

УДК 615.33.065+549.678

## ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦЕОЛИТОВ В СОСТАВЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МУЛЬТИПРОБИОТИКОВ

И.В. Белова, А.Г. Точилина, И.В. Соловьева, Н.А. Новикова,  
Е.И. Ефимов, Т.П. Иванова, В.А. Жирнов,

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной»

*Точилина Анна Георгиевна – e-mail: lab-lb@yandex.ru*

В статье представлены результаты работы по созданию нового жидкого иммобилизованного мультипробиотика на основе пробиотических штаммов родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* и сорбента из семейства цеолитов. Дана подробная характеристика отобранного сорбента-носителя – цеолита Холинского месторождения, создана симбиотичная и эффективная композиция штаммов-продуцентов, изучена сохранность штаммов в присутствии цеолита в течение всего срока годности пробиотика, проведена оценка состояния клеток бактерий и их взаимодействия с кристаллами сорбента.

**Ключевые слова:** иммобилизованные пробиотики, цеолиты, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

The article presents the results of work on a new liquid immobilized multiprobiotic based probiotic strains genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and sorbent from the family of zeolites. Gave a detailed description of the selected sorbent carrier - zeolite of Kholinskiy deposit, established symbiotic and effective composition of producer strains, studied the safety of strains in the presence of zeolite in the expiry date of the probiotic, were assessed for bacterial cells and their interaction with crystals sorbent.

**Key words:** immobilized multiprobiotic, zeolites, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*.

### Введение

Согласно современным тенденциям, тактика терапии инфекционных заболеваний должна основываться на использовании рационального режима антибиотикотерапии с обязательным включением препаратов нормофлоры либо в качестве дополнительного лечебного средства, либо в качестве пробиотической составляющей диеты [1–4].

К настоящему времени в распоряжении врачей имеется четыре поколения пробиотиков:

I поколение – классические монокомпонентные препараты, содержащие один штамм бактерий (Бифидумбактерин, Лактобактерин, Колибактерин);

II поколение – самоэлиминирующиеся антагонисты (Энтерол, Бактисубтил, Биоспорин и др.);

III поколение – комбинированные препараты, состоящие из нескольких штаммов бактерий (поликомпонентные) или включающие добавки, усиливающие их действие (Нормофлорин, LB-комплекс, Аципол, Линекс и др.).

IV поколение – иммобилизованные на сорбенте живые бактерии – представители нормофлоры человека (Бифидумбактерин Форте, Пробифор, Экофлор, Бифалактрим и др.) [5, 6].

Иммобилизованные пробиотики обладают рядом положительных свойств и особенностей: показано, что микроорганизмы, иммобилизованные на сорбенте, лучше сохраняются в кислой среде желудка, что позволяет им беспрепятственно достигать нижних отделов пищеварительного тракта; клетки сконцентрированы на носителе, при внесении их в кишечник формируется репродукционная доза,

которая образует в химусе микроколонии, интенсивно взаимодействующие с пристеночным слоем слизистой оболочки кишечника за счет химических и электростатических сил и активно адгезирующиеся на ней [6, 7].

Увеличение концентрации активных микроколоний бактерий на стенках кишечника усиливает скорость колонизации, обеспечивает выраженный антагонистический и репаративный эффекты и последующую вегетацию вводимых микроорганизмов. Сорбент, кроме функции матрицы, способствует также адгезии микроколоний на слизистой кишечника и концентрации метаболитов. По мере освобождения от бактерий сорбент-носитель реализует и детоксицирующую функцию, адсорбируя и выводя из кишечника токсины, продукты незавершенного метаболизма, патогенные и условно-патогенные бактерии, аллергены [7].

Большинство разработанных на данный момент в России иммобилизованных пробиотиков являются моноштаммовыми, содержат в своем составе сорбенты на основе активированных углей и углерододоминеральных сорбентов (СУМС-1) и производятся в лиофильно-высушенном виде [8].

Препараты в сухой форме имеют ряд положительных качеств, например, длительный срок годности, удобство хранения и реализации. Но процесс лиофилизации бактерий оказывает негативное влияние на структуру их поверхностных белков, активность адгезии, а также приводит к разрушению ценных бактериальных метаболитов. Жидкая форма пробиотиков, напротив, способствует реализации положительных свойств штаммов-продуцентов в полной

мере, так как их клетки находятся в активном физиологическом состоянии, эффективно взаимодействуют со слизистой кишечника, кроме того, в жидкой среде сохраняются все бактериальные метаболиты [9].

В связи с этим актуальным и интересным является вопрос создания нового жидкого иммобилизованного мультипробиотика.

**Цель работы:** создание жидкого иммобилизованного поликомпонентного пробиотика.

#### Материалы и методы

В работе использовали:

- шесть штаммов бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*;

- БАД «Литовит М» (регистрационное удостоверение № RU 77.99.11.003.Е.010664.03.11) производства НПО «Новь» (Новосибирск), разрешенная для использования в медицинской практике. Минеральная основа данной БАД – это стандартная составляющая природного цеолита Холинского месторождения, подготовленная по запатентованной технологии очистки и обогащения сырья, содержание активного компонента – клиноптилолита в которой составляет 100%. Кристаллохимическая формула клиноптилолита:  $(\text{Na}, \text{K})_6[\text{Al}_6\text{Si}_3\text{O}_{72}] \times 24\text{H}_2\text{O}$ . Химический состав цеолита:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  – 12,9–13,2%;  $\text{SiO}_2$  – 66,2–78,3%;  $\text{K}_2\text{O}$  – 4,0–4,8%;  $\text{Na}_2\text{O}$  – 1,8–2,2%;  $\text{CaO}$  – 1,8–2,4%;  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  – 0,8–1,2%;  $\text{Mn}$  – 0,001%;  $\text{H}_2\text{O}$  – 10–12%. Соединения хрома, кобальта, молибдена, никеля и сурьмы не обнаружены. Плотность цеолита – 2,2–2,6 г/см<sup>3</sup>, насыпной вес 1,02–1,2 г/см<sup>3</sup> [10]. Кристаллическая структура этого вида цеолитов состоит из тетраэдров оксида кремния и оксида алюминия, соединенных вершинами в ажурные каналы, в полостях и каналах которых находятся катионы и молекулы воды. В природе цеолиты образуют хорошо ограненные кристаллы различной симметрии, размерами от доли микрона до 10 см, не имеющие острых граней, обычно белого цвета [11].

Свойства микроорганизмов были изучены согласно МУ 2.3.2.2789-10 [12], изучение сохранности штаммов-продуцентов в составе опытных серий иммобилизованных пробиотиков и в контроле проводили в соответствии с МУК 4.2.1847-04 [13].

Выделение бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* из готового продукта проводили согласно МУК 4.2.577-96 [14], идентификацию микроорганизмов проводили методом MALDI TOF масс-спектрометрии с использованием масс-спектрометра Autoflex (Bruker) и программно-аппаратного комплекса BioTyper.

Оптическая микроскопия в отраженном свете проводилась с использованием микроскопа Leica PM 4000M (Leica) и программного обеспечения для анализа изображений Image Scope Color.

#### Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы был изучен спектр свойств штаммов, в том числе антагонистическая активность, выживаемость в кислой среде, антибиотикорезистентность, биосовместимость. Установлено, что исследованные штаммы родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* полностью отвечают требованиям, предъявляемым к штаммам-продуцентам пробиотиков, проявляют выраженную антагонистическую активность против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, обладают относительно

высоким уровнем кислотоустойчивости, биосовместимы друг с другом и пригодны для использования в одной композиции. Также установлено, что из отобранных штаммов всегда два–три штамма разных родов устойчивы к действию конкретного антибиотика, что делает возможным и оправданным применение пробиотика на фоне антибактериальной терапии.

Таким образом, отобранные штаммы составляют симбиотичную и эффективную композицию, которая может быть основой для создания нового жидкого иммобилизованного мультипробиотика.

Следующей задачей, требующей решения, является выбор сорбента-носителя. На данный момент разработано и используется большое количество сорбентов различных групп, как природного происхождения – цеолиты, алюмосиликаты, растительные волокна и т.д., так и искусственно созданных – СУМС-1, Сфероцелл и др.

Использование активированных углей и СУМС-1 для создания жидких форм пробиотиков мы сочли нецелесообразным, так как введение субстанции в питательную основу препарата отрицательно влияет на внешний вид конечного продукта, который становится грязно-серого цвета с черным осадком.

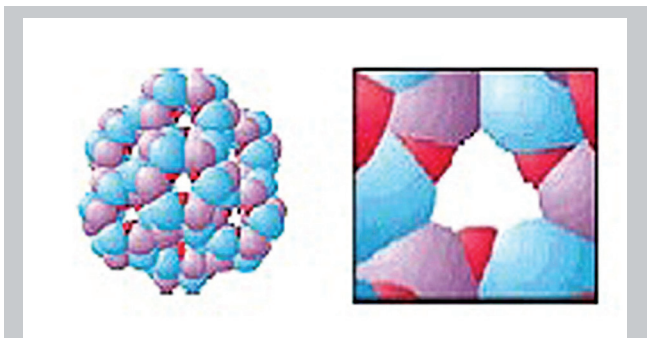
Органические энтеросорбенты на основе природных компонентов (таких как хитин, хитозан, пищевые растительные волокна) обладают низкой адсорбционной способностью, и, кроме того, их адсорбция достаточно специфична [15]. Также они являются биологически нестабильными: в процессе переваривания в ЖКТ они могут разрушаться до компонентов, которые в дальнейшем используются в метаболизме макроорганизма. Эти сорбенты не способны осуществлять сорбирующий эффект в полной мере, поэтому использование их в составе жидкого иммобилизованного пробиотика неоправданно.

Использование гелей на основе альгинатов, каррагинана и др., безусловно, повышает эффективность штаммов-продуцентов и их выживаемость, но не отвечает задаче по созданию жидкого препарата.

Наиболее целесообразным представляется использование при конструировании иммобилизованного пробиотика природных минеральных сорбентов, способных не только освободить среду от балластных и токсичных веществ, но и обогащать ее полезными веществами и ионами.

Среди минеральных сорбентов широко известны цеолиты, относящиеся к породам вулканически-осадочного происхождения, представляющие собой каркасные алюмосиликаты щелочных и щелочноземельных металлов. В медицинской практике рекомендовано использование цеолита Холинского месторождения, по структурному признаку относящегося к группе гейландита – клиноптилолит.

Особенностью архитектуры алюмокремнекислородных каркасов цеолита Холинского месторождения является наличие в нем системы регулярных каналов и сообщающихся полостей, которые после процесса дегидратации остаются в неизменном виде. Благодаря системе каналов и полостей, которые пронизывают кристаллы данного цеолита, этот адсорбент обладает хорошо развитой внутренней поверхностью, доступной для адсорбируемых молекул (рис. 1).



**РИС. 1.**  
Схема системы каналов и полостей в дегидратированном цеолите [10].

Особенности сорбции на цеолитах связаны с тем, что ажурность кристаллической структуры создает большой адсорбционный объем, а его геометрия определяет молекулярно-ситовые свойства. Сильное взаимодействие молекул с адсорбентом обусловлено наличием акцепторных центров, прочно удерживающих доноры электронов, или ОН-групп, удерживающих основания [10, 11].

Природные цеолиты удовлетворяют всем требованиям, предъявляемым к сорбентам-носителям: в ходе приема не обнаруживаются в биологических жидкостях организма, элиминируются из кишечника уже на первые сутки после приема, регулируют ионное равновесие в биологических жидкостях организма, осуществляют детоксикацию, восстановление работы органов и лимфатической системы. Биометаллы, поставляемые цеолитами, нормализуют насыщенность ЖКТ ферментами, что положительно влияет на процессы пищеварения и организм в целом. Доказано, что использование клиноптилолита дает целый ряд положительных эффектов, таких как антитоксический, иммуномодулирующий, антианемический, гепатопротекторный, способствует выведению из организма тяжелых металлов, нормализует липидный, белковый и углеводный обмены, оптимизирует работу ферментных систем [16]. Таким образом, данный сорбент обладает характеристиками, обеспечивающими перспективность его использования в качестве матрицы для иммобилизации пробиотических штаммов микроорганизмов, что и обусловило его выбор для создания жидкого иммобилизованного пробиотика.

В ходе работы была проведена серия модельных экспериментов по сорбции на твердом носителе как каждого штамма из группы отобранных, так и композиции штаммов. Показано, что цеолит не изменяет внешний вид жидкого пробиотика, имеет выраженные сорбционные свойства и оказывает благоприятное воздействие на штаммы-продуценты.

Разработан оптимальный способ иммобилизации бактерий, защищенный патентом № 2441907 [17], предусматривающий раздельное культивирование штаммов лакто- и бифидобактерий с последующим смешиванием биомасс стартерных культур и иммобилизацией на цеолите.

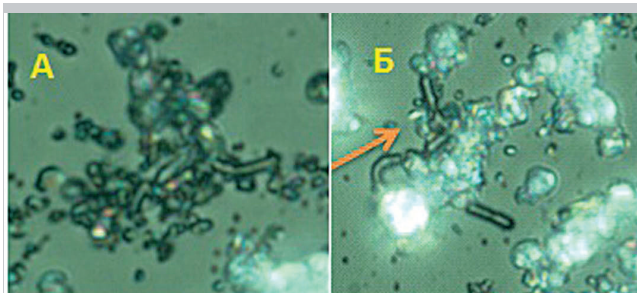
Проведена серия опытов по изучению сохранности иммобилизованных форм. Полученные результаты позволили сделать вывод, что цеолит не оказывает отрицательного влияния на сохранение жизнеспособности

клеток микроорганизмов – продуцентов пробиотиков. Все штаммы, составляющие пробиотическую композицию, сохраняются в высоких титрах –  $10 \text{ lg KOE/мл}$  и выше в течение всего срока хранения жидкого мультипробиотика (таблица).

**ТАБЛИЦА.**  
Сохранность штаммов нового жидкого мультипробиотика

Штаммы-продуценты пробиотика	Усредненные показатели количества живых микроорганизмов в $\text{lg KOE/мл}$						
	10 дней	20 дней	30 дней	40 дней	50 дней	60 дней	70 дней
<i>L.plantarum</i>	11	11	11	11	11	10	10
<i>L.fermentum 1</i>	11	11	11	11	10	10	10
<i>L.fermentum 2</i>	11	11	11	11	11	10	10
<i>B.bifidum 1</i>	11	11	11	10	10	10	10
<i>B.bifidum 2</i>	11	11	11	10	10	10	10
<i>B.longum</i>	11	11	11	10	10	10	10

Следующим этапом работы стали изучение и оценка взаимодействия микроорганизмов и частиц цеолита в составе готового пробиотика. Состояние комплексной жидкой среды, содержащей бактерии-продуценты и сорбент-носитель, было оценено с помощью оптической микроскопии в отраженном свете (рис. 2).



**РИС. 2.**  
Оптическая микроскопия в отраженном свете. Клетки бактерий рода *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и кристаллы цеолита в лиофильно высушенном виде (А) и в составе жидкого пробиотика (Б).

В препарате клетки микроорганизмов и частицы цеолита находятся в непосредственном контакте между собой, причем бактерии образуют микроколонии на поверхности кристаллов (рис. 2Б). Это свидетельствует об активном физиологическом состоянии микроорганизмов.

Большой пробиотический потенциал штаммов, их сохранность в достаточном для биологических концентратов титре в течение срока хранения, доказанная функциональная активность микроорганизмов в жидкой среде в присутствии сорбента позволяют реализовать все положительные свойства пробиотических бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* и сорбента из группы цеолитов в полной мере.

#### Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований был сконструирован новый жидкий иммобилизованный мультипробиотик, в качестве стартерных культур которого использованы штаммы лакто- и бифидобактерий, иммобилизованные на сорбенте-носителе – цеолите.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Учайкин В.Ф. Решенные и нерешенные проблемы инфекционной патологии у детей. Детские инфекции. 2003. № 4. С.3-7.  
*Uchaikin V.F. Reshennye i nereshennye problemy infekcionnoy patologii u detei. Detckie infekcii. 2003. № 4. С.3-7.5.3-7.*
2. Новокшонов А.А. Острые кишечные инфекции у детей: классификация по типу диареи и основные направления комплексной терапии. Практика педиатра. 2005. № 9. С.3-8.  
*Novokshonov A.A. Ostrye kishhechnye infekcii u detei: klassifikatsiya po tipu diarei i osnovnye napravleniya kompleksnoy terapii. Praktika pediatri. 2005. № 9. S.3-8.*
3. Горелов А.В. Современные подходы к стартовой терапии острых кишечной инфекций у детей. Вопросы современной педиатрии. 2003. Т. 2. № 2. С. 2-4.  
*Gorelov A.V. Sovremennye podchody k startovoy terapii ostrych kishhechnych infekcii u detei. Voprosy sovremennoy pediatrii. 2003. T. 2. № 2. S. 2-4.*
4. Феблисова Л.В., Мескина Е.Р. Новое поколение сорбированных бифидосодержащих пробиотиков в педиатрической практике. Альманах клинической медицины. 2005. № 8. С. 329-338.  
*Feclisova L.V., Meskina E.R. Novoe pokolenie sorbirovannykh bifidosodergashih probiotikov v pediatricheskoy praktike. Almanah klinicheskoy mediciny. 2005. № 8. S. 329-338.*
5. Захарова И.Н., Мазанкова Л.Н., Дмитриева Ю.А. Современные пробиотики для коррекции микробиоценоза кишечника у детей. Вопросы современной педиатрии. 2009. Т. 8. № 2. С. 113-117  
*Zaharova I.N., Mazankova L.N., Dmitrieva U.A. Sovremennye probiotiki dlya korrektsii mikrobiocenosa kishhechnika u detei. Voprosy sovremennoy pediatrii. 2009. T. 8. № 2. S. 113-117.*
6. Феблисова Л.В., Мацулевич Т.В. Отечественные бифидосодержащие пробиотики в педиатрической практике. Лекция. Альманах клинической медицины. 2002. № 5. С. 296-300.  
*Feclisova L.V., Maculevich T.V. Otechestvennye bifidosodergashie probiotiki v pediatricheskoy praktike. Almanah klinicheskoy mediciny. 2002. № 5. S. 296-300.*
7. Римарчук Г.В., Урсова Н.И., Щеплягина Л.А. и др. Энтеросорбция в терапевтических программах различных заболеваний у детей. Альманах клинической медицины. 1999. № 2. С. 283-292.  
*Rimarchuk G.V., Ursova N.I., Sheplyagina L.A. i dr. Enterosorbtsiya v terapevticheskikh programmah razlichnykh zabolevaniy u detei. Almanah klinicheskoy mediciny. 1999. № 2. S. 283-292.*
8. Иванова В.В. Комплексный подход к восстановлению микрофлоры. Современный взгляд на коррекцию дисбиозов / под ред. А.В. Молокеева. Новосибирск. 2007. 48 с.  
*Ivanova V.V. Kompleksnyi podhod k vosstanovleniyu mikroflory. Sovremennyy vzglyad na korrektsiu disbiozov / pod. red. A.V. Molokeeva, Novosibirsk, 2007. 48 s.*
9. Бондаренко В.М., Шапошникова Л.И. Клинический эффект жидких симбиотических биокомплексов, содержащих физиологически активные клетки бифидобактерий и лактобацилл. М.: Триада, 2007. 95 с.  
*Bondarenko V.M., Shaposhnikova L.I. Klinicheskyy effect zhidkikh simbioticheskikh kompleksov, sodержashih fiziologicheski aktivnye kletki bifidobakteriy i lactobacill. M.: Triada, 2007. 95 s.*
10. Веретенина О.А., Костина Н.В., Новоселова Т.И. и др. Литовит. Сибирский центр оздоровительного питания; НГАЭ и У. Новосибирск, 2003. 104 с.  
*Veretenina O.A., Kostina N.V., Novoselova T.I. i dr. Litovit. Sibirskiy centr ozdorovitel' nogo pitaniya; NGAЕ i U. Novosibirsk, 2003. 104 s.*
11. Братов В.И. Подходы к экогеологии. Новосибирск: НГУ, 1993. 70 с.  
*Bgatov V.I. Podhody k ekogeologii. Novosibirsk: NGU, 1993. 70s.*
12. МУК 2.3.2.2789-10. «Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов». Москва. 2010.  
*MUK 2.3.2.2789-10. «Metodicheskie ukazania po sanitarno-epidemiologicheskoy ocenke bezopasnosti i funktsional'nogo potentsiala probioticheskikh mikroorganizmov, ispol'zuemykh dlya proizvodstva pishhevyykh produktov». Moskva. 2010.*
13. МУК 4.2.1847-04. «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов». Москва. 2004.  
*MUK 4.2.1847-04. «Sanitarno-tpidemiologicheskaya oценка obosnovaniya srokov godnosti i uslovii hraneniya pishhevyykh produktov». Moskva. 2004.*
14. МУК 4.2.577 – 96. «Методы микробиологического контроля продуктов детского, лечебного питания и их компонентов. М. 1996.  
*MUK 4.2.577 – 96. «Metody micribiologicheskogo kontrolya productov detskogo, lechebnogo pitanya i ih componentov. M. 1996.*
15. Комаров В.С. Адсорбенты и их свойства. Минск: Наука и техника, 1977. 248 с.  
*Komarov V.S. Adsorbenty i ih svoystva. Minsk: Nauka i technica, 1977. 248 s.*
16. Агаджанян Н.А. Природные минералы на службе человека. Новосибирск: НГУ, 2002. 30 с.  
*Agadzanyan N.A. Prirodnye mineral na sluzhbe cheloveka. Novosibirsk: NGU, 2002. 30 s.*
17. Патент № 2441907 Россия, МПК C12N 1/20, A61K 35/74, A23C 9/127. Способ приготовления лечебно-профилактического препарата из живых штаммов микроорганизмов лакто- и бифидобактерий «LB-комплекс Л» / Соловьева И.В., Белова И.В., Точилина А.Г., Ефимов Е.И., Иванова Т.П., Новикова Н.А., Новоселова Т.И., Новоселов Я.Б. (Россия). № 2010132024/10; заявлено 29.07.2010, опубл. 10.02.2012, Бюл. № 4. С. 2.  
*Patent № 2441907 Rossia, MPK C12N 1/20, A61K 35/74, A23C 9/127. Sposob prigotovleniya lechebno-profilakticheskogo preparata iz zhivykh shtammov mikroorganizmov lacto- i bifidobakteriy «LB-kompleks L»/ Solovyeva I.V, Belova I.V, Tochilina A.G., Efimov E.I., Ivanova T.P., Novikova N.A., Novoselova T.I., Novoselov Y.B. (Rossia) № 2010132024/10; zayavleno 29.07.2010, opubl. 10.02.2012, Bul. № 4. S. 2.*