

Младзиевская

На правах рукописи

МЛАДЗИЕВСКАЯ Юлия Артуровна

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
ПРОИЗВОДСТВА И МЕТОДОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА
ПРОБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ
БИФИДОБАКТЕРИЙ И ЛАКТОБАЦИЛЛ**

03.00.23 Биотехнология

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт - Петербург – 2005

Работа выполнена в ГОУВПО «Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия» и в Санкт-Петербургском НИИ вакцин и сывороток и предприятии по производству бактериальных препаратов.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук профессор

Королук Александр Михайлович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук профессор

Рыбальченко Оксана Владимировна

доктор биологических наук профессор

Заикина Надежда Александровна

Ведущая организация:

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА, г. Санкт-Петербург

Защита состоится «27» декабря 2005 г. в 14 часов на заседании Диссертационного совета К 208.088.01 при ГОУВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия» по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 14, СПбХФА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУВПО «Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия».

Автореферат разослан «21» ноября 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета



Каравеева Анна Владимировна

2006-4
25866

2243178

1

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

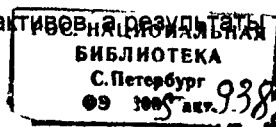
В последние годы на Российском рынке появилось много пробиотических препаратов и БАДов на основе живых микроорганизмов. Характеристика их эффективности представлена в большом потоке научных публикаций (Нисевич Н.И. с соавт., 1999; Лыкова Е.А. с соавт., 2003; Pereira D.I.A. et al., 2002).

Наиболее часто в бактериотерапии, а также при производстве БАДов и продуктов функционального питания используют бифидобактерии и лактобациллы. Эти пробиотики называют классическими, так как их активным началом являются штаммы, выделенные из кишечника человека и доминирующие в нем с первых дней жизни (Sperti G.S., 1971; Hatakka K. et al., 2001). Кроме того, именно лактобациллам и бифидобактериям присуща способность к колонизации эпителиальных тканей (Коршунов В.М. с соавт., 1999; Чумаева Т.В. с соавт., 2002; Jacobsen C.N. et al., 1999; Tuomola E. et al., 2001).

Рекомендованные к применению стандартные рецептуры питательных сред для культивирования производственных штаммов бифидобактерий и лактобацилл, как правило, требуют дополнительной корректировки для придания им желаемых ростовых свойств. Поэтому важной задачей в процессе оптимизации питательных сред является не только выбор доступного и недорогого сырья и полуфабрикатов, но и получение на их основе высококачественных и конкурентоспособных пробиотиков (Елинов Н.П., 1995; Абрамов Н.А. с соавт., 1996; Терновская Л.Н. с соавт., 1996; Андреева М.А. с соавт., 1998).

В процессе биотехнологического производства пробиотических препаратов и продуктов на основе лактобацилл и бифидобактерий значимое место отводится разработке методов поддержания стабильности высококонцентрированных микробных биомасс (Ильницкая И.Ю. с соавт., 1986; Несисляев В.А., 1996; Новик Г.Н. с соавт., 1998; Мурашова А.О. с соавт., 2000). Эта проблема в настоящее время очень актуальна, так как этап лиофилизации все еще является дорогостоящим и энергоемким процессом на многих производствах. Поэтому поиску альтернативных путей поддержания стабильности микробных биомасс всегда уделяется особое внимание.

Важное значение на предприятиях биотехнологического производства имеет контроль готовой продукции (Чупринина Р.П. с соавт., 1995; Рыбачок А.В., 1995; Мохов Д.А. с соавт., 2002). Методы микробиологического контроля разнообразной лакто- и бифидосодержащей пробиотической продукции довольно часто трудоемки, требуют специального оборудования, дорогостоящих питательных сред и реактивов.



контроля не всегда дают точную информацию. Хотя в последние годы появился ряд новых предложений по их оптимизации (Ганина В.И. с соавт., 1999; Мурашова А.О., 2000; Несчисляев В.А. с соавт., 2002; Арчакова Е.Г., 2004), необходимость разработки новых более совершенных и доступных методов контроля не вызывает сомнений.

Для препаратов, выпускаемых на основе давно известных производственных штаммов, часто возникает проблема постепенного снижения уровня их антагонистической активности, что в конечном итоге отражается на лечебно-профилактической эффективности пробиотика. Таким образом, необходим поиск пути увеличения антагонистической активности подобных штаммов.

Все вышеизложенное свидетельствует о том, что, несмотря на уже имеющиеся достижения в области биотехнологии пробиотиков, задача ее дальнейшего совершенствования остается чрезвычайно актуальной.

Цель настоящего исследования.

Цель настоящей работы состояла в усовершенствовании состава питательных сред для культивирования бифидобактерий и лактобацилл и контроля качества пробиотических препаратов; изыскании способов стабилизации бактериальных биомасс и путей повышения уровня антагонистической активности производственных штаммов.

Основные задачи исследования.

1. Оптимизация состава питательных сред для культивирования производственных штаммов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и *Bifidobacterium bifidum* 1 и их производственных биомасс.
2. Усовершенствование лабораторного контроля и разработка селективных сред для количественного учета бифидобактерий в комплексных пробиотических препаратах и молочнокислых заквасках.
3. Изыскание доступных способов стабилизации микробных биомасс и полуфабрикатов.
4. Оценка значимости применения набора методов определения антагонистической активности бифидобактерий и лактобацилл при отборе перспективных производственных штаммов.
5. Поиск путей повышения уровня антагонистической активности производственных штаммов бифидобактерий.

Научная новизна.

Доказана прямая зависимость антагонистической активности и уровня кислотообразования, которая присуща только пробиотическим штаммам лактобацилл. Предложена методика определения контрантагонистической резистентности бифидобактерий (обратного антагонизма) в смешанных культурах. Показано, что антагонистическая активность бифидобактерий повышается в процессе их совместного культивирования с шигеллами. Обнаружено, что тиосодержащие органические соединения, способные замедлять окислительные процессы, в частности, унитиол, способны пролонгировать сохранность бифидобактерий.

Практическая значимость работы.

Усовершенствован состав питательных сред МРС-1, КД-5, среды Блаурокка и казеиново-дрожжевой среды для выращивания производственных штаммов бифидобактерий и лактобацилл, лежащих в основе производства Бифидумбактерина сухого и Лактобактерина сухого. Их прописи включены в нормативную производственную документацию предприятия СПбНИИВС (РП № 1547-04 на Бифинорм® Бифидумбактерин сухой и РП № 46-96 на Лактобактерин сухой и ФСП 42-0022-5808-04 на Бифинорм ® Бифидумбактерин сухой). Разработан состав среды для селективного выделения бифидобактерий из их смеси с энтеробактериями, которая позволяет выполнить контроль специфической активности препарата Бификол сухой. Оптимизирован состав питательной среды для дифференциации лактобактерий и термофильного стрептококка на основе рецептуры коммерческого продукта фирмы Hi Media из отечественных полуфабрикатов и реактивов. Предложено использование унитиола для стабилизации биомасс бифидобактерий и полуфабрикатов на их основе. Дана оценка целесообразности проведения комплекса методов по контролю антагонистической активности лактобацилл и бифидобактерий, перспективных в качестве производственных штаммов. Предложен метод определения контрантагонистической резистентности бифидобактерий (обратного антагонизма) в смешанных культурах с использованием налидиксовой кислоты. Изложены результаты селекционной работы с целью повышения антагонистической активности исходного производственного штамма *Bifidobacterium bifidum* 1 при использовании метода его совместного культивирования с энтеробактериями.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Предложен комплекс питательных сред на основе полуфабрикатов собственного производства, оптимизирующий процесс производства и контроля качества бифидо- и лактосодержащих пробиотических препаратов.

2. Применение унитиола для стабилизации биомассы бифидобактерий достоверно увеличивает сохранность первоначальной концентрации живых микробных клеток в интервале температур от 2 до 20 °С.

3. Изменение уровня антагонистической активности исходного производственного штамма бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 1 может быть достигнуто в процессе его пассирования в микст-культурах с тест-штаммами шигелл.

Апробация работы и публикации.

Основные положения работы доложены на юбилейной научно-технической конференции ГосНИИ ОЧБ (Санкт-Петербург, 2000), Всероссийской научной конференции молодых ученых (Уфа, 2004), 2-й Международной конференции «Наука – Бизнес – Образование; Биотехнология – Биомедицина – Окружающая среда» (Пушино, 2005) заседании общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов НИИ им. Пастера (Санкт-Петербург, 2005).

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ.

Объем и структура диссертации.

Работа изложена на 207 страницах машинописного текста, содержит 26 таблиц и 27 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 216 литературных источников, из них 113 отечественных авторов и 103 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования.

Производственные штаммы бифидобактерий: *B. bifidum* 1, *B. longum*, *B. adolescentis* MC-42, *B. lactis* Bb-12 и свежевыделенные из кишечника здоровых детей штаммы бифидобактерий.

Производственные штаммы лактобацилл: *L. plantarum* 8P-A3, *L. acidophilus* 20T, *L. acidophilus* 22n, *L. acidophilus* 5e₁₃, *L. acidophilus* 7m₁₃, *L. acidophilus* 7m,

L.acidophilus La-5 и свежевыделенные штаммы лактобацилл, полученные из бактериологической лаборатории СПбГПМА и Института акушерства и гинекологии им. Д.А. Отта РАМН.

Производственный штамм *Escherichia coli* M-17.

Производственный штамм термофильного стрептококка *S.thermophilus* St-body 1.

Штаммы условно-патогенной микрофлоры, полученные из бактериологической лаборатории Института акушерства и гинекологии им. Д.А. Отта РАМН.

Набор тест-штаммов для определения антагонистической активности производственных штаммов лактобацилл: *Shigella flexneri* (штаммы № 170 и № 331), *Shigella sonnei* (штамм 5063), *Escherichia coli* (энтеропатогенный штамм 157), *Staphylococcus aureus* (штамм 209), *Proteus vulgaris* (штамм 177) и *Proteus mirabilis* (штамм 237).

Стандартные питательные среды для выращивания бифидобактерий, лактобацилл, термофильного стрептококка и кишечной палочки.

Методы исследования.

Количество жизнеспособных клеток и бифидобактерий в 1 мл определяли с помощью десятикратных разведений в среде Блаурокка (ФС 42-3947-00 на Бифидумбактерин сухой).

Количество жизнеспособных клеток лактобацилл и кишечных палочек в 1 мл определяли с помощью десятикратных разведений в 0,9 % растворе NaCl с последующими количественными высевами на плотные питательные среды (ФС 42-0054-00 на Лактобактерин сухой, ФС 42-3268-96 на Бификол сухой).

Прямую антагонистическую активность лактобацилл определяли методом отсроченного антагонизма с помощью перпендикулярных штриховых подсевок тест-штаммов к культуре-антагонисту на плотной питательной среде.

Прямую антагонистическую активность бифидобактерий определяли: 1) методом отсроченного антагонизма с помощью перпендикулярных штриховых подсевок тест-штаммов к культуре-антагонисту на плотной питательной среде МРС-5 в анаэробных условиях с использованием анаэростана и газогенерирующих пакетов типа Gas Pack; 2) на основе метода смешанных культур (по ФС 42-3268-96 на Бификол сухой).

Контрантагонистическую резистентность лактобацилл определяли методом отсроченного антагонизма на плотной питательной среде МРС-5 с помощью штриховых подсевок лактобацилл к штаммам-антагонистам.

Определение контрантагонистической резистентности бифидобактерий осуществляли методом смешанных культур при их совместном культи-

вировании с тест-штаммами шигелл с последующим выделением бифидобактерий в чистую культуру в среде Блаурокка с НК.

Изо- и гомоантагонистическую активность лактобацилл определяли методом отсроченного антагонизма с помощью штриховых подсевок штаммов лактобацилл на плотной питательной среде МРС-5.

Активность кислотообразования бифидобактерий и лактобацилл, выражаемую в °Т, определяли титриметрическим методом.

Определение равномерности разлива препарата Бифидумбактерина сухого проводили по МУК 4.1/4.2-588-96.

Обработка результатов исследований проводилась с помощью электронных таблиц Microsoft Excel. Достоверность различий между группами данных оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $t > t_{0,5}$ ($p < 0,05$). Взаимосвязь между группами оценивали с помощью коэффициента корреляции (r). Повторяемость опытов (n) 4-6-кратная. Равномерность разлива препарата определяли с помощью коэффициента вариации (V).

Основные исследования, а также анализ полученных результатов проводились лично автором в научно-производственном комплексе «Эубиотические препараты» СПбНИИВС.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Усовершенствование состава питательных сред для производственного культивирования бифидобактерий и лактобацилл

На этапе выбора оптимальных питательных сред для производства пробиотической продукции на основе лактобацилл проводили сравнительное изучение ростовых свойств нескольких их вариантов. Были усовершенствованы составы выбранных производственных питательных сред - среды МРС-1 и казеиново-дрожжевой среды. Показана возможность исключения из состава среды МРС-1 Твина-80, отсутствие которого не влияло на прирост биомассы производственного штамма *L. plantarum* 8P-A3.

Были откорректированы рецептуры модифицированной среды Блаурокка и среды КД-5 для культивирования биомассы бифидобактерий. Эти среды изготавливаются на предприятии из собственных полуфабрикатов, а их прописи находятся в составе регламентов производства на Лактобактерин сухой и Бифинорм® Бифидумбактерин сухой.

Проведено изучение возможности частичной замены в питательной среде Блаурокка печеночного экстракта более доступным – дрожжевым. При выборе оптимальных соотношений дрожжевого и печеночного экстрактов (ДЭ и ПЭ), вводимых в состав среды Блаурокка, выявлено, что внесение ДЭ и ПЭ в процентном соотношении 75:25 соответственно может дать достоверно больший прирост биомассы бифидобактерий, чем ее исходный вариант (100% ПЭ).

При оптимизации состава питательной среды КД-5 для получения маточной культуры *B.bifidum* 1 показана целесообразность создания более плотного варианта среды за счет увеличения в ее составе количества агар- агара (с 0,75 г/л до 1,2 г/л). При этом достигается достоверно больший прирост биомассы бифидобактерий и не превышающая показатель 5% равномерность разлива полуфабриката Бифидумбактерина сухого.

Усовершенствование состава питательных сред для контроля качества пробиотических препаратов и продуктов

На базе отделения питательных сред СПбНИИВС был откорректирован рецепт приготовления дифференциальной среды фирмы Hi Media для количественного учета термофильных стрептококков и болгарской палочки.

Нами заменены углеводы и экстракты зарубежного производства (декстроза, соевый пептон, говяжий и дрожжевой экстракты) на отечественные (глюкоза, пептон ферментативный сухой), а также на собственные (мясной и дрожжевой экстракты). Применение этой среды не только полужидкой, как предлагает производитель, но и в плотном варианте позволяет проводить количественный учет КОЕ микроорганизмов, растущих на поверхности среды и образующих колонии, различные по форме и окраске.

При разработке селективной среды для выделения бифидобактерий из их смеси с энтеробактериями была успешно применена добавка налидиксовой кислоты (невиграмона) к среде Блаурокка. Было установлено, что налидиксовая кислота (НК) способна эффективно подавлять рост кишечной палочки в концентрации (0,00375 г/л), гораздо меньшей предложенной в «Методических рекомендациях по микробиологической диагностике раневых инфекций» (1999 г) (0,03 г/л). Это также на несколько порядков меньше селективной добавки азида натрия (0,1 г/л). Вместе с тем было установлено, что она минимально ингибирует рост бифидобактерий, позволяя получать достоверно большее число их КОЕ/мл в контрольных посевах.

Для изучения возможности выделения бифидобактерий из смеси

с лактобациллами и термофильным стрептококком было проведено сравнительное изучение селективного действия 3-х видов антибиотиков (канамицина, левомицетина и линкомицина). Было показано, что самым уязвимым к действию антибиотиков штаммом бифидобактерий оказался *B.bifidum* 1, входящий в состав препарата Бифидумбактерин сухой. Рост других штаммов бифидобактерий в присутствии 250 мкг/мл канамицина и 2,5 мкг/мл левомицетина практически не подавлялся. Таким образом, определенными сочетаниями антибиотиков мы получили полное подавление роста лактобацилл и термофильного стрептококка.

Для селективного выделения бифидобактерий *B.lactis* Bb-12 из закваски АТВ-5 (фирма Hansen), дополнительно содержащей *Lactobacillus acidophilus* La-5 и *Streptococcus thermophilus* ST-body 1, проводилось изучение ростовых свойств полужидких сред - ГМС и дифференциальной среды с добавками двух антибиотиков (Табл.1).

Таблица 1

Сравнительное изучение ростовых свойств селективных сред при количественных посевах из молочнокислых продуктов (n=6)

Посевной материал	Полужидкая ГМС с антибиотиками (КОЕ/мл)	Полужидкая дифференциальная среда с ТТХ и антибиотиками (КОЕ/мл)	Среда Блаурокка с антибиотиками (КОЕ/мл)
Обрат, заквашенный <i>B.lactis</i> Bb-12	$(5,8 \pm 0,7) \cdot 10^7$	$(5,6 \pm 0,6) \cdot 10^7$	$(5,4 \pm 0,5) \cdot 10^7$
Обрат, заквашенный <i>L.acidophilus</i> La-5	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Обрат, заквашенный <i>S.thermophilus</i> St-body-1	Нет роста	Нет роста	Нет роста
Обрат, заквашенный АТВ-5	$(2,8 \pm 0,6) \cdot 10^6$	$(3,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(3,4 \pm 0,6) \cdot 10^6$

Оценка полученных результатов позволила сделать вывод о целесообразности применения обоих вариантов питательной среды с селективными добавками для контроля количества жизнеспособных *B.lactis* Bb-12, входящих в состав трехкомпонентной закваски АТВ-5. Поэтому при

проведении контроля кисломолочных продуктов на основе этих штаммов можно рекомендовать такие полужидкие питательные среды с добавками антибиотиков (250 мкг/мл канамицина и 2,5 мкг/мл левомицетина).

Применение унитиола для стабилизации микробных биомасс

Способность тиосодержащих органических соединений, замедляющих окислительные процессы, в частности унитиола, оказывать стабилизирующий эффект на культуру бифидобактерий – одно из новых и интересных свойств этого соединения, относящегося к группе антидотов тиоловых ядов.

Из всех исследованных штаммов *B. bifidum* 1, *L. plantarum* 8P-A3 и *E. coli* M-17 унитиол (У) оказал защитное действие только на бифидобактерии. Это было обнаружено при определении динамики снижения количества КОЕ/мл в течение месяца при температуре (2 – 10) °С в трех вариантах бактериальных биомасс с У.

Конечная концентрация У 1% в среде культивирования, с одной стороны, частично ингибировала растущую культуру бифидобактерий. С другой стороны, при введении этого количества У в готовую биомассу выявлен максимальный эффект пролонгирования сохранности первоначального количества жизнеспособных клеток.

Этот препарат в конечной концентрации 1% оказал длительное защитное действие (до 135 сут) на биомассу бифидобактерий не только в герметично закупоренных, но и в периодически вскрываемых флаконах с резиновыми пробками (до 120 сут).

При разливе биомассы в малых количествах в большую тару (1:5), закрытую ватно-марлевой пробкой, присутствие 1% У позволило сохранить исходный уровень жизнеспособных КОЕ/мл в течение 21 сут (в контроле он упал на 5 порядков).

Благодаря добавлению У в готовую биомассу появилась возможность пролонгированного хранения бифидобактерий даже при условиях, когда температура бытовых холодильников составляла (6 – 10) °С (Рис. 1 и 2).



Рис.1. Контроль КОЕ/мл клеток во вскрываемых флаконах с биомассой бифидобактерий, содержащей унитиол

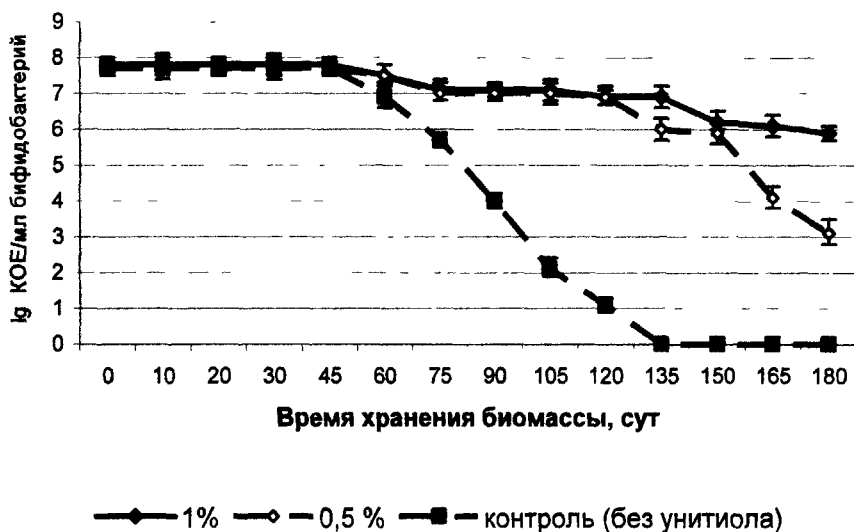


Рис.2. Контроль КОЕ/мл клеток в герметично закупоренных флаконах с биомассой бифидобактерий, содержащей унитиол

Отмечено, что при содержании 0,5% У в составе готовых полуфабрикатов Бифидумбактерина и Бификолы сухого существенно продлевается срок их хранения с заданным количеством КОЕ/мл (до 165 сут) (Рис.3 и 4). Та же

концентрация У в составе биомассы бифидобактерий, не содержащей защитной сахарозо-желатино-молочной среды, оказывает стабилизирующий эффект в меньшей степени (до 120 сут).

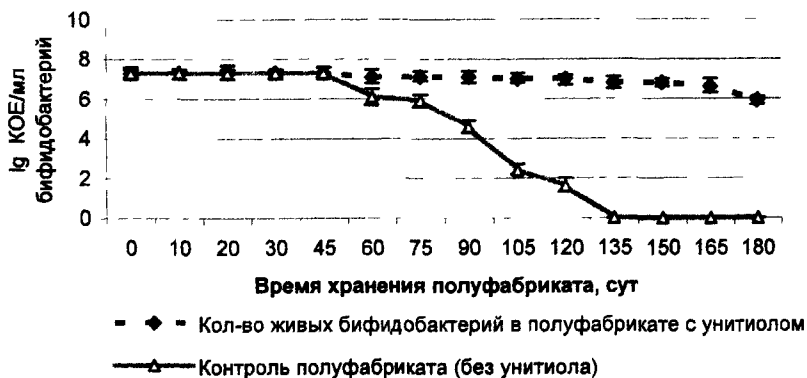


Рис.3. Контроль КОЕ/мл бифидобактерий во флаконах с полуфабрикатом Бифидумбактерина сухого с 0,5% унитиола

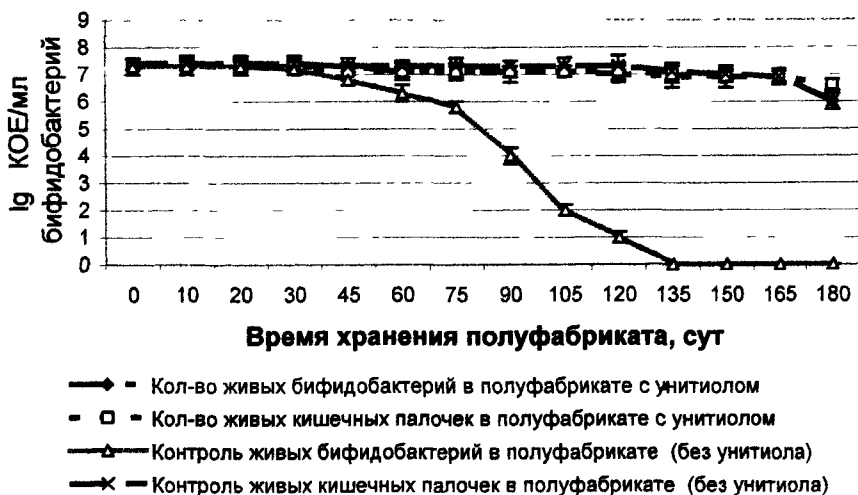


Рис. 4. Контроль КОЕ/мл бифидобактерий и кишечных палочек во флаконах с полуфабрикатом Бификолы сухого с 0,5% унитиола

Представляет большой интерес тот факт, что при внесении У в состав питательной среды появляется возможность без обязательной предварительной процедуры нейтрализации длительно сохранять жизнеспособность отдельных колоний бифидобактерий для дальнейших пересевов при временной невозможности немедленной лиофилизации культуры. Способность У стабилизировать жизнеспособность бифидобактерий в питательной среде не только в условиях холодильника, но и при комнатной температуре, может быть полезной при их транспортировке с возможным повышением температуры окружающей среды. Было отмечено стабилизирующее действие добавки 0,5% У в среду Блаурокка, которая оказалась эффективной даже в условиях хранения бифидобактерий при комнатной температуре. Жизнеспособность отдельных колоний на среде с У сохранялась более месяца, в то время как в контроле способность к росту терялась через 3 недели, а в посевах, хранившихся при комнатной температуре – уже по истечении 2-й недели хранения.

Изучение антагонистической активности лактобацилл и бифидобактерий и оптимизация методов ее определения

При контроле препаратов, содержащих нескольких антагонистически активных штаммов лактобацилл, было установлено, что при удовлетворительном уровне прямого антагонизма может быть достаточно низким уровень их контрантагонистической резистентности (обратного антагонизма).

Контроли прямой антагонистической активности (АА) и контрантагонистической резистентности (КР) лактобацилл достаточно просты в исполнении. Они были использованы при отборе антагонистически активных штаммов лактобацилл, выделенных из женской половой сферы, и исследования их: а) прямой АА против набора из 30 тест-культур вагинального происхождения и б) КР при использовании в качестве тест-культур грибов рода *Candida*.

Были изучены антагонистические свойства производственных и свежесделанных штаммов лактобацилл с помощью метода отсроченного антагонизма на плотной питательной среде между разными штаммами лактобактерий (изоантагонизм) и между одними и теми же штаммами (гомоантагонизм) (Несчислаев В.А. с соавт., 2002). Замечено, что чем больше зона подавления роста при контроле гомоантагонизма (ГА), тем больше культура проявляет изоантагонистические (ИА) свойства.

При сравнении уровня ИА и ГА производственных штаммов лактобацилл была выявлена практически полная корреляция между этими показателями ($r = 0,98$). При исследовании показателей ИА и ГА свежевыделенных штаммов лактобацилл обнаружена лишь слабая обратная зависимость ($r = - 0,4$).

Для определения АА 4-х производственных штаммов бифидобактерий методом отсроченного антагонизма не всегда можно вырастить чистую культуру бифидобактерий на поверхности плотных сред. Нами был использован другой метод определения АА бифидобактерий, не требующий создания специальных анаэробных условий – совместное выращивание бифидобактерий с тест-штаммами шигелл в толще полужидкой питательной среды с последующими высевами на среду Эндо (для учета количества живых клеток шигелл) и на среду Блаурокка с НК (для выделения чистой культуры бифидобактерий из смеси с шигеллами). Исследования проводились параллельно в двух вариантах: с соотношением вносимых культур 0,1:1 (по ФС на Бификол сухой) и 1:1 (Новик Г.Н. с соавт., 1998).

Было установлено, что самой низкой степенью АА обладает производственный штамм *B.bifidum* 1 (Рис. 5).

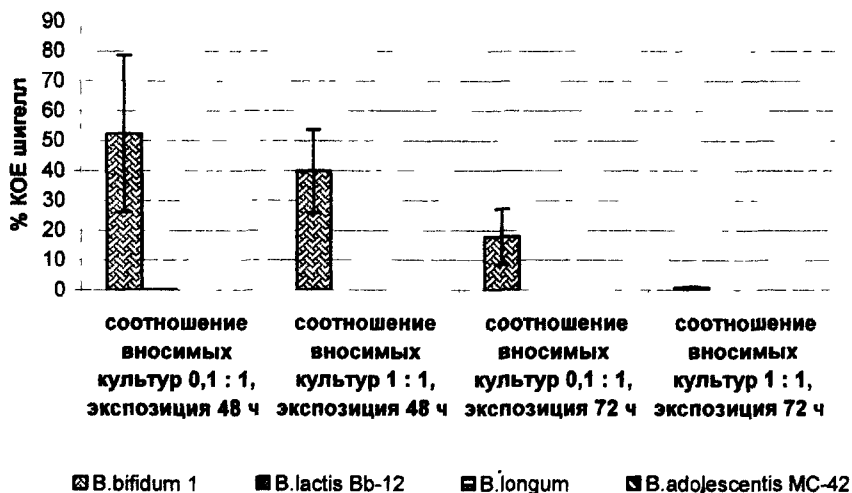


Рис.5. Сравнительная характеристика уровня прямой антагонистической активности производственных штаммов бифидобактерий

Примечание: У штаммов *B.lactis* Bb-12, *B.longum* и *B.adolescentis* MC-42 (отсутствие столбцов на диаграмме) % КОЕ шигелл в пробах не превышал показатель 0,1%.

Снижение КР бифидобактерий (менее 100%) имело место только при исследовании штамма *B.bifidum* 1 в соотношении вносимых культур 1:1 (Рис. 6). Было замечено, что при малой посевной дозе всех внесенных штаммов бифидобактерий (0,1:1) обнаружен достоверно больший прирост их биомассы после окончания совместного выращивания с шигеллами (в 10 и более раз).

При сравнительном изучении зависимости активности кислотообразования производственных штаммов бифидобактерий от их АА (оценивали средние значения % выживших клеток) корреляции выявлено не было. При совместной экспозиции смешанной культуры в течение 72 ч замечено появление быстрорастущих кометообразных колоний бифидобактерий, отличных по морфологии от типичных колоний («гвоздиков», «крошек»). Такие колонии появлялись в посевах на среду Блаурокка с НК уже через 24 ч. Этот феномен обнаружен у всех 4-х штаммов бифидобактерий.

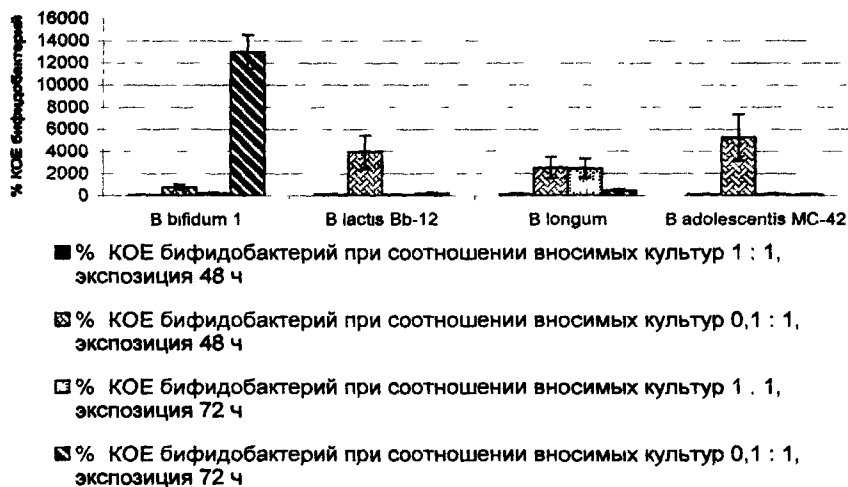


Рис.6. Сравнительная характеристика уровня контрантагонистической резистентности производственных штаммов бифидобактерий

Изучение АА бифидобактерий методом смешанных культур показало удобство количественного определения бифидобактерий в сообществах с энтеробактериями с помощью среды Блаурокка с НК. При этом можно выявить не только возможное негативное влияние патогенной микрофлоры на бифидобактерии *in vitro*, но и оценить их взаимодействие на всем сроке совместного культивирования.

Была исследована возможность изменения уровня АА менее активного из всех штаммов - *B.bifidum* 1 пассированием с тест-штаммами шигелл.

Нами проведено несколько серий экспериментов по 10 пассажей с различными соотношениями штаммов шигелл, посевных доз культур и временем их совместной экспозиции. Получены 3 варианта новых штаммов (1 вар., штамм X пассажа вар. А и штамм X пассажа вар. Б).

Степень АА 3-х вариантов исходного штамма варьировала, а уровень активности кислотообразования этих вариантов остался без изменений.

При исследовании промежуточного III пассажа (выделен в процессе получения штамма X пассажа вар. Б) обнаружено, что на среде Блаурокка с НК уже через 24 ч появились колонии, нетипичные для бифидобактерий – кометообразной формы длиной 1,5 – 2,0 см. Микроскопический контроль такой культуры бифидобактерий подтвердил ее подлинность. Показатели АА этого варианта уже через 48 ч экспозиции намного превосходили уровень АА исходного штамма *B.bifidum* 1. Активность кислотообразования этой культуры снизилась по сравнению с исходным штаммом от $(135 \pm 0,5) ^\circ\text{T}$ до $(85,5 \pm 0,5) ^\circ\text{T}$ (Рис. 7).

Закономерность появления быстрорастущего варианта *B.bifidum* 1 III пассажа была проверена однократным засевом исходного штамма в соотношении 0,1:1 с шигеллами (I пассаж) при экспозиции 48 ч. Снова были выявлены колонии бифидобактерий в виде тяжей.

Обнаружена зависимость между изменением активности кислотообразования, выявленной у двух вариантов пассированных штаммов бифидобактерий, и их степенью антагонистической активности при совместном культивировании с шигеллами в течение 48 ч (Рис. 7 и 8).

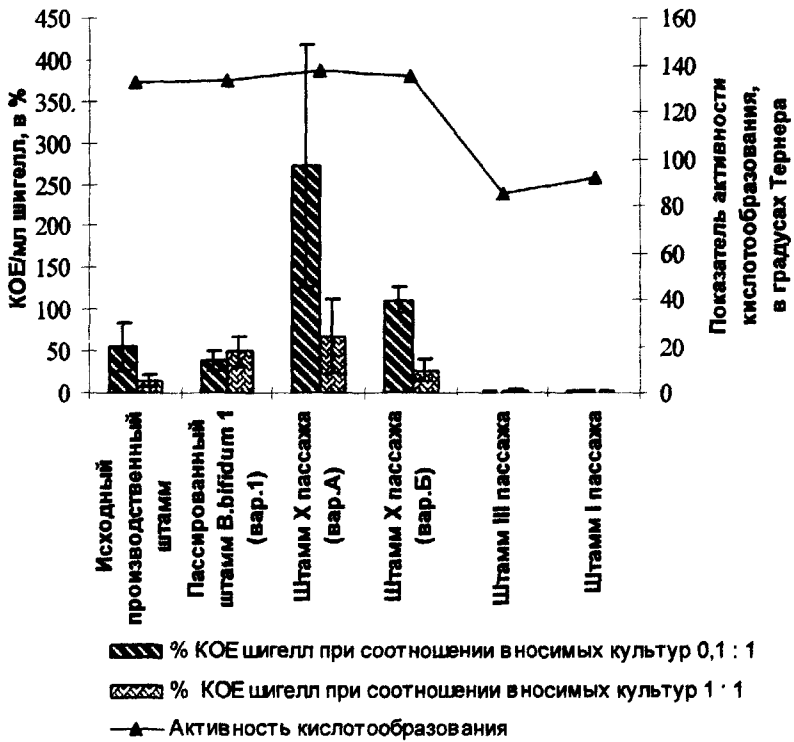


Рис.7. Сравнительная характеристика прямой антагонистической активности и активности кислотообразования исходного штамма *B.bifidum* 1 и его вариантов

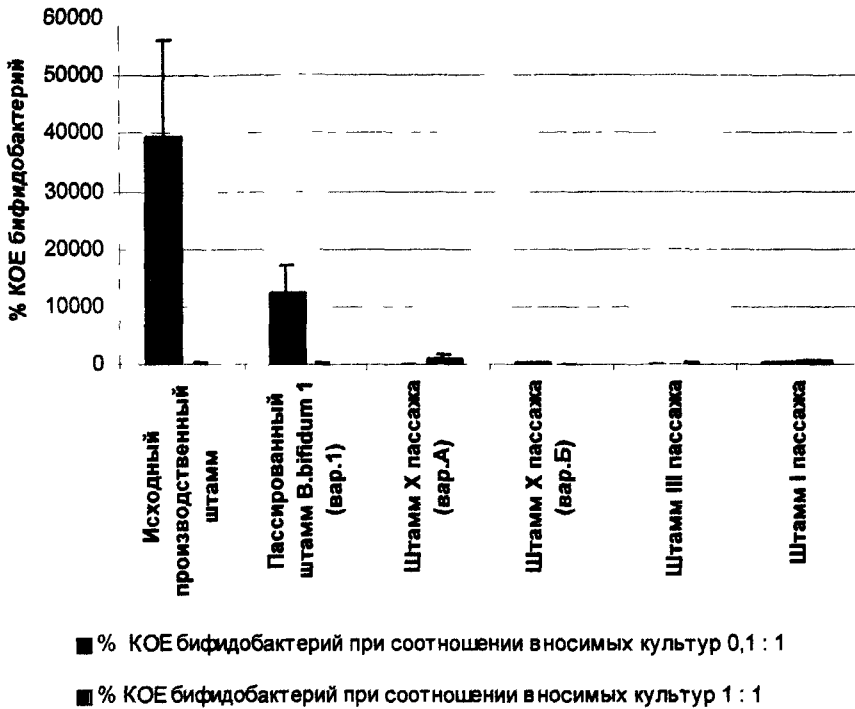


Рис. 8. Сравнительная характеристика уровня контрагантистической резистентности бифидобактерий исходного штамма *B.bifidum* 1 и его вариантов через 48 ч совместного культивирования с шигеллами

Штаммы I и III пассажей оказались более аэротолерантными, благодаря чему был проведен контроль АА бифидобактерий методом отсроченного антагонизма. Вновь подтвердилась высокая степень антагонистической активности. Новые свойства штамма III пассажа приведены в таблице 2.

Таблица 2

**Сравнительная характеристика исходного и измененного штаммов
бифидобактерий *B.bifidum* 1 третьего пассажа**

Свойства		Исходный штамм <i>B.bifidum</i> 1	Измененный штамм <i>B.bifidum</i> 1
Морфология колоний		В виде «гвоздиков», «крошек», «зерен»	В виде «комет»
Скорость образования отдельных колоний в среде Блаурокка		Через 72 ч	Через 24 ч
Поверхностный рост на плотной питательной среде МРС-5	В анаэробных условиях	-	+
	В аэробных условиях	-	+
Чувствительность к канамицину (250 мкг/мл) и левомицетину (2,5 мкг/мл)		Устойчив	Чувствителен
Сквашивание молока (внесение в стерильный обрат 1% 48-часовой культуры бифидобактерий)		Слабое закис- ление молока без образования сгустка	Образует сгусток через 24-48 ч
Активность кислотообразования по Тернеру		130 – 140 °Т	80 – 90 °Т
Уровень антагонистической актив- ности против шигелл в смешанной культуре (норма – число КОЕ/мл шигелл не более 2 %)		До 50 %	Не более 2 %

При сравнительном изучении АА бифидобактерий исходного штамма *B.bifidum* 1 и всех его вариантов через 72 ч после совместного культивирования с шигеллами (как требуют условия ФС) обнаружено, что при соотношении вносимых культур 0,1:1 у всех новых штаммов увеличился уровень АА. При соотношении вносимых культур 1:1 ее уровень изменился незначительно (Рис.9).

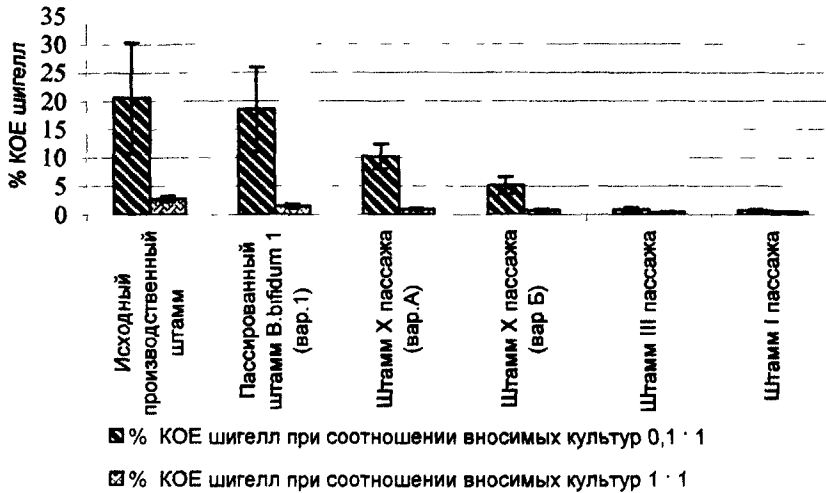


Рис.9. Сравнительная характеристика уровня прямой антагонистической активности бифидобактерий исходного штамма *B.bifidum 1* и его вариантов через 72 ч совместного культивирования с шигеллами

Данный опыт получения пассированных вариантов исходного производственного штамма бифидобактерий для увеличения его АА может быть полезным в направленной селекционной работе, проводимой в специализированных лабораториях.

ВЫВОДЫ

1. Оптимизирован состав питательных сред для культивирования производственных штаммов *Lactobacillus plantarum* 8P-A3 и *Bifidobacterium bifidum 1*: печеночный экстракт на 2/3 заменен более доступным дрожжевым экстрактом, Твин-80 удален из среды МРС-1.

2. Усовершенствован состав селективных питательных сред для контроля количества жизнеспособных бифидобактерий в комплексном препарате Бификол сухой, а также в трехкомпонентных пробиотических молочнокислых продуктах на основе закваски АТВ-5: предложено заменить токсичный азид натрия налидиксовой кислотой, добавление в качестве селективных агентов 250 мкг/мл канамицина и 2,5 мкг/мл левомицетина позволяет полностью подавить рост лактобацилл и термофильного стрептококка.

3. Установлено, что внесение унитиола значительно продлевает сроки

хранения биомассы живых бифидобактерий, а также полуфабрикатов, содержащих эти микроорганизмы.

4. Показано, что применение одновременно нескольких методов определения антагонистической активности лактобацилл (прямого и обратного антагонизма, гомо- и изоантагонизма) имеет важное значение при отборе перспективных производственных штаммов. При анализе штаммосовместимости лактобактерий на этапе разработки комплексных пробиотиков достаточно контроля их гомоантагонистической активности.

5. Определение контрантагонистической резистентности (обратного антагонизма) бифидобактерий при их совместном культивировании с тест-штаммами энтеробактерий целесообразно проводить методом количественных высевов на среду Блаурокка с налидиксовой кислотой в концентрации 0,00375 мкг/мл.

6. Установлено, что пассирование исходного производственного штамма бифидобактерий *Bifidobacterium bifidum* 1 в микст-культуре с тест-штаммами шигелл позволяет получить его новые варианты с увеличенным в 20 раз уровнем антагонистической активности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Королук А.М., Головачева С.Н., Белова И.А., Младзиевская Ю.А. Применение невиваграмона для определения концентрации бифидобактерий в смешанных микробных культурах // Вторая международная конференция «Идеи Пастера в борьбе с инфекциями» 2-4 сентября 1998 г. Ин-т им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия. – СПб, 1998. - С. 137.
2. Королук А.М., Савичева А.М., Младзиевская Ю.А., Чупринина Р.П. Принцип микрoэкологической адекватности и его реализация при оценке вагинальных зубиотиков // Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции «Дисбактериозы и зубиотики». М., 26-28 марта 1996 г. – М., 1996. - С. 18
3. Королук А.М., Петров Л.Н., Вербицкая Н.Б., Дробот И.В., Головачева С.Н., Младзиевская Ю.А., Геннадьева Т.Я. Разработка двухкомпонентного зубиотика для нормализации микрофлоры кишечника у детей // Тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции «Дисбактериозы и зубиотики». - М. - 26-28 марта 1996 г. – с. 19.
4. Королук А.М., Савичева А.М., Младзиевская Ю.А. Оптимизация лабораторного контроля вагинальных зубиотиков // Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 28-31 января 1997 г. – М., 1997. - Т.1 – С. 266-267.
5. Королук А.М., Савичева А.М., Младзиевская Ю.А. Принцип микрoэкологической адекватности как необходимое условие разработки некоторых методов оценки качества зубиотиков // III Национальный конгресс «Человек и лекарство». Тезисы докладов.- М., 16-20 апреля 1996 г. – М., 1996. - С. 310.

6. Королук А.М., Белова И.А., Младзиевская Ю.А., Головачева С.Н. Определение концентрации *Bifidobacterium bifidum* в микробных ассоциациях. Фундаментальные и прикладные проблемы биотехнологии и медицины (Материалы юбилейной научно-технической конференции ГосНИИ ОЧБ). – СПб., 2000. – С. 41-42.

7. Младзиевская Ю.А., Емельяненко В.А. Характеристика бактерицидного и бактериостатического действия унитиола в жидких бакконцентратах. Актуальные вопросы инфекционной патологии человека, клинической и прикладной иммунологии. Материалы Всероссийской научной конференции молодых ученых, 27 февраля 2004., Уфа. – Уфа, 2004. – С.113-114.

8. Емельяненко В.А., Младзиевская Ю.А. Возможные пути оптимизации методов определения антагонистической активности бифидобактерий. Там же – С. 114-116.

9. Королук А.М., Младзиевская Ю.А., Емельяненко В.А. Феномен приобретения полезных свойств производственными штаммами бифидобактерий при совместном культивировании с некоторыми энтеробактериями. 2-я Международная конференция «Наука – Бизнес – Образование; Биотехнология – Биомедицина – Окружающая среда» (Тезисы докладов), 10-13 мая, 2005 г, Пущино. – Пущино, 2005. – С.24-26.

10. Младзиевская Ю.А., Королук А.М. Применение налидиксовой кислоты для изучения контрантагонистической резистентности бифидобактерий в смешанных культурах. Там же. – С.33-35.

Список сокращений

АА – антагонистическая активность;
 БАД – биологически активная добавка к пище;
 ГА – гомоантагонистическая активность;
 ДЭ – дрожжевой экстракт;
 ИА – изоантагонистическая активность;
 КР – контрантагонистическая резистентность;
 КОЕ – колониеобразующая единица;
 МПА – мясо-пептонный агар;
 НК – налидиксовая кислота;
 ПЭ – печеночный экстракт;
 РП – регламент производства;
 ТТХ – тетрафенилтетразолий хлористый;
 ФС – фармакопейная статья;
 Gas Pack – газогенерирующий пакет.

Подписано в печать 27.10.05 г

Тираж 100 экз

Формат 60х84/16

Объем 2 л.п.

№ 2 5 4 4 2

РНБ Русский фонд

2006-4

25866