



УДК: 579

Адсорбция пробиотических бактерий на целлюлозных сорбентах

Ларионов И.В., Рыбальченко О.В., Орлова О.Г., Потокин И.Л.,
Сушко Т.П., Хрущева Т.А., Болдырев А.Г.

Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов
Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Бондаренко В.М.

Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

Поступила в редакцию 20.05.2011 г.

Аннотация

Исследован процесс иммобилизации микроорганизмов на сорбентах из регенерированной целлюлозы. Продемонстрирована высокая эффективность адсорбционной иммобилизации клеток на гранулах сорбента. Выбран и обоснован тип сорбентов наиболее подходящий для иммобилизации пробиотических бактерий. Оценена зависимость емкости этого сорбента в отношении бактериальных клеток от его полной обменной емкости. Отмечено различие в сорбции физиологически активных и анабиозных бактериальных клеток и интерпретированы особенности механизмов сорбции первых и вторых.

Ключевые слова: адсорбция бактерий, целлюлозный сорбент, *Lactobacillus plantarum* 8PA-3

The process of immobilization of probiotic lactic acid bacteria on sorbents from regenerated cellulose was studied. A high efficiency of lactobacilli cell immobilization on the sorbent granules was demonstrated. The type of sorbent most suitable for immobilization was selected and substantiated. The relationship between an adsorption capacity and a full exchange capacity of the sorbent was evaluated in respect to lactobacilli cells. Distinctions in adsorption were noted between physiologically-active and inactive bacterial cells. Special features of the sorption mechanisms for physiologically-active and inactive bacterial cells were interpreted.

Keywords: adsorption of bacteria, anionic, cationic, *Lactobacillus plantarum* 8PA-3, cellulose sorbents

Введение

Известно, что наиболее эффективным и специфичным методом работы со сложными биологическими молекулами является хроматография [1]. В области биотехнологии существует целый ряд других технологий, также использующих явление адсорбции. К ним относятся: концентрирование, получение разнообразных иммобилизаторов. Вместе с тем в литературе, мы не встретили обобщение этого подхода на уровень микроорганизмов.

Бактериальные клетки – это многокомпонентные, полифункциональные живые системы. В настоящее время достаточно хорошо изучены их состав, структура и функциональные особенности [2]. При этом, до конца неясным остаются механизмы поддержания и регуляции заряда на поверхности клеточной стенки. Ряд авторов утверждает, что поверхностный заряд клетки обусловлен химическим составом её клеточной стенки.

Наличие и величина зарядов играют главенствующую роль во взаимодействии клетка – сорбент, а природа адсорбционных сил таких взаимодействий определяется в первую очередь химическим составом клеточных стенок бактерий и функциональными группами самих сорбентов.

Известно, что и грамположительные, бактерии несут на своей поверхности отрицательный заряд. Отрицательный заряд клеточной поверхности обуславливается анионными полимерами клеточных стенок. Это, в первую очередь, относится к пептидогликану (ПГ) – макрополимеру. Отрицательный заряд ПГ формируют карбоксильные группы γ -глутаминовой и мезо-диаминопимелиновой кислот, а также терминальные остатки D-Ala пептидных субъединиц. Значительный вклад в формирование структуры полиэлектролитного геля клеточной стенки вносят тейхоевые кислоты (ТК) и липотейхоевые кислоты (ЛТК), а также другие анионные соединения, такие как тейхуроновые кислоты и сахар-1-фосфатные полимеры [3].

Эксперимент

В качестве объектов исследования были выбраны пробиотические микроорганизмы *Lactobacillus plantarum* 8PA-3 – неспорообразующие, неподвижные грамположительные палочки [4]. Количество клеток определяли высевом на плотные питательные среды (чашечный метод Коха). Метод широко применяют для определения численности жизнеспособных клеток в различных естественных субстратах и в лабораторных культурах. В его основе лежит принцип Коха, согласно которому каждая колония является потомством одной клетки. Это позволяет на основании числа колоний, выросших после посева на плотную питательную среду определенного объема исследуемой суспензии, судить об исходном содержании в ней клеток микроорганизмов. Результаты количественного учета микроорганизмов, проведенного методом Коха, выражали в условных единицах — так называемых колониобразующих единицах (КОЕ) на миллилитр суспензии (КОЕ/мл) [5].

Для иммобилизации бактериальных клеток использовали макропористые сорбенты

класса Сфероцелл (сферические гранулы)[6,7], которые в основе своей представляют полимерную матрицу из регенерированной целлюлозы. Большое количество ОН⁻ групп с одной стороны, придаёт материалу высокую гидрофильность, обеспечивая биосовместимость и низкий уровень неспецифической адсорбции, с другой даёт возможность модификации матрицы функциональными группами с высокой плотностью, обеспечивая тем самым исключительно высокие емкостные показатели сорбентов. Сорбенты характеризовались величиной полной обменной ёмкости [1] и значением ёмкости в отношении микроорганизмов.

Для наглядного подтверждения иммобилизации клеток на поверхности сорбента, анализа распределения клеток по его поверхности, а также для оценки морфологического состояния клеток в иммобилизованном состоянии в данной работе применялась сканирующая и трансмиссионная электронные микроскопии.

Для иммобилизации лактобацилл было выбрано три типа сорбентов (фракция 100-300 мкм):

- нейтральная, неполярная целлюлозная матрица Сфероцелл
- Сфероцелл ДЭАЭ (диэтиламиноэтил) - анионит
- Сфероцелл КМ (карбоксиметил)- катионит

Иммобилизация покоящихся (т.е. физиологически не активных и не несущих нативного заряда) клеток.

В пенициллиновые флаконы с сублимационно высушенной культурой клеток *L. plantarum*, добавляли расчетное количество стерильной дистиллированной воды, так чтобы концентрация культуры составляла $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл и помещали в термостат. При $t=37^{\circ}\text{C}$ выдерживали 30 минут, для регидратирования и активации клеток.

Далее в полученные водные суспензии клеток добавляли по 1 мл влажного сорбента (сухой вес 0,05 г.) :

- Сфероцелл
- Сфероцелл КМ ПОЕ=0,1 мг-экв/мл
- Сфероцелл ДЕАЕ ПОЕ= 0,1 мг-экв/мл

После смешения сразу отбирали из каждой пробирки по 0.1 мл (контроль КОЕ/мл). Время иммобилизации 1 час 30 минут. Каждые 15 минут проводили перемешивание при встряхивании. После иммобилизации пипеткой отделяли супернатант от сорбента, определяли КОЕ/мл и проводили электронномикроскопическое исследование иммобилизатов.

Иммобилизация физиологически активных клеток.

Проводили по выше изложенной схеме, с той лишь разницей, что вместо регидротированной сублимационно высушенной культуры клеток *L. plantarum* использовали суточную, физиологически активную культуру с известным КОЕ/мл.

Оценку эффективности иммобилизации, состояние и морфологию клеток в иммобилизованном виде проводили так же с использованием электронной микроскопии.

Оценка роста клеток в присутствии сорбента.

Рост микроорганизмов является автокаталитическим процессом, регуляция которого, при нормальных условиях культивирования (температура, давление), зависит от наличия питательных веществ и продуктов метаболизма. Так, накопление метаболитов в среде и убыль питательных веществ ингибируют рост культуры клеток.

Логической предпосылкой данного эксперимента стало предположение о связывании метаболитов сорбентами. При этом полагали, что в результате уменьшения концентрации метаболитов, должно увеличиваться время экспоненциальной и линейной фаз роста, и как следствие скорость и конечный выход биомассы.

При оценке влияния сорбентов Сфероцелл на рост пробиотической культуры, клетки *L. plantarum* выращивали на МРС бульоне в присутствии сорбента Сфероцелл КМ или Сфероцелл ДЭАЭ и контроль без сорбента.

Динамику роста культуры оценивали культуральным методом (высев аликвот культуральной жидкости на плотную питательную среду МРС-5).

Обсуждение результатов

В результате проведённых экспериментов установлено:

1. наиболее эффективным носителем для иммобилизации клеток *L. plantarum* 8PA-3 является анионит; ёмкость сорбента по культуре составляет $\sim 0,99 \cdot 10^9$ КОЕ/мл сорбента при равновесной концентрации клеток в культуральной среде $1 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, т.е. $K_p \sim 100!$

2. между полной обменной ёмкостью (ПОЕ) и величиной логарифма ёмкости сорбента (анионита) в отношении культуры клеток *L. plantarum* 8PA-3 (\lg КОЕ/мл) существует линейная зависимость (рис. 1);

3. выход биомассы в случае культивирования с сорбентом Сфероцелл ДЭАЭ по сравнению с контролем был в 5 раз выше и составил $4 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, а при культивировании клеток в присутствии сорбента Сфероцелл КМ, напротив, конечный выход биомассы уменьшился на порядок $2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл (рис.2)

4. по данным электронной микроскопии сорбция клеток на катионите на 4 порядка ниже, чем на анионите, что свидетельствует о том, что в данном случае адсорбированные клетки не поддерживают нативный отрицательный заряд, т.е. фактически находятся в физиологически неактивном состоянии.

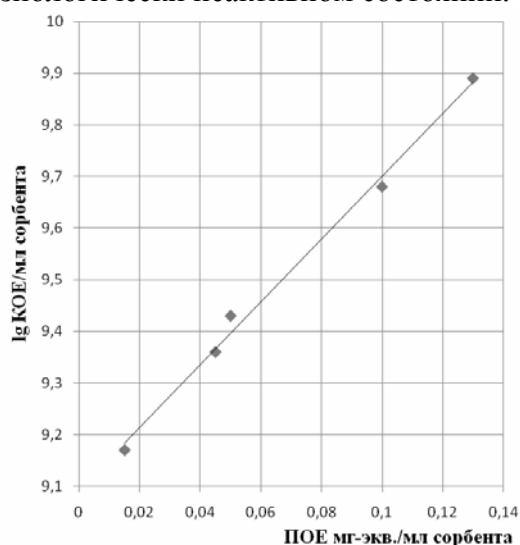


Рис. 1. Зависимость ёмкости сорбента Сфероцелл ДЭАЭ в отношении культуры клеток *L. plantarum* 8PA-3 (ЕСКК) от его полной обменной ёмкости (ПОЕ)

Полученные данные свидетельствуют о том, что природа адсорбционных сил в основном обусловлена кулоновским взаимодействием между компонентами системы. При этом, в случае анионита (« + » заряд на полимере) сорбируются как физиологически активные несущие « - » заряд, так и покоящиеся клетки.

В случае катионита (« - » заряд на сорбенте) живые клетки, несущие нативный отрицательный заряд, не адсорбируются вовсе, а происходит адсорбция только покоящихся клеток, в результате их поляризации под действием электростатического поля сорбента.

Данные электроно-микроскопического исследования позволили не только подтвердить факт адсорбции бактериальных клеток на поверхности анионита (рис.3, 4), но и установить то, что клетки действительно находятся в физиологически активном состоянии, на что указывает наличие делящихся клеток, гомогенная структура цитоплазмы и сохранность всех слоев клеточной стенки (рис. 5, 6).

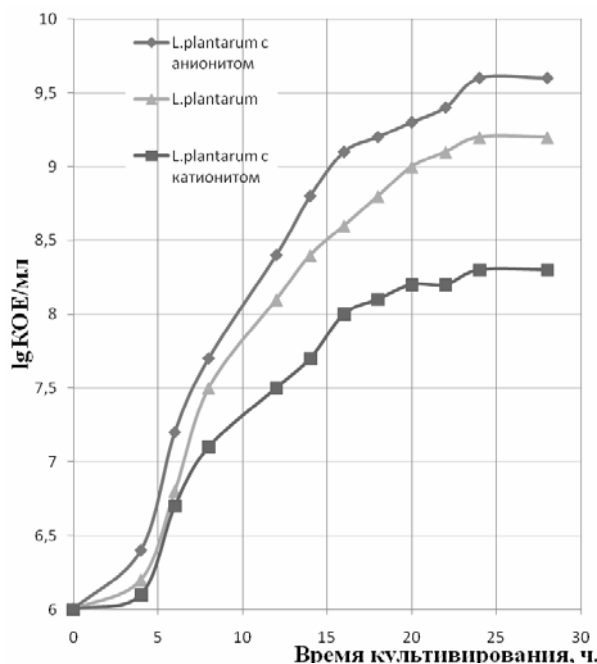


Рис. 2 Динамика роста пробиотических бактерий *L. plantarum* 8PA-3 в норме (контроль), и в присутствии целлюлозных сорбентов ионообменной природы

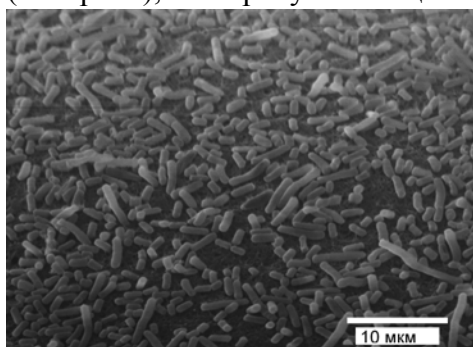


Рис.3 СЭМ поверхность глобулы сорбента Сфероцелл – ДЭАЭ (ПОЕ = 0,1 мг-экв/мл) с иммобилизованными клетками *L. plantarum* 8PA-3 (Рыбальченко О.В., Потокин И.Л.)

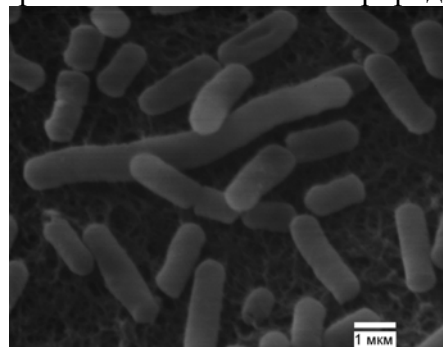


Рис.4 СЭМ поверхность глобулы сорбента Сфероцелл – ДЭАЭ (ПОЕ = 0,1 мг-экв/мл) с иммобилизованными клетками *L. plantarum* 8PA-3 (Рыбальченко О.В., Потокин И.Л.)



Рис.5 Ультратонкий срез клеток *L. plantarum* 8PA-3 на сорбенте Сфероцелл – ДЭАЭ с ПОЕ=0,1 мг-экв/мл. (Рыбальченко О.В., Потокин И.Л.)

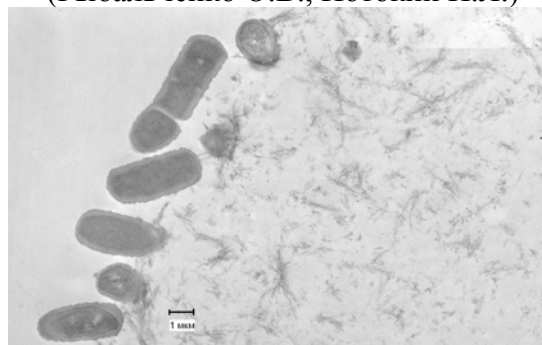


Рис. 6 Ультратонкий срез клеток *L. plantarum* 8PA-3 на сорбенте Сфероцелл – ДЭАЭ с ПОЕ=0,1 мг-экв/мл. (Рыбальченко О.В., Потокин И.Л.)

Заключение

Таким образом, в системе культура клеток – сорбент, в значительной мере имеют место взаимодействия такие же, как для классических систем сорбат – сорбент.

Основным компонентом взаимодействия является кулоновское.

Именно это взаимодействие обуславливает иммобилизацию культур на гранулах сорбента и связывание (адсорбцию) метаболитов в объеме зерен сорбента.

Иммобилизация имеет следствием существенное концентрирование культуры.

В отношении метаболитов сорбент выступает в качестве буферной ёмкости, это обстоятельство способствует как существенному увеличению выхода метаболитов так и собственно биомассы клеток.

В качестве «хроматографической аналогии» следует указать возможность фракционирования клеток на физиологически активные и не физиологически активные, при сорбции на анионитах и катионитах соответственно, а в качестве сорбционной аналогии с молекулярными системами способность сорбатов бактериальной природы к возникновению многослойной адсорбции - образованию слоёв Штерна [8] (рис.7).

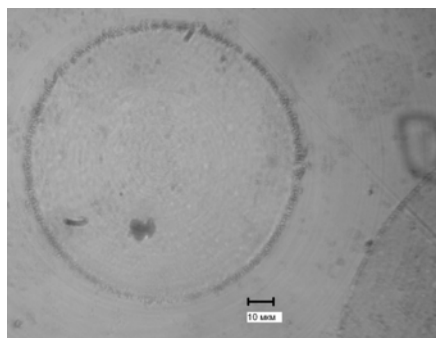


Рис. 7. Полутонкий срез гранулы сорбента с иммобилизованными клетками (визуализованы два слоя Штерна)

Список литературы

1. Самсонов Г.В., Меленевский А.Т. Сорбционные и хроматографические методы физико-химической биотехнологии. – Л.: Изд. Наука, 1986. – 229 с.
2. Бондаренко В.М., Грачева Н.М. Препараты пробиотики, пребиотики и синбиотики в терапии и профилактике кишечных дисбактериозов. Фарматека. 2003. № 7. с.56-63.
3. Потехина Н.В. Тейхоевые кислоты актиномицетов и других грамположительных бактерий. Успехи биологической химии, т. 46, 2006, с. 225–278.
4. Рыбальченко О.В., Бондаренко В.М., Добрица В.П.. Атлас ультраструктуры микробиоты человека. – СПб.: ИИЦ ВМА, 2008. – 112 с., ил.
5. Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н., Азова Л.Г. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (малый практикум). М.: изд-во Московского университета, 1971 – 75 с.
6. Получение сорбента Сфероцелл ДЭАЭ: лабораторный регламент / ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России. – СПб., 2001. – 42 с.
7. Получение сорбента Сфероцелл КМ : лабораторный регламент / ФГУП «Гос.НИИ ОЧБ» ФМБА России. – СПб., 2001. – 40 с.

8. Воюцкий С.С. Курс коллоидной химии. Изд. 2-е, перераб. и доп. М.: «Химия», 1975. – 189 с.

Ларионов Иван Владимирович – аспирант медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета, научный сотрудник Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург, (812) 4067026*2280

Рыбальченко Оксана Владимировна – д.б.н., профессор медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Орлова Ольга Геннадьевна – к.б.н., ст. преподаватель медицинского факультета Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург

Потокин Игорь Леонидович – ведущий научный сотрудник лаборатории электронной микроскопии Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург

Сушко Татьяна Павловна – науч. сотрудник Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Хрущёва Татьяна Анатольевна – вед. инженер Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Болдырев Александр Георгиевич – к.ф.м.н., научный консультант Государственного научно-исследовательского института особо чистых биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства, Санкт-Петербург

Бондаренко Виктор Михайлович – д.м.н., проф., зав. лабораторией генетики вирулентности бактерий научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи., Москва

Larionov Ivan V. – postgraduate student of the Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, scientific worker of the State Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, e-mail: Larionov_ivanvl@mail.ru

Rybalchenko Oksana V. – Sc.D., Professor of the Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, e-mail: ovr@inbox.ru

Orlova Olga G. – Ph.D., Senior Lecturer Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, e-mail: oorlova18@mail.ru

Potokin Igor L. – leading researcher at the laboratory of electron microscopy of the State Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, e-mail: pnil2008@yandex.ru

Sushko Tatyana P. – scientific worker of the State Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg

Khrushcheva Tatyana A. – lead engineer of the second category of the State Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg

Boldyrev Alexander G. – Ph.D., scientific consultant of the State Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg

Bondarenko Victor M. – MD, Professor, Head of the Laboratory of Genetics of virulence of bacteria, Research Institute of Epidemiology and Microbiology. Gamaleia, Moscow, e-mail: bvmz@yandex.ru