

УДК 576.851.24

**Н.А. Глушанова, А.И. Блинов**

## **ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ЖИДКОГО ЛАКТОБАКТЕРИНА**

*Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей (Новокузнецк)*

---

*Разработана питательная среда для приготовления жидкого лактобактерина. Представлены результаты исследования накопления биомассы 10 штаммов лактобацилл, в том числе 5 производственных и 5 индигенных, выделенных из кишечника человека и животных. Лактобактерин, приготовленный из *L. acidophilus* 317/402 на этой среде, обеспечивает сохранение жизнеспособности лактобацилл не менее чем 9 и 7 Lg КОЕ/мл в течение 2 и 4 месяцев хранения соответственно.*

**Ключевые слова:** питательная среда, жидкий лактобактерин

## **CULTURE MEDIUM FOR PREPARATION FLUID LACTOBACTERIN**

**N.A. Glushanova, A.I. Blinov**

*Novokuznetsk State Institute of Physicians' Training, Novokuznetsk*

*Culture medium for preparation fluid lactobacterin are developed. Results of research of biomass accumulation of 10 lactobacilli strains, including 5 productions and 5 indigenous, received from intestine person and animals. Lactobacterin from *L. acidophilus* 317/402 on this culture medium are prepared, ensures a conservation of viability lactobacilli not less than 9 and 7 Lg PFU /ml, during 2 and 4 months of keeping, consequently.*

**Key words:** culture medium, fluid lactobacterin

---

### **ВВЕДЕНИЕ**

Общепринятым способом сохранения и восстановления нарушенных микробиоценозов в насто-

ящее время является бактериотерапия. Основным средством бактериотерапии служат пробиотики, пребиотики, синбиотики, а также продукты функ-

ционального питания [5, 15]. В ряде случаев пробиотики успешно используются в качестве альтернативы антибиотикам для подавления патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Среди бактерий, используемых для изготовления пробиотиков широкое применение находят представители рода *Lactobacillus*. Однако в последние годы появились данные о том, что пробиотические штаммы лактобацилл могут оказывать антагонистические воздействия не только на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы (УПМ), но и на резидентные лактобактерии потребителя, вследствие чего снижается эффективность пробиотикотерапии. В связи с изложенным, возникает необходимость индивидуального приготовления пробиотиков на основе лактобацилл, биосовместимых с резидентной лактофлорой пациента и/или способных подавить нежелательную микрофлору [3]. Для получения таких препаратов необходима питательная среда, способная обеспечить не только накопление биомассы пробиотических лактобацилл, но и продолжительное сохранение их жизнеспособности и возможность для энтерального или местного применения. Диагностические питательные среды для культивирования лактобацилл, представляющие собой варианты известной среды MRS, содержат токсические компоненты и не могут быть использованы для энтерального употребления.

Ранее, с целью выделения индигенных лактобацилл из клинического материала нами была разработана жидкая селективная питательная среда обогащения [12]. Удовлетворительные ростовые качества этой питательной среды подтвердили лабораторные исследования и практическое использование. Изменение состава и физико-химических свойств вышеуказанной питательной среды позволили получить модифицированную неселективную питательную среду для накопления биомассы пробиотических лактобацилл.

**Цель работы** — исследование ростовых качеств модифицированной питательной среды и изучение возможности ее использования для изготовления индивидуальных препаратов лактобактерина.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Жидкие питательные среды для накопления биомассы лактобацилл:

- 1) молочно-дрожжевая среда [7];
- 2) модифицированная среда, г/л: гидролизат обезжиренного молока сухой ферментативный (Нижегородского государственного предприятия по производству бактериальных препаратов «Им-Био»)  $30,0 \pm 3,0$ ; аутолизат дрожжей концентрированный  $110,0 \pm 10,0$ ; агар пищевой (ГОСТ 16280-89) 0,8; вода дистиллированная до 1 литра; 20%-ный водный раствор натрия гидроксида (Ч.д.а., ГОСТ 4328-77) до pH среды  $6,4 \pm 0,1$ . Питательную среду стерилизовали в автоклаве при  $110^\circ\text{C}$  в течение 20 мин. (Заявка №2002131983/13(033762), приоритет 27.11.02). Плотная питательная среда для отбора колоний, соответствующих паспортным данным штамма, отличается от

вышеуказанной жидкой повышенным ( $18,0 - 20,0$  г/л) содержанием агара.

В качестве тест-культур для исследования ростовых качеств модифицированной питательной среды использованы производственные штаммы лактобацилл: *Lactobacillus acidophilus* NK 1, *L. acidophilus* M100, *L. acidophilus* K3 III 24, (МНИ-ИЭМ им. Г.Н. Габричевского); *L. plantarum* 8PA3 (Томский НИИВС «Фермент»); *L. acidophilus* 317/402 — (АО «Биомед»), а так же свежeweделенные штаммы резидентных лактобацилл из фекалий человека (*L. coprophilus*, *L. delbrueckii*) и белых мышей (*L. acidophilus* 2, *L. cellobiosus*, *L. plantarum*).

Выделение резидентных лактобацилл из фекалий осуществляли разработанным нами способом [12]. Видовую идентификацию лактобактерий осуществляли определением их ферментативного профиля по укороченному спектру углеводов: (L(+))арабиноза, Dфруктоза, сахароза, D(+))мальтоза, aDMelezitose, целлобиоза, D(+))сорбит, Dсалицин, эскулин [13, 14].

Методика изготовления пробиотика из лиофилизированных производственных штаммов лактобацилл заключалась в следующем. С целью предварительного восстановления биологических свойств дегидратированных бактерий и получения рабочей стартерной культуры проводили не менее 3 пассажей. Для этого в асептических условиях содержимое флакона растворяли в 5 мл модифицированной жидкой питательной среды и переносили в колбу, содержащую 25 — 30 мл питательной среды того же состава, инкубировали при  $38 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 16 — 18 ч (первый пассаж). Затем производили рассев полученной культуры (второй пассаж) на поверхности плотной питательной среды для культивирования лактобацилл. Чашки с посевами инкубировали крышкой вниз при температуре  $38 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18 — 20 ч в атмосфере, содержащей 5 % углекислого газа и 16 % кислорода, после чего отбирали типичные колонии. Каждую отобранную колонию засеивали в пробирку с 10 мл жидкой питательной среды (третий пассаж), инкубировали при температуре  $38 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 14 — 16 ч, проверяли чистоту культуры лактобацилл в каждой пробирке и использовали в качестве стартерной рабочей культуры для получения жидкого лактобактерина (четвертый пассаж). Для этого питательную среду подогревали на водяной бане до температуры  $38 \pm 1^\circ\text{C}$ , добавляли рабочую культуру лактобацилл в соотношении 1:10, инкубировали при температуре  $39^\circ\text{C}$  в течение 18 ч. Оптимальное время инкубации (18 ч), обеспечивающее максимальное накопление жизнеспособных клеток для штамма *L. acidophilus* 317/402, было определено предварительно при помощи разработанного нами экспресс-метода [4]. Пробиотический препарат охлаждали до  $20^\circ\text{C}$ , разливали в асептических условиях по 10 мл во флаконы под обкатку и сохраняли при температуре  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Свежeweделенные штаммы резидентных лактобацилл исследовали без пассирования. Для рас-

чета средних значений титров биомассы посев каждого вида лактобацилл осуществляли в десяти повторностях.

Концентрацию жизнеспособных лактобацилл в приготовленном лактобактерине определяли методом десятикратных серийных разведений при помощи дозатора фирмы «Ленпипет» по 0,5 мл в объеме 4,5 мл жидкой среды.

Определение титруемой кислотности проводили общепринятым методом [10].

Статистическая обработка полученных данных проведена на персональном компьютере с использованием программ «Биостатистика» (primer of Biostatistics version 4.03 by Stanton A. Glantz); «Instat – 2» (GraphPad Instat tm Copyright (c) 1990 – 1994 GraphPad Software. V2. 05a; SIGMA I-6140 Lot 116H1240). Проведено непараметрическое множественное сравнение при помощи критерия Ньюмена-Кейлса (q). Критические значения критерия Ньюмена-Кейлса для бесконечного числа степеней свободы ( $v = \infty$ ):  $q = 2,772$  для интервала сравнения  $l = 2$ ;  $q = 3,314$  для  $l = 3$ ;  $q = 3,633$  для  $l = 4$ ;  $q = 3,858$  для  $l = 5$  [2]. Определение влияния продолжительности хранения на жизнеспособность *L. acidophilus* 317/402 в лактобактерине проведено при помощи критерия Даннета ( $q'$ ) – непараметрического множественного сравнения для выборок равного объема. Критическое значение  $q' = 2,44$  для интервала сравнения  $l = 5$  и  $v = \infty$  [2]. Критический уровень значимости (P) при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05 [2].

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные нами исследования показали, что выращивание *L. acidophilus* 317/402 на широко известной молочно-дрожжевой среде [7] позволяет получить максимальную концентрацию био-

массы  $6 \times 10^8$  КОЕ/мл. Однако в результате хранения при температуре  $4 \pm 2$  °С в течение 2 месяцев титр жизнеспособных клеток лактобацилл понизился до  $10^3$  КОЕ/мл. Изучение ростовых качеств модифицированной питательной среды посевом разных представителей рода *Lactobacillus* (табл. 1) показало, что все тест-штаммы, как промышленные, так и свежевыделенные из фекалий, активно накапливают биомассу в течение 18 ч при температуре 39 °С. Среди производственных штаммов лактобацилл наибольшей энергией роста обладал *L. acidophilus* 317/402 – средний титр  $9,6 \pm 0,34$  ( $M \pm \sigma$ , Lg КОЕ/мл), наименьшей – *L. acidophilus* КЗ III 24, средний титр которого составил  $8,9 \pm 0,45$  ( $M \pm \sigma$ , Lg КОЕ/мл). Из числа свежееизолированных (индигенных) резидентных кишечных лактобацилл самой высокой продуктивностью отличались штаммы видов *L. plantarum* ( $11,1 \pm 0,41 M \pm \sigma$ , Lg КОЕ/мл) и *L. cellobiosus* ( $10,4 \pm 0,29 M \pm \sigma$ , Lg КОЕ/мл), полученные от мышей.

Для статистического анализа возможных различий в накоплении биомассы лактобацилл, принадлежащих к одному виду, были проведены непараметрические множественные сравнения первичных данных среди пяти представителей вида *L. acidophilus* и для двух штаммов вида *L. plantarum* при помощи критерия Ньюмена-Кейлса. Установлены статистически значимые различия в концентрации биомассы для *L. acidophilus* 317/402 и *L. acidophilus* КЗ III 24 ( $q = 6,784, l = 5$ ), *L. acidophilus* 317/402 и *L. acidophilus* M100 ( $q = 3,918, l = 4$ ), *L. acidophilus* 2 и *L. acidophilus* КЗ III 24 ( $q = 4,395, l = 4$ ), *L. acidophilus* NK1 и *L. acidophilus* КЗ III 24 ( $q = 3,631, 3$ ), *L. acidophilus* M100 и *L. acidophilus* КЗ III 24 ( $q = 2,867, l = 2$ ). Различия в концентрации биомассы у *L. plantarum* и *L. plantarum* 8РАЗ также статистически значимы ( $q = 5,345, l = 2$ ). Следовательно, накопление биомассы лактобацилл при культивировании в одинаковых условиях является штам-

Таблица 1

#### Накопление биомассы лактобациллами различного происхождения

№ пп	Вид лактобацилл	Происхождение штаммов	Титр лактобацилл, Lg КОЕ/мл	
			$M \pm \sigma$ (n = 10)	Доверительный интервал 95 %
1	<i>L. acidophilus</i> КЗ III 24	Производственные пробиотические	$8,9 \pm 0,45$	$8,5 \div 9,2$
2	<i>L. acidophilus</i> M100	–	$9,2 \pm 0,24$	$9,0 \div 9,3$
3	<i>L. acidophilus</i> NK 1	–	$9,2 \pm 0,37$	$9,0 \div 9,5$
4	<i>L. acidophilus</i> 317/402	–	$9,6 \pm 0,34$	$9,3 \div 9,8$
5	<i>L. plantarum</i> 8РАЗ	–	$9,1 \pm 0,31$	$8,8 \div 9,3$
6	<i>L. acidophilus</i> 2	Фекалии белой мыши	$9,3 \pm 0,15$	$9,2 \div 9,4$
7	<i>L. cellobiosus</i>	–	$10,4 \pm 0,29$	$10,1 \div 10,6$
8	<i>L. plantarum</i>	–	$11,1 \pm 0,41$	$10,8 \div 11,4$
9	<i>L. coprophilus</i>	Фекалии человека	$9,6 \pm 0,73$	$9,1 \div 10,1$
10	<i>L. delbrueckii</i>	–	$9,9 \pm 0,52$	$9,5 \div 10,2$

Примечание: n – число определений; M – среднее; s – стандартное отклонение; Lg – десятичный логарифм; КОЕ – колониеобразующая единица.

моспецифическим свойством и не зависит от их видовой принадлежности.

Исследование динамики изменения концентрации биомассы *L. acidophilus* 317/402 (Lg КОЕ/мл) и титруемой кислотности (°Т) в лактобактерине на протяжении четырехмесячного хранения при температуре  $4 \pm 2$  °С показано в таблице 2.

Было проведено непараметрическое множественное сравнение первичных данных (титров лактобактерина,  $n = 10$ ) при помощи критерия Даннета для пяти моментов наблюдения (после изготовления и в течение четырех месяцев). Установлено, что через 1 и 2 месяца хранения концентрация биомассы не изменилась по сравнению с исходной ( $q'_2 = 2,109, l = 5$ ). Статистически значимые снижения концентрации жизнеспособных лактобацилл наступили через 3 и 4 месяца хранения ( $q'_3 = 2,661$  и  $q'_4 = 5,208$ , соответственно).

### ВЫВОДЫ

Известно, что в клинической практике используются две основные формы пробиотических препаратов: жидкая и лиофилизированная. По мнению Ю.В. Козьминых и соавт. жидкие пробиотики значительно эффективнее сухих сублимированных препаратов [8]. По данным Л.Н. Петрова оптимальной формой применения жидких лактопробиотиков являются кисломолочные продукты [9]. Однако такие формы пробиотиков имеют малый срок годности, например, кисломолочный продукт «Витафлор» на основе симбиотических лактобацилл хранится в течение 3 – 5 дней [9].

Лактобактерин, приготовленный из *L. acidophilus* 317/402 на предложенной нами питательной среде, обеспечивает сохранение жизнеспособности лактобацилл при температуре  $4 \pm 2$  °С не менее чем 9 и 7 Lg КОЕ/мл в течение 2 и 4 месяцев, соответственно. Существенным моментом при изготовлении лактобактерина является своевременная остановка развития культуры на стационарной фазе, когда в среде накапливается оптимальное количество экзометаболитов, обеспечивающих наибольшую стойкость культуры при хранении и облегчающих адаптацию ее при попадании в новые условия. Необходимо обратить внимание на низкую титруемую кислотность лактобактерина, при-

готовленного на основе *L. acidophilus* 317/402 (от 70,8 до 76,2 °Т), что также способствует длительному сохранению жизнеспособности лактобацилл. Низкая кислотность лактобактерина связана с отсутствием в составе питательной среды глюкозы, наличие которой способствует интенсивному накоплению кислых продуктов метаболизма.

Продолжительное сохранение жизнеспособности лактобацилл в модифицированной среде связаны, вероятно, с высокой концентрацией дрожжевого аутолизата. По данным А.М. Скородумовой внесение дрожжей при длительном хранении закваски значительно повышает стойкость молочнокислых бактерий [10]. Следует отметить, что по утверждениям Е.Г. Борисенко и С.Ю. Солдатовой дрожжевые продукты обладают выраженным пребиотическим лакто- и бифидогенным действием, повышая при их приеме содержание этих бактерий в организме на 1 – 2 порядка [1]. Следовательно, лактобактерин, приготовленный на разработанной нами среде, может оказывать дополнительное пробиотическое действие на резидентную флору пациента.

Состав модифицированной питательной среды отвечает потребностям разных видов и штаммов лактобацилл. Наши исследования показали, что предложенная питательная среда обеспечивает накопление биомассы всех использованных в опытах штаммов лактобацилл в пределах от  $8,9 \pm 0,45$  до  $11,1 \pm 0,41$  ( $M \pm \sigma$ , Lg КОЕ/мл). Эти значения соответствуют регламентируемому содержанию жизнеспособных клеток в одной дозе пробиотика, которое составляет от 6 до 10 Lg КОЕ/мл, в зависимости от препарата [6]. Низкая концентрация ацетата, присутствующая в модифицированной среде, по-видимому, способствует активному накоплению биомассы лактобацилл. Т.Я. Вахитов и соавт. отмечают, что ацетат в низких концентрациях способен стимулировать рост бактериальной культуры, а в высоких – оказывать ингибирующее действие [11]. Разработанная питательная среда проста и физиологична по составу, позволяет осуществлять приготовление лактобактерина на основе штаммов, индивидуально подобранных для пациента и оказывающих оптимальное профилактическое и/или лечебное действие.

Таблица 2

Динамика показателей качества лактобактерина при хранении

Интервал наблюдения	Титр лактобацилл $M \pm \sigma$ , Lg КОЕ/мл ( $n = 10$ )	*Титруемая кислотность, °Т
Исходные значения	$9,6 \pm 0,34$	70,8
Через 1 мес.	$9,4 \pm 0,35$	71,5
Через 2 мес.	$9,2 \pm 0,23$	72,4
Через 3 мес.	$9,0 \pm 0,19$	73,7
Через 4 мес.	$7,9 \pm 0,20$	76,2

Примечание: \* – титруемую кислотность определяли из средней пробы, объединением остатков содержимого флаконов ( $n = 10$ ) после отбора проб для определения титра.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисенко Е.Г. Дрожжевые пробиотики: технология и биологическое действие / Е.Г. Борисенко, С.Ю. Содатова // Пробиотические микроорганизмы — современное состояние вопроса и перспективы использования: Сб. матер. междунар. науч.-практ. конф. памяти Г.И. Гончаровой. — М., 2002. — С. 76.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. — М.: Практика, 1999. — 459 с.
3. Глушанова Н.А. Экспериментальное изучение колонизации кишечника гомопробиотиками / Н.А. Глушанова // Сибирский медицинский журнал. — 2004. — Т. 19, № 1. — С. 48—51.
4. Глушанова Н.А. Экспресс-метод определения максимального накопления живых клеток лактобактерий / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Б.М. Дворецкий // Бюл. лабораторной службы: Информационное издание Красноярской краевой Ассоциации медицинской лабораторной диагностики. — 1998. — Вып. 6. — С. 23—25.
5. Доронин А.Ф. Функциональное питание / А.Ф. Доронин, Б.А. Шендеров. — М.: Грантъ, 2002. — 296 с.
6. Иммунобиологические препараты и перспективы их применения в инфектологии / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.А. Алешкина, С.С. Афанасьева, В.В. Поспеловой. — М.: ГОУ ВУНМЦ Минздрава РФ, 2002. — 608 с.
7. Инструкция по изготовлению кисломолочного бифилакта на молочных кухнях № 11-14/6-33: Утв. МЗ СССР от 27.03.87. М.: МЗ СССР, 1987. — 12 с.
8. Козьминых Ю.В. Подбор и конструирование питательных сред для производства жидких пробиотиков / Ю.В. Козьминых, А.В. Малков, В.Н. Марков // Пробиотические микроорганизмы — современное состояние вопроса и перспективы использования: Сб. матер. междунар. науч.-практ. конф. памяти Г.И. Гончаровой. — М., 2002. — С. 77—78.
9. Петров Л.Н. Витафлор. Бактерийный препарат нового поколения для лечения и профилактики дисбактериозов / Л.Н. Петров. — СПб.: Санкт-Петербургская торгово-промышленная палата, 2003. — 68 с.
10. Скородумова А.М. Диетические и лечебные кисломолочные продукты (микробиологические основы). 2-е изд. / А.М. Скородумова. — МЕД-ГИЗ, Ленинградское отделение. — 1961. — 203 с.
11. Состав и биологическая активность экзо-метаболитов *Escherichia coli* М-17 / Т.Я. Вахитов, Е.Н. Момот, О.Н. Шалаева, Л.Н. Петров // Журн. микробиол. — 2003. — № 6. — С. 20—25.
12. Способ выделения бактерий рода *Lactobacillus* из клинического материала: Пат. 2178171 Россия, МКИ С177 G 01 N 33/48, С 12 N 1/20. / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Б.М. Дворецкий (Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей). № 2000119999/14. Заявл. 26.07.2000. Опубл. 10.01.2002, Бюл. № 1.
13. Тюрин М.В. Антибиотикорезистентность и антагонистическая активность лактобацилл.: Дис. ... канд. мед. наук. — М., 1990. — 146 с.
14. Шендеров Б.А. Микробиологическая характеристика некоторых анаэробных грамположительных необразующих споры бактерий, обитающих в организме человека / Б.А. Шендеров // Медицинские аспекты микробной экологии. — М., 1991. — С. 6—17.
15. Holzapfel W.H. Introduction to pre-and probiotics / W.H. Holzapfel, U. Schilinger // Elsevier Science Ltd. — Food Research International. — 2002. — Vol. 35. — P. 109—116.