

DOI 10.31718/2077-1096.20.3.185

УДК 57.043:615.014.41:579

Ананьїна Г.Є., Степанюк Л.В., Висеканцев І.П., Петров І.В.

ВПЛИВ УМОВ ГІПОТЕРМІЧНОГО І НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ІММОБІЛІЗОВАНОГО ПРОБІОТИКА *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м.Харків

Актуальною проблемою медицини в наступний час є дисбіози, які виникають в зв'язку з дією на організм людини ряду негативних факторів, а також зниження імунного статусу. Пріоритетним напрямком сучасної біотехнології є створення іммобілізованих в гелевих носіях пробіотичних препаратів, що можуть використовуватися для корекції дисбіозів. Іммобілізація клітин пробіотиків в гранулах альгінатного гелю захищає їх від пошкоджуючої дії бар'єрних функцій шлунково-кишкового тракту. Мета дослідження – вивчення впливу гіпотермічного та низькотемпературного зберігання на життєздатність іммобілізованого в гранулах альгінатного гелю пробіотика *Bifidobacterium bifidum*. Бактеріальні клітини іммобілізували в гранулах немодифікованого гелю (1%-ний розчин альгінату натрію) та в гранулах модифікованого захисним сахарозо-молочно-лактозним середовищем гелю. Гранули з іммобілізованими бактеріальними клітинами розкладали в кріопробірках. Зразки зберігали при температурах 4, -12, -20, -80 та -196°C протягом 12 місяців (термін дослідження). Встановлено, що зберігання при температурах -80 та -196°C забезпечувало високу життєздатність пробіотика протягом всього терміну дослідження. В процесі зберігання при температурах 4 та -12°C загибель бактерій відзначали через 1-3 місяці в залежності від складу гелевого носія, а при температурі -20°C – через 6-9 місяців. Висновки: Встановлено, що на життєздатність клітин культури *B. bifidum*, іммобілізованих в гранулах альгінатного гелю, впливають як температурні режими зберігання, так і модифікація гелю введенням в його склад сахарозо-молочно-лактозного середовища. При температурах -80, -196 °C іммобілізовані бактерії не гинуть протягом року (термін спостереження). Під час зберігання при температурах 4, -12, -20 °C більш високі показники життєздатності і більші терміни збереженості клітин біфідобактерій спостерігали в зразках гранул альгінатного гелю, модифікованого сахарозо-молочно-лактозним середовищем. Показано, що в процесі зберігання за низьких температур клітин *B. bifidum*, іммобілізованих в немодифікованому і модифікованому доданням сахарозо-молочно-лактозного середовища альгінатному гелю, їх культуральні та морфологічні властивості не змінювалися.

Ключові слова: пробіотики, іммобілізація, гелеві гранули, гіпотермічне зберігання, низькотемпературне зберігання, сахарозо-молочно-лактозне захисне середовище, життєздатність.

Робота виконана в рамках відомчої теми НАН України «Вивчення механізмів кріопшкоджень мікроорганізмів, іммобілізованих в гелевих носіях з різними фізико-хімічними властивостями, під час низькотемпературного зберігання та ліофілізації» (№ держреєстрації 0118 У 001187).

Відомо, що у кишечнику дорослої людини міститься коло 500 видів бактерій-симбіонтів, які приймають безпосередню участь у процесі травлення. В здоровому організмі якісний і кількісний індивідуальний склад мікробіоти залишається в стані фізіологічної рівноваги – нормобіоценозу (еубіозу) [1].

В останній час значна увага приділяється проблемі дисбіозів, які виникають під дією на організм людини ряду негативних факторів таких, як використання достатньо токсичних лікарських засобів (антибіотики, хіміопрепарати), а також зниження імунного статусу та розвитку стресів різного генезу. Всі ці фактори можуть призводити до порушення рівноваги кількісного і якісного стану кишкової флори (дисбіозу), що негативно впливає на здібність кишечника до травлення та є основою клінічного прояву багатьох хвороб [1,2].

Відновлення порушеного мікробіоценозу кишечника є перспективним напрямком у комплексному лікуванні цілого ряду захворювань, що супроводжуються дисбіозом. Використання пробіотиків, дія яких обумовлена, насамперед, анта-

гоністичною активністю щодо умовно-патогенних бактерій, є одним з найбільш фізіологічних методів корекції дисбіозу [3,4].

Одним з пріоритетних напрямків сучасної біотехнології є створення препаратів іммобілізованих в гранулах альгінатного гелю клітин пробіотиків, що дозволяє захистити клітини пробіотиків від пошкоджуючої дії природних захисних бар'єрів ШКТ, транспортувати до біотопу локальні дози пробіотиків, підвищити шанси на колонізацію відповідних ділянок біотопу пробіотичними штамми [5,6]. Вплив умов гіпотермічного та низькотемпературного зберігання на життєздатність і властивості іммобілізованих в гелевих носіях пробіотиків, зокрема *Bifidobacterium bifidum*, вивчено недостатньо.

В зв'язку з цим метою даної роботи було проведено досліджень щодо визначення впливу умов гіпотермічного та низькотемпературного зберігання на життєздатність іммобілізованого в гранулах альгінатного гелю пробіотика *Bifidobacterium bifidum*.

Матеріали та методи дослідження

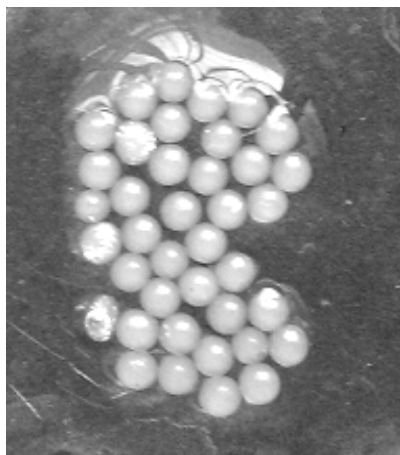
Об'єктом досліджень були бактерії *Bifidobacterium bifidum*, штам 1 (*B. bifidum*), що були отримані з ФБУН «Московський науково-дослідний інститут епідеміології і мікробіології ім. Г.Н. Габ-

річевського» Росспоживнагляду (РФ).

Культуру бактерій *B. bifidum* вирощували у напівагаровому поживному середовищі Блаурокка [7] при температурі 37°C впродовж 48 годин.

Клітини *B. bifidum* іммобілізували в альгінатному гелі методом йонотранспортного гелеутворення в модифікації [8].

Бактерії відмивали тричі фізіологічним розчином від ростового середовища шляхом центрифугування при 2000g та ресуспендували у фізіологічному розчині для отримання бактеріальної суспензії, яку змішували з 2% розчином альгінату натрію у відношенні 1:1 (немодифікований гель).



а



б

Рис. 1. Іммобілізовані клітини *B. bifidum* в гранулах немодифікованого гелю (а); іммобілізовані клітини *B. bifidum* в гранулах модифікованого середовищем СМЛ гелю (б).

Концентрація клітин біфідобактерій в гранулах альгінату натрію становила 10^9 кл/мл, а в гранулах альгінату натрію з доданням середовища СМЛ – 10^8 кл/мл.

Після іммобілізації клітин гранули розкладали по 10 шт. у кріопробірки фірми Nunc (США) з робочим об'ємом 1,0 мл і розміщали їх на довгострокове зберігання при температурах 4; -12; -20; -40; -80; -196°C. Охолодження зразків до 4°C і заморожування до -12; -20; -40 та -80°C проводили з неконтрольованими швидкостями шляхом вміщення кріопробірок у холодильні камери. Заморожування зразків до -196°C проводили безпосереднім зануренням кріопробірок до рідкого азоту.

Контролем були іммобілізовані клітини культури пробіотика *B. bifidum* в гранулах немодифікованого гелю (контроль №1) та в гранулах гелю модифікованого середовищем СМЛ (контроль №2) до зберігання.

Відігрів зразків після заморожування і зберігання при низьких температурах проводили на водяній бані при 37°C.

Гелеві гранули з іммобілізованими клітинами розчиняли в 4% розчині ЕДТА (ЕДТА- $\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Торговий Дім "Хотей", Китай) [12], для чого 10 гранул вміщали в 10 мл розчину ЕДТА. Після розчинення гранул із отриманої суспензії робили

Для іммобілізації клітин в модифікованому гелі їх суспендували у розчині компонентів сахарозо-молочно-лактозного (СМЛ) середовища [9].

Отримані суміші набирали в шприц фірми Becton Dickinson (Німеччина) з об'ємом 2 мл і діаметром голки 0,6 мм та крапали в 0,2М розчин CaCl_2 для утворення гранул, які витримували у хлориді кальцію впродовж 20 хв для їх стабілізації Са-альгінатною оболонкою [10,11].

Після стабілізації у розчині CaCl_2 гранули промивали стерильним фізіологічним розчином і підсушували на стерильному фільтрувальному папері (рис. 1).

серійні розведення на фізіологічному розчині з подальшим культивуванням в поживному середовищі Блаурокка.

Життєздатність культури *B. bifidum* визначали шляхом підрахунку макроколоній, які формувалися у напівагаровому середовищі Блаурокка після інкубування зразків при температурі 37°C протягом 48 годин (колонієутворюючі одиниці – КУО).

Зразки зберігали при температурах 4; -12; -20; -40; -80; -196°C протягом 12 місяців (термін спостереження).

Культуральні властивості *B. bifidum* визначали по візуальному спостереженню макроколоній, що сформувалися у поживному середовищі Блаурокка.

Морфологічні властивості мікробних культур пробіотиків вивчали за допомогою світлової мікроскопії мазків, що були забарвлені за Грамом.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «Excel» («Microsoft», США). Дані наводили у Іg числа КУО/мл. Відмінності, що спостерігалися, вважали статистично значущими при $p < 0,05$ [13].

Результати та обговорення

Було проведено 2 серії експериментів.

а) – зберігання клітин *B. bifidum*, що були

імобілізовані в гранулах немодифікованого гелю (варіант 1);

б) – зберігання клітин *B.bifidum*, що були імобілізовані в гранулах 1%-го гелю, модифікованого середовищем СМЛ (варіант 2).

Встановлено, що під час зберігання біфідобактерій, імобілізованих в гранулах немодифікованого гелю протягом однієї доби при 4, -12, -20°C їх життєздатність значуще знизилася з 9,52

(контроль №1) до 7,39-7,3 lg КУО/мл. Життєздатність імобілізованих біфідобактерій після зберігання протягом 1 доби при температурі -80 та -196°C залишалася на вихідному рівні.

Модифікація складу гелю середовищем СМЛ забезпечувала збереження через 1 добу кількості життєздатних клітин на вихідному рівні при всіх температурах зберігання (рис. 2).

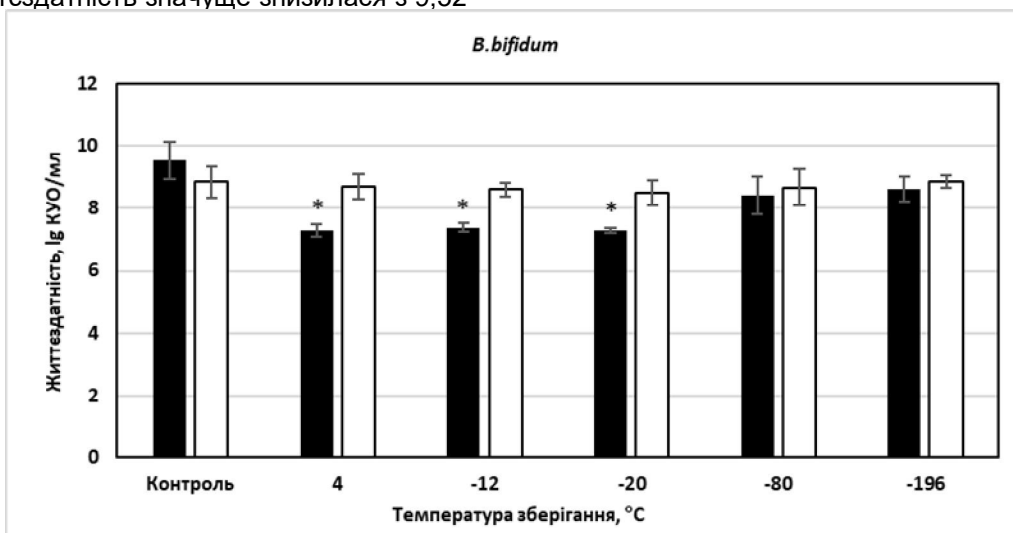


Рис. 2. Життєздатність імобілізованих клітин *B.bifidum* після зберігання за різних температур протягом 1 доби:

- – клітини біфідобактерій в гранулах немодифікованого гелю;
- – клітини біфідобактерій в гранулах модифікованого середовищем СМЛ гелю;
- * – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №1 ($p < 0,05$).

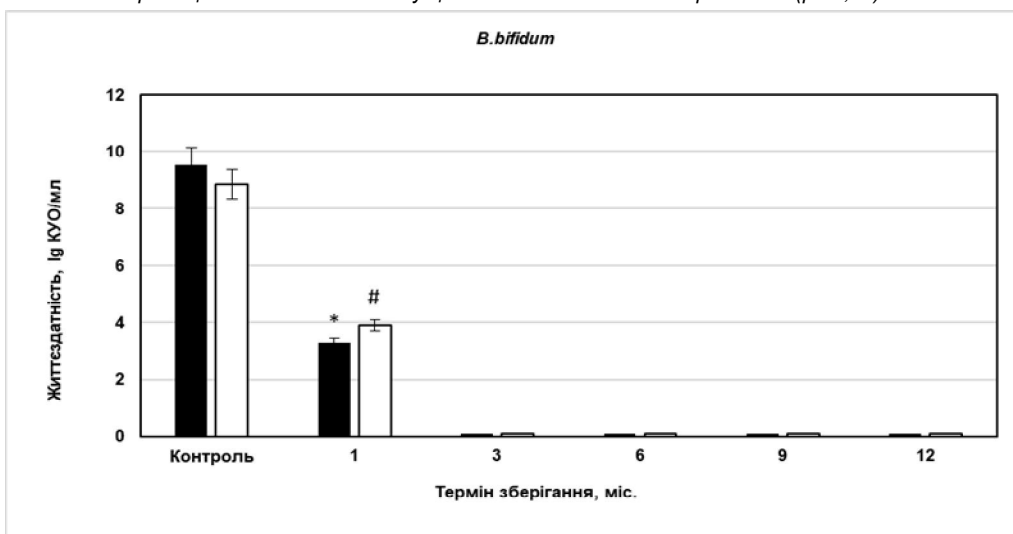


Рис. 3. Життєздатність імобілізованих клітин *B.bifidum* після зберігання при температурі 4°C:

- – клітини біфідобактерій в гранулах немодифікованого гелю;
- – клітини біфідобактерій в гранулах модифікованого середовищем СМЛ гелю; * – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №1;
- # – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №2 ($p < 0,05$)

Життєздатність імобілізованих біфідобактерій (варіанти 1,2), що зберігалися при температурі 4°C протягом 1 місяця, знизилася з 9,52 до 3,3 lg КУО/мл та з 8,85 до 3,9 lg КУО/мл відповідно. Через 3 місяці зберігання в цих умовах бактерії загинули (рис. 3).

Життєздатність імобілізованих біфідобактерій (варіанти 1,2), що зберігалися при темпера-

турі -12°C протягом 1 місяця, знизилася з 9,52 до 3,54 lg КУО/мл та з 8,85 до 4,25 lg КУО/мл відповідно. Через 3 місяці зберігання в цих умовах бактерії, імобілізовані у немодифікованому гелі (варіант 1) загинули (рис. 4).

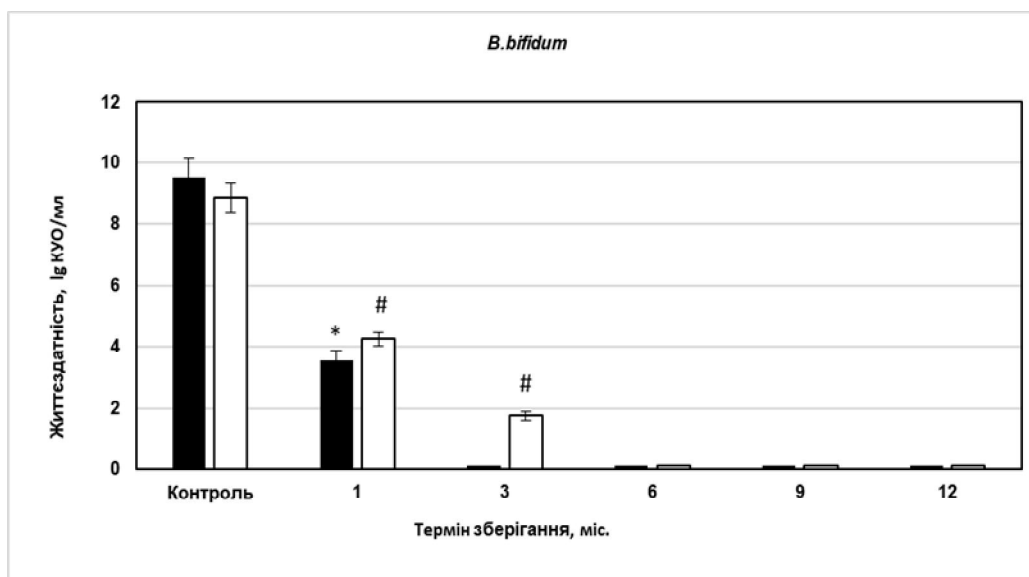


Рис. 4. Життєздатність іммобілізованих клітин *B. bifidum* після зберігання при температурі -12°C :
 ■ – клітини біфідобактерій в гранулах немодифікованого гелю;
 □ – клітини біфідобактерій в гранулах модифікованого середовищем СМЛ гелю;
 * – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №1;
 # – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №2 ($p < 0,05$)

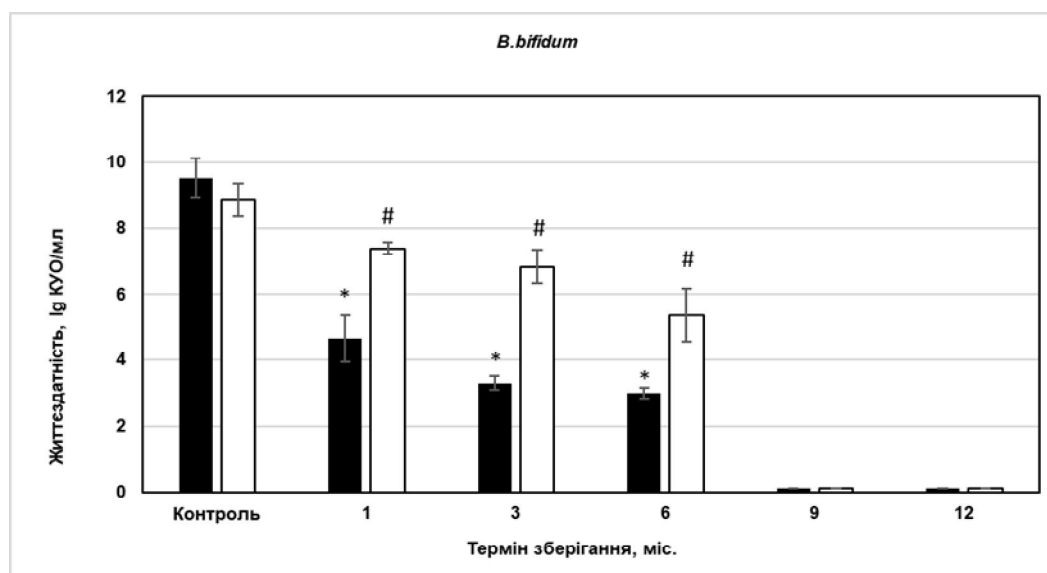


Рис. 5. Життєздатність іммобілізованих клітин *B. bifidum* після зберігання при температурі -20°C :
 ■ – клітини біфідобактерій в гранулах немодифікованого гелю; □ клітини біфідобактерій в гранулах 1%-го гелю, модифікованого доданням середовища СМЛ;
 * – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №1;
 # – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №2 ($p < 0,05$)

Під час зберігання біфідобактерій, що були іммобілізовані в гранулах 1%-го альгінатного гелю, модифікованого середовищем СМЛ, при температурі -12°C протягом 3 місяців показники життєздатності знизилися з 8,85 Іg числа КУО до 1,75.

При температурі -20°C кількість життєздатних іммобілізованих в гранулах 1% альгінатного гелю клітин біфідобактерій через 1 місяць пони-

зилася з 9,52 до 4,65 Іg КУО/мл, а через 6 місяців – до 3,0 Іg КУО/мл (рис. 5). Із збільшенням терміну зберігання дослідні зразки (варіанти 1,2) загинули.

Життєздатність іммобілізованих біфідобактерій (варіанти 1,2), що зберігалися при температурі -80 та -196°C протягом 12 місяців не відрізнялася від контролю (рис. 6,7).

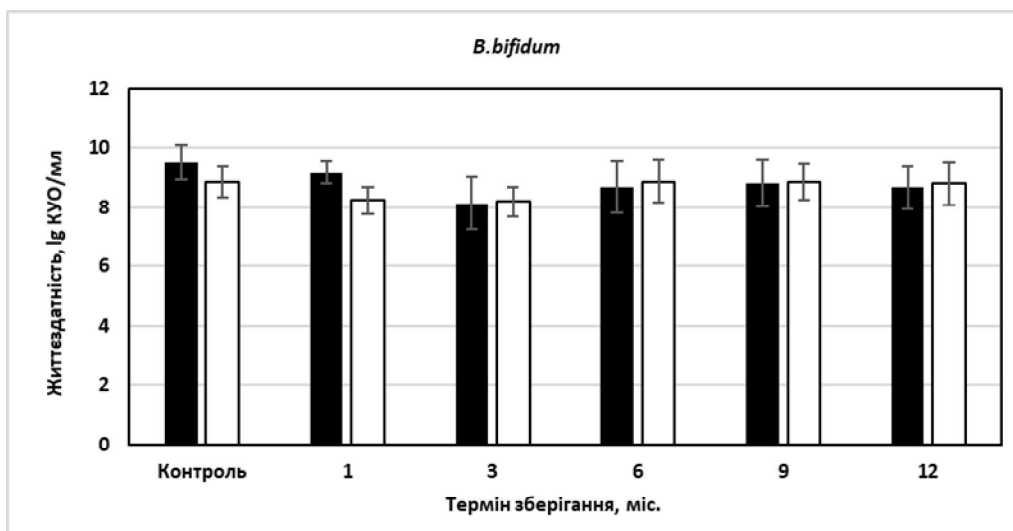


Рис. 6. Життєздатність іммобілізованих клітин *B. bifidum* після зберігання при температурі -80°C :
 ■ – клітини біфідобактерій в гранулах немодифікованого гелю;
 □ – клітини біфідобактерій в гранулах 1%-го гелю, модифікованого додаванням середовища СМЛ;
 * – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №1;
 # – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №2 ($p < 0,05$)

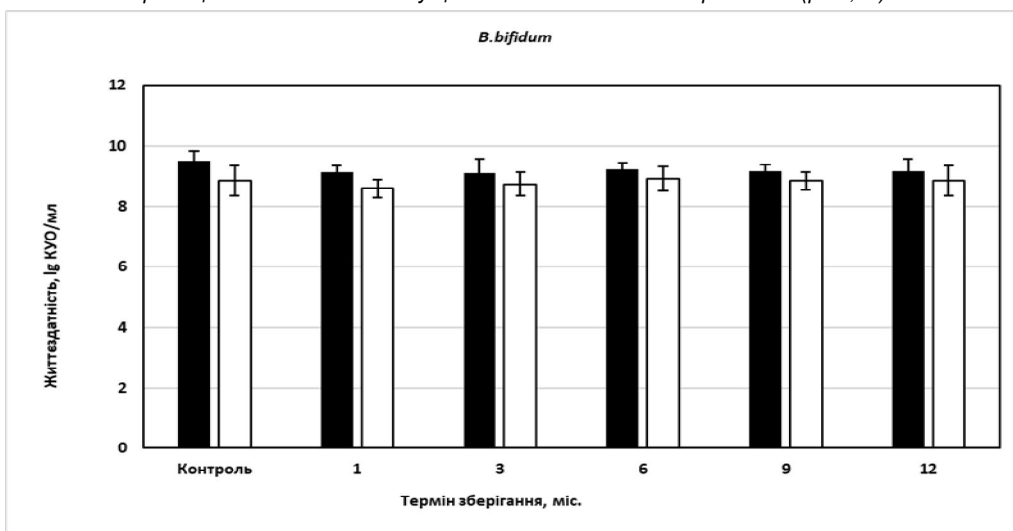


Рис. 7. Життєздатність іммобілізованих клітин *B. bifidum* після зберігання при температурі -196°C :
 ■ – клітини біфідобактерій в гранулах немодифікованого гелю;
 □ – клітини біфідобактерій в гранулах 1%-го гелю, модифікованого додаванням середовища СМЛ;
 * – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №1;
 # – різниця статистично значуща по відношенню до контролю №2 ($p < 0,05$)

Під час вивчення культуральних та морфологічних властивостей пробіотика *B. bifidum* після іммобілізації в гранулах немодифікованого та модифікованого альгінатного гелю та зберігання при різних температурах було встановлено, що склад гелю не впливав на характеристики макроколоній біфідобактерій та динаміку їх формування. Макроколонії *B. bifidum* після іммобілізації і після зберігання за вказаних температурних режимів мали вигляд комет і не відрізнялися від контролю.

При мікроскопії мазків, які були забарвлені за Грамом, у полі зору виявлялися Грам-негативні палички, які відрізнялися поліморфізмом: палички потовщені на кінцівках (біфуркації, булави) або у вигляді букви V. Різниця у морфології між

контрольними зразками, та зразками, які зберігалися у різних умовах, не визначалося.

Висновки

1. Показано, що на життєздатність клітин культури *B. bifidum*, іммобілізованих в гранулах альгінатного гелю, впливають як температурні режими зберігання, так і модифікація гелю додаванням до його складу захисного середовища СМЛ. При температурах -80°C , -196°C іммобілізовані бактерії не гинуть протягом року (термін спостереження).

2. Під час зберігання при температурах 4°C , -12°C , -20°C більш високі показники життєздатності і більші терміни збереженості клітин біфідобактерій спостерігали в зразках гранул альгінатного

гелю, модифікованого середовищем СМЛ.

3. Показано, що в процесі зберігання за низьких температур клітин *B. bifidum*, іммобілізованих в немодифікованому і модифікованому середовищем СМЛ альгінатному гелі, їх культуральні та морфологічні властивості не змінювалися.

Представлені в статті результати можуть бути використані в подальшому в розробці технологій виробництва пробіотичних препаратів, продуктів дієтичного харчування.

Література

1. Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Sep 4;9(10):577-89. doi: 10.1038/nrgastro.2012.156. eCollection 2012.
2. Tkach SM, Puchkov KS, Sizenko AK. Kischechnaia microbiota v norme i pri patologii [Intestinal microbiota in health and disease. Modern approaches to the diagnosis and correction of intestinal dysbiosis]. K: Tvisa LTD; 2014. 149 s. (Russian).
3. Vorob'ov AA, Bondarenko VM, Lykova EA, Grogor'iev AV, Matsulevich TM. Mikroekologicheskie narusheniia pri klinicheskoy patologii i ikh korrektsiia bifidocodierzhashchimi probiotikami [Microecological disorders in clinical pathology and their correction with bifid-containing probiotics]. *Vestnik RAMN*. 2004; 2:13-17. (Russian)
4. Tokareva NV. Korrektsiia i profilaktika disbakterioza [Correction and prevention of dysbiosis]. *Effektivnaia farmakoterapiia. Gastroenterologiya*. 2011; 3:77-85. (Russian).
5. Ding WK, Shah NP. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *J Food Sci*. 2009 Mar;74(2):M100-7. doi: 10.1111/j.1750-3841.2009.01067.x.
6. Liaskovskiy TM, Podgorskiy VS. Otsenka probiotikov, soglasno rekomendatsiiam mizhdunarodnykh organizatsiy (FAO/WHO) [Текст] [Evaluation of probiotics according to the recommendations of international organizations]. *Mikrobiol.zhurn*. 2005; 67(6):104-112. (Russian).
7. Poliak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. Pitatel'nyie sriedy dlia mieditsinskoy mikrobiologii [Culture media for medical microbiology]. SPb; 2002. 80 s. (Russian).
8. Jen-Horny Tsen, Hui-Ying Huany, V. An-Erl King. Enhancement of freezing-resistance of *Lactobacillus rhamnosus* by the application of cell immobilization. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2007; 53(3): 215-219.
9. Pat. №56674 Ukraina MPK C12N 1/04. Sposib konservuvannia kul'tury *Bifidobacterium bifidum* LVA-3. Ananina GiE, Gol'tsev AM, Vysekantsev IP ta in. Zaiavl. 18.06.2010. Opubl. 25.01.2011. Biul. №2. (Ukrain).
10. Zelikin AN, Ehrhardt C, Healy AM. Materials and methods for delivery of biological drugs. *Nature Chemistry*. 2016; 8, (11): 997–1007.
11. Sharma A, Sharma S, Khuller GK. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *J. Antimicrob. Chemother*. 2004; 54(4): 761–766.
12. Peek L J, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2008; 60(8): 915–928.
13. Lakin GF. Biometriia. Uchebnoie posobie dlia biol. spets. vuzov [Biometrics. Study guide for biol. specialist. Universities]. M: Vysshiaia shkola. 1990. 352 s. (Russian).

Реферат

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ГИПОТЕРМИЧЕСКОГО И НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОГО ХРАНЕНИЯ НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ИММОБИЛИЗОВАННОГО ПРОБИОТИКА *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM*

Ананьина А.Е., Степанюк Л.В., Висеканцев И.П., Петров И.В.

Ключевые слова: пробиотики, иммобилизация, гелевые гранулы, гипотермическое хранение, низкотемпературное хранение, сахарозо-молочно-лактозная защитная среда, жизнеспособность.

Актуальной проблемой медицины в настоящее время являются дисбиозы, которые возникают в связи с воздействием на организм человека ряда негативных факторов, а также снижения иммунного статуса. Приоритетным направлением современной биотехнологии является создание иммобилизованных в гелевых носителях пробиотических препаратов, которые могут использоваться для коррекции дисбиозов. Иммобилизация клеток пробиотиков в гранулах альгинатного геля защищает их от повреждающего действия барьерных функций желудочно-кишечного тракта. Цель исследования – изучение влияния гипотермического и низкотемпературного хранения на жизнеспособность иммобилизованного в гранулах альгинатного геля пробиотика *Bifidobacterium bifidum*. Бактериальные клетки иммобилизовали в гранулах немодифицированного геля (1% -ный раствор альгината натрия) и в гранулах модифицированного защитной сахарозо-молочно-лактозной средой геля. Гранулы с иммобилизованными бактериальными клетками раскладывали в криопробирки. Образцы хранили при температурах 4, -12, -20, -80 и -196°C в течение 12 месяцев (срок исследования). Установлено, что хранение при температурах -80 и -196°C обеспечивало высокую жизнеспособность пробиотика в течение всего срока исследования. В процессе хранения при температурах 4 и -12°C гибель бактерий отмечали через 1-3 месяца в зависимости от состава гелевого носителя, а при температуре -20°C – через 6-9 месяцев. Выводы: Установлено, что на жизнеспособность клеток культуры *B. bifidum*, иммобилизованных в гранулах альгинатного геля, влияют как температурные режимы хранения, так и модификация геля введением в его состав сахарозо-молочно-лактозной среды. При температурах -80, -196°C иммобилизованные бактерии не погибают в течение года (срок наблюдения). Во время хранения при температурах 4, -12, -20°C более высокие показатели жизнеспособности и большие сроки сохранности клеток бифидобактерий наблюдали в образцах гранул альгинатного геля, модифицированного сахарозо-молочно-лактозной средой. Показано, что в процессе хранения при низких температурах клеток *B. bifidum*, иммобилизованных в немодифицированном и модифицированном добавлением сахарозо-молочно-лактозной среды альгинатном геле, их культуральные и морфологические свойства не изменились.

Summary

IMPACT OF HYPOTHERMAL AND LOW TEMPERATURE STORAGE CONDITIONS ON VIABILITY OF IMMOBILIZED PROBIOTICS BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM

Ananina G.E., Stepanyuk L.V., Vysekantsev I.P., Petrov I.V.

Key words: probiotics, immobilization, gel granules, hypothermic storage, low-temperature storage, sucrose-milk-lactose protective environment, viability.

Dysbiosis is among the challenges the healthcare is facing now. This condition results from the combined impact of a number of negative factors on the human body, and immune status weakening. The priority of current biotechnology is the elaboration of probiotics immobilized in gel particles that can be used to correct dysbiosis. Immobilization of probiotic cells in alginate gel granules protects them from the damaging effects of barrier functions of the gastrointestinal tract. The aim of the study was to investigate the effect of hypothermic and low-temperature storage on the viability of the probiotic *Bifidobacterium bifidum* immobilized in granules of alginate gel. Bacterial cells were immobilized in granules of unmodified gel (1% sodium alginate solution) and in granules of modified sucrose-milk-lactose gel. Granules with immobilized bacterial cells were placed into cryotubes. The samples kept at temperatures of +4, -12, -20, -80 and -196 ° C for 12 months (study period). It was found that storage at temperatures -80 and -196°C provided high viability of the probiotic throughout the study. During storage at temperatures of +4 and -12 ° C, the death of bacteria was observed in 1 – 3 months, depending on the composition of the gel particles, and at a temperature of -20°C the death occurs in 6-9 months. Conclusions: It has been established that the viability of *B. bifidum* culture cells immobilized in alginate gel granules is influenced by both storage temperature modes and gel modification by the introduction of sucrose-milk-lactose medium. At temperature ranges of -80 and -196°C, immobilized bacteria do not die during the year (observation period). When storing at the temperatures +4, -12, -20°C, higher viability rates and longer shelf life of bifidobacterial cells were observed in samples of alginate gel granules modified with sucrose-milk-lactose medium. The study has shown that being kept at the low temperature values, *B. bifida* cells immobilized in unmodified and modified with sucrose-milk-lactose medium do not change their cultural and morphological properties.