).

Як відомо, на відміну від бацил, які характеризуються слабкими адгезивними властивостями, конкурентну роль за місце прикріплення до епітелію слизової оболонки кишечнику і утворення на ній біоплівки виконують головним чином біфідобактерії, лактобактерії і деякі ентеробактерії, яким в імобілізованому стані притаманна висока колонізаційна здатність. Можна припустити, що роль аеросилу як сорбенту при цьому є більш вагома, ніж для бацил.

Висновки

Отримані дані свідчать про позитивний вплив аеросилу на пробіотичні штами бацил, представників індигенної мікрофлори кишечнику та інгибуючу дію високодисперсного кремнезему щодо ростової активності ентеропатогенних штамів кишкової палички. Таким чином, проведені дослідження показали перспективність аеросилу для створення комплексних препаратів на основі досліджуваних штамів *B. subtilis.*

1. Вахитов Т.Я., Яшина О.Ю., Петров Л.Н., Королюк А.М. Действие препарата аутостимуляторов роста Escherichia coli M-17 (актофлор) на рост чистых и смешанных культур бактерий // Журн. микробиол.-2000.- №3.-С.20-24.
2. Гордиенко А.С., Титова Л.В., Курдиш И.К. Электрокинетические свойства некоторых азотфиксирующих бактерий // Микробиол. журн.-1996.-58, №2.-С.22-28.
3. Курдиш И.К., Кигель Н.Ф. Влияние высодисперсных материалов на физиологическую активность метанотрофных бактерий // Микроб. журн. –1997.-59, № 2.- С.29-36.
4. Ли В. Филакс – мощная защита от плесени и микотоксинов // Животновод. России.-2003.- №5.-С.24-25.
5. Луцюк М.Б., Тертишна О.В. Використання високодисперсного кремнезему (ВДК) та його похідних в медичних лабораторних дослідженнях та біотехнології // Вчені Поділля, ч.2 (Фунд. наук. праці) : Мат. Респ. наук.-практич. конф., присвяч. 55-річчю визволення Укр. від фашист. загарб. Хмельн. Вінниця. 1999, С.135-138.
6. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / А.А. Чуйко, В.К. Погорелый, А.А. Пентюк и др. / НАН
7. Осадчая А.И., Подгорский В.С., Михновская Н.Д. и др. Влияние модифицированных пирогенных кремнеземов на рост и развитие продуцента бактокулицида // Биотехнология .-1991.- № 4.-С.31-35.

8. Петренчук Е.П. Розробка нової технології отримання сухого комплексного пробіотика. Дис. на здобуття вч.ступеня канд.ветер.наук. Х.,1998.
9. Пипа Л.В. Клініко-метаболічні порушення при кишкових токсикозах у грудних дітей та їх корекція ентеросорбентом – полісорбом. . Автореф. дис. на здобуття вч.ступеня к.м.н. К.,1994.
10. Сорокулова И.Б., Осадчая А.И., Хилько Т.В. Разработка питательной среды для культивирования Lactobacillus plantarum 8R-A3// Микробиол. журн.-2003.-65, №3.-С. 39-46.
11. Титова Л.В., Антипчук А.Ф., Курдиш И.К. и др. Влияние высодисперсных материалов на физиологическую активность бактерий рода Azotobacter // Микроб. журн. –1994.-56, № 3.- С.60-65.
12. Фурзикова Т.М., Сергейчук М.Г., Сорокулова И.Б., Смирнов В,В. Влияние условий культивирования на некоторые свойства бацилл, составляющих основу пробиотиков//Микробиол.журн.-1999.- №5.-С.19-27.
13. Штатько О.І. Експериментальне обгрунтування використання полісорбу як засобу лікування гострих кишкових інфекцій та вірусних гепатитів. Автореф. дис. на здобуття вч. ступеня к.м.н. К.,1993, 22 с.
14. Пат 14569 Україна. Біопрепарат ендоспорин для лікування і профілактики ендометритів тварин. / Смірнов В.В., Кудрявцев В.О., Осадча А.І., Калиновський Г.М., Сафронова Л.А., Резник С.Р. Опубл.20.01.97 р.
15. Пат. України 32145 А 61 К 31/00. Спосіб одержання комплексного пробіотичного бактерійного препарату / Жалко-Титаренко В.П. Опубл. Бюл. № 7, 15.12.2000 р.
16. Пат. 2252956 РФ, МПК[7] С12 N1/20, А 23К 1/165 / Пробиотическая добавка и способ ее получения / Кулаков Г.В., Михайлов В.В., Колосков А.В. Опубл. 27.05.05. Бюл. №15.
17. Harwood J.H., Pirt S.J. Quantitative aspect of growth of the methane – oxidizing bacterium Methylococcus capsulatus on methane in shake flask and continuous chemostate culture // J.Appl. Bacteriol.-1972.-55, №2.-P.597-607.
18.Iske U., Hubner K., Herold W. Investigation of the connection between the electrophoretic mobility (EFM) of microorganisms and their capability of metal uptake // Acta biotechnol. -1990.-10, № 6.-P.541-549.

Отримано: 10 жовтня 2007 р.
Прийнято до друку: 27 листопада 2007 р.