

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН**

**САМАРКАНДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АЛИШЕРА НАВОИ**

На правах рукописи
УДК 574.8.095

ЯРМУХАМЕДОВА ГУЛРУХ ХАМИДОВНА

**ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ
СВОЙСТВ ШТАММОВ БИФИДО - И ЛАКТОБАКТЕРИЙ ДЛЯ
ПОЛУЧЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ**

5А- 140104 «Биотехнология»

ДИССЕРТАЦИЯ

На соискание академической степени магистра

Научный руководитель:
к.б.н. Кан С

САМАРКАНД – 2014 г.

СОДЕРЖАНИЕ:

	ВВЕДЕНИЕ	3
I.Глава.	Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов	8
1.	Основы технологии микробного синтез.....	8
2.	Классификация и биологические свойства микроорганизмов используемых для получения пробиотиков.....	18
3.	Получение пробиотиков и их практическое использование.....	30
	Вывод	33
II.Глава.	Объекты,место и методы исследований	35
1.	Объекты исследований	36
2.	Место исследований.....	36
3.	Методы исследований.....	36
	Вывод	38
III.Глава.	Экспериментальная часть	40
1.	Изучение морфологических и биохимических свойств местных штаммов бифидо- и лактобактерий.....	40
2.	Изучение антогонистических свойств выделенных штаммов бифидо- и лактобактерий и их устойчивости к антибиотикам.....	52
3.	Изучение биотехнологических основ получения пробиотиков на основе бифидо- и лактобактерий.....	62
	Вывод	70
	ВЫВОДЫ	71
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	74

ВВЕДЕНИЕ:

Актуальность работы. Глубокие перемены, произошедшие в биологии за последние десятилетия, открыли принципиально новые перспективы в применении биологических процессов в промышленном производстве и внесли большой вклад в развитии биотехнологии. Важнейшей по объёму и развивающейся отрасли биотехнологии является медицинская биотехнология, открывающая большие возможности для лечения наследственных болезней, в создании генно-инженерных лекарственных препаратов и биологически активных веществ (антибиотиков, гормонов, витаминов, ферментов). Конструирование методами генной инженерии штаммов микроорганизмов в сочетании с процессами микробиологического синтеза создаёт большие перспективы промышленного производства любых биологически активных веществ. В последние годы резко увеличилось число веществ, производимых методами микробиологического синтеза и инженерной энзимологии, создаются новые производства для получения различных медицинских препаратов: гормонов, ферментов, антибиотиков, вакцин, бактериальных препаратов - пробиотиков.[5,8]

Показания к применению и терапевтическая эффективность этих препаратов определяется морфологическими и физиолого-биохимическими свойствами штаммов микроорганизмов, используемых для их производства.

В настоящее время при отборе и характеристике производственных культур микроорганизмов учитывают следующие показатели: спектр и уровень антагонистической активности, технологичность, устойчивость к антибиотикам и безопасность для здоровья человека. По совокупности физиолого-биохимических свойств и факторов биологической активности наиболее перспективными для создания пробиотиков являются лактобациллы и бифидобактерии. Разнообразие метаболических процессов, генетическая и биохимическая вариабельность, устойчивость к литическим и

пищеварительным ферментам служит основанием для использования лактобацилл и бифидобактерий для создания пробиотиков.[11,40,41]

Лечебные и профилактические препараты- пробиотики, созданные на основе непатогенных микроорганизмов и способные оказывать благоприятное действие на физиологические и биохимические функции организма получили широкое распространение для восстановления облигатной микрофлоры , при лечении кишечных дисфункций, аллергических заболеваниях и дерматозах. Существенную роль в проявлении лечебного действия пробиотиков, наряду с антагонистической активностью штаммов играют их витаминообразующие , ферментативные и иммунизирующие свойства. В связи с этим создание и разработка пробиотиков на основе микробного синтеза является актуальной проблемой медицины и медицинской биотехнологии.[6,35]

Предмет и объекты исследования. Предмет исследования относится к биотехнологии и направлен на изучение морфологических, физиолого-биохимических, антагонистических, чувствительность к антибиотикам местных штаммов бифидо- и лактобактерий и на разработку биотехнологического процесса производства комплексного биопрепарата изучаемых местных штаммов бифидо- и лактобактерий. Объектом исследования являются местные штаммы бифидобактерий: *B.longum*-17X, *B.bifidum*-9C, *B.adolescentis*-30; и лактобактерий: *L.acidophilus* 180, *L.casei* 962/II, *L.rhamnosus* 9cX выделенных и идентифицированных в институте микробиологии АНРУз, представляющие собой лиофилизированную живую культуру штаммов.

Цель исследования: Выделение и изучение морфологических и биохимико-физиологических свойств местных штаммов бифидо и лактобактерий и оценка возможности их использования для получения пробиотиков.

Основными задачами исследования являются:

1.Изучение методов микробиологического синтеза биологически активныхвещ-

еств, обзор основных этапов биотехнологического производства.

2.Выделение, идентификация штаммов бифидо- и лактобактерий, изучение их морфологических и физиолого- биохимических особенностей .

3.Изучение антогонистических свойств выделенных штаммов бифидо и лактобактерий и их устойчивость к антибиотикам.

4.Изучение и разработка биотехнологических основ получения пробиотиков на основе Бифидобактерина и Лактобактерина.

Содержание литературы по теме. Работа выполнена в соответствии с проблемно-тематическим планом кафедры физиологии, генетики и биохимии, по изучению молочно-кислых бактерий при производстве кисломолочных продуктов, а так же получение бактериальных препаратов- пробиотиков. Часть научных исследований, проводилась в Институте микробиологии АН Руз. и в научно-исследовательском институте «Восточная медицина». При проведение исследований по работе в основном использовалась следующая литература: 1. Алешкин В. А. Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования. – Молочная промышленность.М – 2003. – № 1. – С. 59-61.;2. Брусиловский Л. П. Управление процессами культивирования микроорга-низмов заквасок и молочнокислых продуктов. –М.: Агропромиздат, 1990. – С. 127.5; 3. Ганина В. И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии. – М.: Изд-во МГУПБ, 2001. – С. 69;4. Егоров Н.С., Олескин А.В.,Самуилов В.Д. Биотехнология. 1-том.Проблемы и перспективы.М.: Высшая школа-1987г.,с.45-97;5. Залашко М. В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. – М.: Лгропромиздат, 1990. – С. 192; 6 . Карпушина С.Г., Тюрин М.В. Иванов А.А., Митрохин С.Д., Лившиц

В.А.Выделение, идентификация и некоторые биологические свойства бифидобактерий из кишечника человека // Биотехнология. 1998. - № 2. - С. 28-36.; 7. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. Изд. «Наука»: М-1975 г., с. 187.; 8. Rose S. Gastrointestinal and Hepatobiliary pathophysiology. Madison: Fence Greek Publishing LLC; 1998. Так же пользовались источниками интернета.

В результате проведённых исследований нами было показано, что штаммы *B.longum*-17X и *L.casei* 962/II, а так же штаммы *B.adolescentis*-30 и *L.acidophilus* 180, обладают высокой ферментативной и антагонистической активностью и это даёт возможность рекомендовать их для создания бактериальных препаратов -пробиотиков. Для создания пробиотиков необходимо использовать штаммы разных видов микроорганизмов, учитывая их биохимико-физиологические, антагонистические, витаминизирующие и иммунизирующие свойства. При выборе пробиотика необходимо учитывать как показания для его назначения, так и состав входящих в него бактерий, а также уровень, на котором он должен действовать.

Методы исследований: Морфологические свойства изучали путём микроскопии окрашенных препаратов приготовленных из исследуемых молодых культур, выделенных на плотных или жидких питательных средах. Для определения видовой принадлежности свежесделанных штаммов изучали их биохимические свойства. Преимущественно устанавливали активность культур по утилизации углеводов, определяли рН в культуральной среде вследствие кислотообразования. Антагонистическую активность изучали методом совместного культивирования на жидких средах с тест-штаммами, с последующим высевом на плотные среды. Подавляемость тест культур измеряли в мм. Чувствительность штаммов в плотной питательной среде определяли в отношении 12 антибиотиков.[1,4,9]

Научная новизна: Изучена классификация и биологические свойства микроорганизмов, используемых в качестве пробиотиков. Выделены и идентифицированы местные штаммы бифидо- и лактобактерий, изучены их морфологические, физиолого-биохимические, антогонистические свойства и устойчивость к антибиотикам. Рекомендованы местные штаммы бифидо- и лактобактерий для создания одноштабмовых и мультиштабмовых пробиотиков, включающих штаммы различных видов бактерий. Изучены биотехнологические основы создания пробиотических препаратов.

Научно-практическая значимость работы: Лечебные и профилактические препараты - пробиотики, созданные на основе непатогенных микроорганизмов, способных оказывать благоприятные действия на физиологические и биохимические функции организма получили широкое распространение для восстановления облигатной микрофлоры, при лечении различных заболеваний. Изучение биологических свойств штаммов бифидо – и лактобактерий позволит некоторые штаммы рекомендовать для получения пробиотиков.

Публикации: По теме диссертации опубликовано 3 статей и 2 тезисов докладов. Материалы исследований опубликованы в: Научный вестник СамГУ « Илмий ахборотнома»(2014,№1); Научно-практическая конференция в честь научной и педагогической деятельности доктора биологических наук ,профессор Назир Амирханов «Ботаника сохасидаги Илмий-амалий ютуқлар ва долзарб муаммолар» (Самарканд-2014,11 апрель); Научный вестник « Сборник магистрантов» (Самарканд 2014г,№1); Научный журнал СамМИ «Проблемы биологии и медицины»(2014,№1); Научно-практическая конференция «XXI аср-интеллектуал авлод асри» (г.Навои Горно-металлургический институт, 2014г.)

Содержание диссертации. Магистерская диссертация изложена на 80страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, место, объекта и материалов исследований, экспериментальной части, выводов,

и списка литературы, включающая 62 источника , из которых 21 иностранная литература и 10 источников интернета. Работа иллюстрирована 2 схемами, 21 рисунками и 5 таблицами.

Глава I. Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов.

1. Основы технологий микробного синтеза.

Биотехнологическая система, состоящая из биообъекта, сырья (субстрата), и технологических условий, оборудования создаётся для производства определённого продукта. Среди биологических объектов в первую очередь следует назвать микроорганизмы, на биопродуцирующей активности которых построено большинство функционирующих крупномасштабных биотехнологических производств.[9]

Преимущественное использование в качестве биообъекта микроорганизмов основано на следующих критериях быстрый рост и размножение микроорганизмов, многообразие метаболических путей биосинтеза, благодаря высокой ферментативной активности способность расщеплять разные органические вещества, ксенобиотики и наоборот, синтезировать из неорганических веществ органические соединения., как в аэробных, так и в анаэробных условиях , вездесущность микроорганизмов их адаптированность к экстремальным условиям (высокой температуре, низкой рН, осмотическому градиенту и др.), большая технологическая доступность микробной клетки в сравнении с высшими организмами для генно-инженерных манипуляций.

Потому число видов и штаммов микроорганизмов, применяемых в биотехнологии будет постоянно увеличиваться, расширяться и углубляться спектор их полезной деятельности как следствие более совершенного знания механизмов регуляции метаболизма и умения ими управлять, более тонких и

адаптированных генно-инженерных манипуляций, а также разработки и внедрения новых инженерных технологий и приборов в биопроизводство[6].

Требования, которые предъявляют к микроорганизмам, используемым в биологических технологиях, зависят от целей использования конечного продукта. Установлены как общие для всех промышленных микроорганизмов критерии оценки, так и некоторые их отличительные черты:

- 1.Аптогенность микроорганизмов, безвредность для человека и окружающей среды;
- 2.Способность синтезировать целевой продукт – главный критерий при отборе штаммов-продуцентов;
- 3.Высокая скорость выхода конечного продукта (накопление биомассы, синтез антибиотиков, орг. кислоты);
- 4.Стабильность биопродуцирующей активности в лабораторных и производственных условиях;
- 5.Образование побочных продуктов метаболизма должно быть минимальным;
- 6.Устойчивость к литическому действию бактериофагов к посторонней микрофлоре. В производственных условиях нередки потери из-за лизиса штамма-продуцента бактериофагами. Получают устойчивые, фагорезистентные штаммы путём совместного культивирования продуцента с чувствительным фагом.
- 7.Желательно чтобы производственный штамм был термо- и ацидофильным, так как повышенный температурный режим ферментации или низкие значения рН облегчают сохранения стерильности в промышленных условиях;
- 8.Технологичность, то есть высокая адаптация штамма к производственному процессу;
- 9.Способность хорошо расти на дешёвом субстрате (отходы мясомолочного, кондитерского, плодово-ягодного и других производств);

10.Образуемый продукт должен иметь экономическую ценность и легко выделяться из культуральной жидкости.

При оценке требований к штаммам , используемым в качестве биоинсектицидов, биоудобрений, биодеструкторов, наряду с основной функцией (соответственно, высокая токсичность для насекомых- вредителей, выраженная способность фиксировать атмосферный азот и активно расщеплять органические соединения, загрязняющие воду и почву) большое внимание уделяется приспособляемости микроорганизмов к колебаниям РН, температуры и влажности в естественных условиях, к различным ингредиентам почвы и окружающей микрофлоре.[14]

Биоинсектицидный штамм вместе с высокой энтомопатогенностью должен быть безопасен для человека и животных, его токсин стойко сохранять свойства при хранении препарата, препарат должен быстро действовать на насекомых, на дешёвом субстрате легко наращиваться биомасса при ферментации.

При использовании микроорганизмов с целью биоремедиации загрязнённых территорий, биолеструкции ксенобиотиков очень важен подбор сообщества штаммов из разных таксономических групп . Последовательная, поэтапная биолеструкция ксенобиотика требует слаженной работы, совместного биокаталитического действия различных микроорганизмов. Важно, чтобы штамм деструктор обладал существенным количеством плазмид деградации, детерминирующих синтез соответствующих ферментов.[12]

Некоторые особенности прослеживаются при селекции клубеньковых бактерий-микроорганизмов, фиксирующих атмосферный азот. Естественно требуется высокая азотфиксирующая способность штамма, специфичность к определённому растению-хозяину, конкурентоспособность в сообществе с резоферной микрофлорой. В тоже время есть и другой подход в селекции штаммов, используемых в качестве биоудобрения. Разрабатываются методы

«расшатывания» видовой специфичности микроорганизмов к определённому растению с тем, чтобы биоудобрение возможно было использовать не только на бобовых, но и других культурных растениях.[18]

При мониторинге промышленных микроорганизмов, используемых в биотехнологии с целью выщелачивания металлов из горных пород столь же важна скорость и эффективность адаптации к изменениям pH, температуры окружающей среды, к концентрации металлов, к типу выщелачиваемого минерала.

Вакцинный штамм, особенно используемый в качестве живой вакцины, оценивается по следующим критериям: апатогенность, ареактогенность, стерильность (отсутствие посторонних микроорганизмов), иммуногенность, антигенная специфичность, то есть речь идёт не об усилении или изменении метаболического пути, не о сверх продуцирующей способности микроорганизмов, а о антигенах (белках, полисахаридах, липополисахаридах и др.), о структурных компонентах микробной клетки. Так как свойства антигена определяют качество вакцины.[61]

Микробиологическое производство биологически активных веществ и препаратов является важным направлением промышленной биотехнологии обеспечивающим народное хозяйство такими ценными продуктами как аминокислоты, антибиотики, ферменты, средства защиты растений, бактериальных препаратов пробиотиков.

Промышленное производство продуктов микробного синтеза представляет единую биотехнологическую систему. Этапы его отличаются характерными особенностями. [47]

Микроорганизмы, синтезирующие те или иные продукты и применяемые в микробиологической промышленности, принадлежат к разным таксономическим группам (бактерии, сумчатые грибы, фикомицеты, актиномицеты) и существенно отличаются друг от друга по морфологии,

размерам клеток по потребностям и способностью ассимилировать разные компоненты субстрата. [35]

Для получения продуктов микробиологического синтеза применяют различные культуры микроорганизмов и используют разные питательные среды и режимы культивирования. Для приготовления питательных сред в микробиологической промышленности используют сырьё минерального, животного и растительного происхождения, а также синтезированное химическим путём. Вещества, входящие в состав питательной среды, обеспечивающие развитие культуры и биосинтез определённых продуктов, не должны содержать вредных примесей.

При выборе сырья необходимо учитывать его себестоимость, так как в микробиологическом синтезе важное значение имеет стоимость исходных веществ и материалов. В качестве источников углерода чаще всего используют углеводы (глюкозы, сахарозу, крахмал, лактоза) или богатые углеводами натуральные продукты (мелассу, кукурузную муку, гидроль и др.) , а также жиры и даже вещества, содержащие углеводы (нефть, парафин, керосин, природный газ и др.). источником азота обычно бывают неорганические соли (сульфат аммония, двузамещённый фосфат аммония, аммиак, нитраты, а так же мочевины) или натуральные продукты (кукурузный экстракт, соевая мука, дрожжевой автолизат).[22]

При использовании сложных природных веществ или промышленных побочных продуктов необходимо тщательно проверить их биохимическую пригодность в качестве исходных веществ на лабораторных ферментационных стендах. Жидкие виды сырья хранят в больших цистернах. Практика показала, что технологические свойства меллассы и кукурузного экстракта при хранении могут улучшаться в результате протекающих в них биохимических и микробиологических процессов.[18]

Одним из основных видов сырья для микробиологического производства является вода. Для приготовления сред её берут из артезианских скважин или из открытых водоёмов после соответствующей обработки. Она должна быть биологически чистой, бесцветной, без вкуса и запаха. Содержание вредных веществ в воде не должно превышать следующих концентраций: Свинец- 0,1 Мышьяк-0,05 Фтор-1,5 Цинк-5,0 Медь-3,0 мг/л.Общее число микроорганизмов не более - 100 в 1 мл воды .

Питательные среды готовят в специальных реакторах с мешалками. Реакторы, трубопроводы, арматуру чаще всего изготавливают из нержавеющей стали и особое внимание обращают на устройства для стерилизации питательных сред, которые используют для приготовления чистой культуры и в цехе основной ферментации. Среду готовят в сырьевом или рецептурном цехе по периодическому или непрерывному методу, в отдельных случаях приготовление и стерилизацию и осуществляют прямо в ферментаторах.[53]

При работе с вертикально установленной колонной питательную среду подводят снизу в пространство между трубами. В верхнюю часть колонны подают пар под давлением 0,3- 0,4 МПа. Скорость потока среды выбирают такую, чтобы каждая частица питательной среды находилась в зоне прогрева заданное время. Во избежание осадков скорость потока среды должна быть примерно 2 м / с, а температура охлаждающей воды - не выше 50 °С.

Теплообменники пластичного типа используются при пастеризации молока, высокоэффективны, хорошо герметизированы, легко разбираются и моются. Их можно применять для нагрева и охлаждения среды: процесс стерилизации в них легко автоматизируется.[17]

Для получения продуктов микробиологического синтеза применяют различные культуры микроорганизмов, используя питательные среды и режимы культивирования. Культуры микроорганизмов - продуцентов веществ ,заводы получают из институтов в пробирках на косом агаре или в ампулах. Каждая

культура имеет паспорт с подробным описанием морфологии, физиологии, характеристики среды для культивирования и хранения. При длительном содержании культуры важно сохранить её свойства, так как при частом пересеве она со временем может изменяться - уменьшается продуктивность проявления гетерогенность культуры, то есть различные её варианты с различающейся морфологией и физиологией. Чтобы сохранить свойства культуры без изменений, её надо хранить в соответствующих условиях: охлаждение замораживание или обезвоживание. Во всех этих случаях ограничивается или даже прекращается клеточный обмен веществ.[26]

На практике культуры хранят различными способами:

1. На косом агаре при низкой температуре (1-5 °С) можно хранить культуру 1-2 месяца, а иногда и дольше;
2. Путём замораживания и хранения при температуре ниже -20 °С позволяет сохранить в течении нескольких месяцев. Нежелательно многократное оттаивание и замораживание.
3. На твёрдых средах под слоем стерильного парафина или минерального масла можно хранить дрожжи, плесневые грибы;
4. На агаре без добавления питательных веществ, хранятся актиномицеты;
5. При лиофилизации культуру замораживают при температуре (остаточное добавление 6-130 кПа). Для предохранения клеток от инактивации используют защитные среды (сыворотка крови, бульон, сахароза, смесь песка и глины и др.). Лиофилизованную чистую культуру в ампулах хранят в течении нескольких лет;
6. В стерильной смеси и глины : нанесённые в эту смесь микроорганизмы или суспензию спор сушат при комнатной температуре и при такой же температуре хранят в посуде, закрытой ватной пробкой. [24]

Самый ответственный процесс в микробиологическом синтезе - ферментация. Под ферментацией понимают всю совокупность

последовательных операций от внесения в заранее приготовленную термостатированную среду инокулята и дозавершения процессов роста, биосинтеза или биотрансформации.

В промышленной биотехнологии выделяют два типа процессов: 1) накопление биомассы микроорганизмов для получения продукта и её накопления после высушивания в виде готового продукта; 2) накопление не биомассы продукта, а ценных веществ, возникающих в ходе роста или наследующих стадиях развития культуры. Эти процессы включают производство ферментов, антибиотиков, а так же своеобразные варианты культивирования с целью получения жизнеспособных клеток, спор, токсинов, выделяемых в культуральную среду. Особое место занимают процессы микробиологической трансформации широко распространённые в производстве лекарственных средств и витаминов. В связи с различием 2 типов микробиологического процесса в первом случае биомассу выращивают непрерывным способом в аппаратах хемостатного типа, а процессы второй группы осуществляются периодически, когда в одном и том же аппарате протекают все фазы развития клетки и биосинтеза. Ферментаторы, в которых происходит этот процесс, являются главным технологическим оборудованием любого микробиологического производства.[16,59]

В связи с интенсивной аэрацией и перемешиванием во время ферментации питательная среда образует пену. Это может нарушить стерильность процесса и вызвать потери культуральной жидкости. Для ограничения пенообразования используют химические средства (масло, олеиновую кислоту, силиконы, другие пеногасители) и механические (вращающиеся лопасти в верхней части аппарата, циклоны, струи жидкости и т. п.) [46]

Продукты микробиологического синтеза (клетки, споры или метаболиты), поступают из биореактора в виде водных суспензий или

растворов. В большинстве промышленных производств, использующих клетки микроорганизмов в качестве первого этапа переработки культуральной жидкости производят отделения биомассы продуцента от жидкой фазы, которая далее подвергается переработке, если она содержит метаболиты, представляющие практическую ценность. В производствах, где целевым продуктом являются клетки, как источники белка культуральная (безклеточная) жидкость подвергается очистки. В простом случае всю жидкость можно использовать как готовый продукт, (при производстве культуральных удобрений). При производстве витаминных концентратов используются все продукты ферментации, для чего культуральную жидкость упаривают в вакуумных аппаратах и специальных сушилках.[35]

Для выделения биомассы используют сепараторы, центрифуги, вакуум-барабанные фильтры или отстойники. Иногда биомассу осаждают добавлением электролитов. После центрифугирования биомассу получают в виде густой жидкости или пасты. Клеточную массу промывают, фильтруют, сушат, гидролизуют, экстрагируют нужный продукт. Если метаболиты находятся в растворе, то нужное вещество выделяют из раствора фильтрацией, кристаллизацией, осаждением, хроматографией.

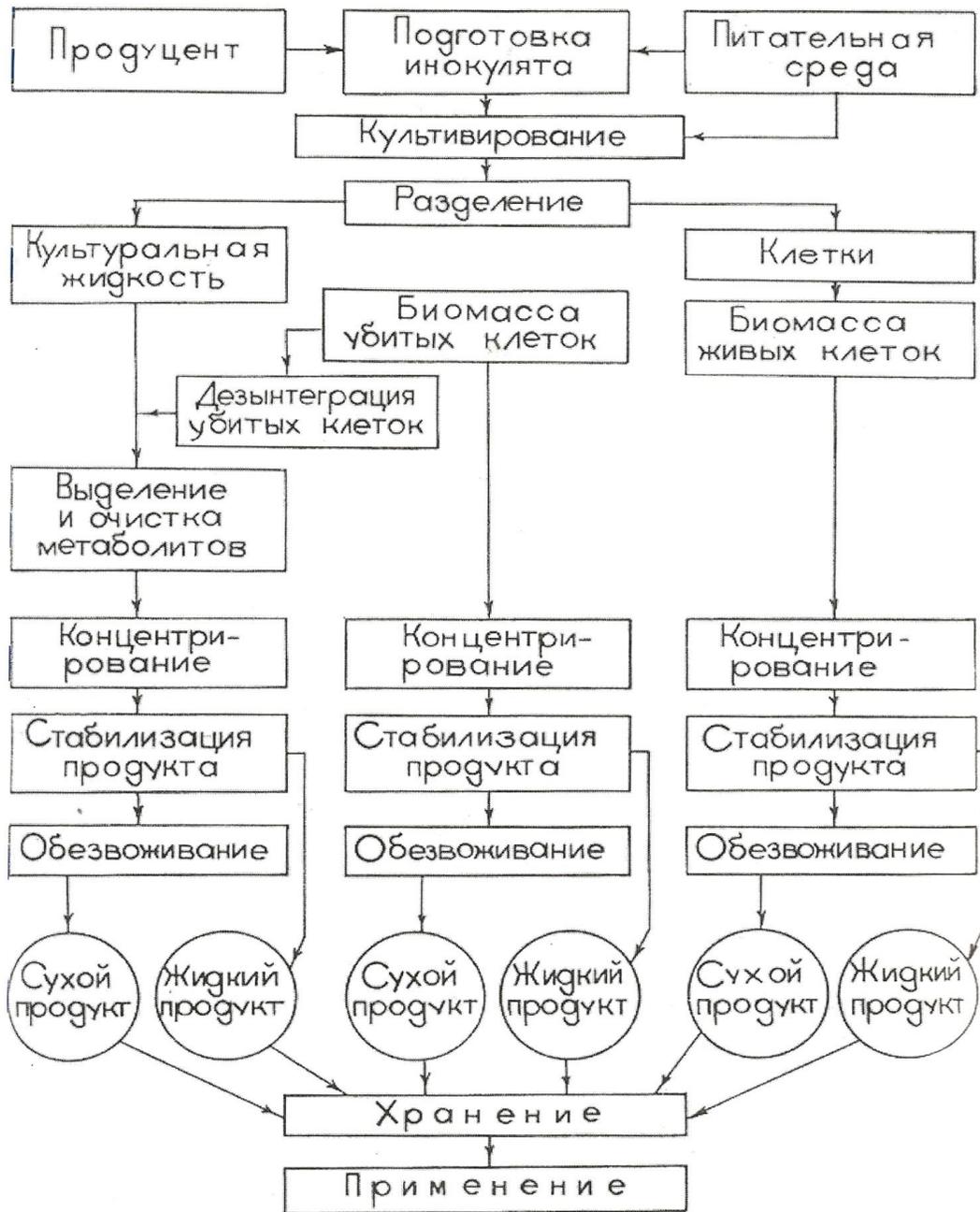
Последней стадией технологического цикла в микробиологическом синтезе является получение товарной формы продукта. В производстве микробного белка это оправданно ещё и по тому, что культуральная жидкость содержит целый ряд питательных и стимулирующих физиологически активных веществ. По существующей технологии лишь 60-70% жидкой фазы отделяется при сепарации, остальная вода удаляется путём выпарки и распылительной сушки. Это даёт основание называть конечную сухую смесь клеток и метаболитов «белково- витаминным концентратом» (БВК) .[44]

Стадия фасовки комплексных препаратов - БВК, ферментов технического назначения - заключается в помещении их в тару, размеры и тип которой определяется потребностями заказчика и свойствами продукта (его слёживаемостью, гигроскопичностью, стойкостью к загниванию и т. д).[57]

Так же следует отметить , что присутствие в составе культуральных жидкостей и биомассы микроорганизмов огромного количества ценных биологически активных веществ, зачастую недоступных для других способов их синтеза, ставит перед промышленной биотехнологией проблему развития методов переработки своих продуктов для максимально широкой номенклатуры и гаммы товарных форм. [60] (схема 1.1.).

Схема 1.1.

Производство микробного синтеза[8]



2. Классификация и биологические свойства микроорганизмов используемых для получения пробиотиков.

Пробиотики- живые микроорганизмы, которые оказывают положительное действие на здоровье хозяина. В состав пробиотиков входят многие штаммы нормальной кишечной микрофлоры, из которых наиболее часто используются : *Escherichia coli* Nissle 1917 , *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei* *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*, *Saccharomyces boulardii*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus thermophiles*[15]

Бактерии, входящие в состав пробиотиков обладают рядом важных свойств, позволяющих оказывать положительное действие: оставаться резистентными к действию желчных кислот, соляной кислоте и ферментации, сохранять жизнеспособность при прохождении через желудочно-кишечный тракт, быстро размножаться и колонизировать кишечник, быть безопасными при применении, обладать антагонизмом к патогенным и потенциально-сатогенным микроорганизмам, оказывать положительный эффект на здоровье человека, оставаться стабильными при хранении. [1]

В настоящее время при отборе и характеристике производственных культур микроорганизмов учитывают, главным образом, следующие показатели: спектр и уровень антагонистической активности, технологичность, т.е. способность к быстрому накоплению биомассы, устойчивость к лиофильному высушиванию, жизнеспособность при хранении. Важен также спектр их антибиоти-корезистентности .Особое внимание уделяется критериям безопасности используемых штаммов для здоровья человека .

Особенный интерес представляет вопрос о биологических свойствах споровых бактерий, изолируемых из организма человека или животных, с точки

зрения познания механизмов их воздействия на макроорганизм. Кроме того, эта проблема важна для выявления новых резервов создания эффективных лечебно-профилактических препаратов, поскольку почти половина выделенных бацилл проявляет антагонистические свойства по отношению к различным патогенным и условно патогенным бактериям и грибам, при этом наибольшую активность проявляют штаммы различных микроорганизмов.[3,4]

В настоящее время многие ученые рассматривают совокупность микроорганизмов как микробную экосистему. Нормальная микробная экосистема благоприятна для организма животного и человека. Потенциально патогенные микробы могут присутствовать в экосистеме, но экологический баланс такой, что они остаются в количестве, безопасном для организма. В результате действия неблагоприятных факторов происходит нарушение микробной экосистемы, а следовательно, и изменение экологического баланса, и в экосистеме количество потенциально патогенных микроорганизмов становится преобладающим, что приводит к заболеванию.

Одной из уникальных систем, обеспечивающих постоянство внутренней среды макроорганизма, является кишечная микрофлора. Наличие в кишечнике сбалансированного соотношения и оптимального количества аэробных и анаэробных микроорганизмов обеспечивает неспецифическую защиту организма человека от бактерий, вызывающих кишечные инфекции, обеспечивает выработку факторов иммунной защиты. Некоторые виды бактерий участвуют в синтезе витаминов и незаменимых аминокислот. Именно кишечной микрофлоре принадлежит важная роль в нормальной кишечной перистальтике, а также расщеплении и всасывании продуктов обмена липидов, белков и углеводов.

Состав микробной флоры желудочно-кишечного тракта зависит от питания, условий и качества жизни (психологического климата). Достаточно сменить питание и условия жизни, и сразу же меняется состав микроорганизмов. Тонкий отдел кишечника относительно менее богат

микроорганизмами. Зато в толстом отделе их великое множество, хотя набор видов весьма однообразен. Зато преобладают разновидности кишечной палочки, некоторые споровые бактерии и энтерококки. Эти микроорганизмы участвуют в сложнейших процессах по расщеплению питательных веществ и особенно клетчатки.[28,52]

Микроорганизмы, используемые в качестве пробиотиков, классифицируют на 4 группы:

- аэробы – спорообразующие бактерии рода *Bacillus*;
- анаэробы – спорообразующие бактерии рода *Clostridium*;
- бактерии, продуцирующие молочную кислоту (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, неспорообразующие);
- дрожжи – используются в качестве сырья при изготовлении пробиотиков.[19]

В качестве пробиотиков широко используют стрептококки и кишечную палочку.

Сахаромицеты Буларди (лат. *Saccharomyces boulardii*) — вид одноклеточных микроскопических дрожжевых грибов из рода сахаромицетов. В лиофилизированном виде *Saccharomyces boulardii* применяются в качестве активного вещества в противодиарейных, антимикробных лекарственных препаратах. Сахаромицеты Буларди (*Saccharomyces boulardii*) названы в честь французского учёного Генри Буларди (Henri Boulard), выделившего их в Индокитае из некоторых тропических плодов после того, как он заметил, что кожура этих плодов используется местным населением для лечения диспепсических заболеваний. Сахаромицеты Буларди применяются также в качестве пробиотиков. Их отличительными качествами от большинства других Сахаромицетов (в том числе от бифидо- и лактобактерий и энтерококков) является резистентность к кислой среде желудка, они не разрушаются под воздействием желудочного сока и, вводимые орально, в целостном состоянии попадают в кишечник.

Сахаромицеты Буларди увеличивают ферментативную функцию кишечника, вызывая активность дисахаридаз эпителия кишечника: лактазы, сахарозо-альфа-глюкозидазы и мальтазы. Имеются данные (Buts et al., 1986), что приём сахаромицетов Буларди увеличивает активность лактазы на 77 %, сахаразы на 82 %, мальтазы — на 75 %,обладают прямым антагонистическим действием в отношении многих видов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов: *Candida krusei*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida albicans*, *Clostridium difficile*, *Gardia lamblia*, *Klebsiela* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella* spp., *Entamoeba histolytica* и других.[28]

Стрептококки (лат. *Streptococcus*) имеют сферическую форму и диаметр 0,5—1 мкм, располагаются цепочками. Не образуют споры, не имеют жгутиков. Некоторые стрептококки, выделенные из патологического материала, образуют нежную капсулу. Длина цепочек различна: в бульонной культуре они длиннее, чем при росте на плотных питательных средах. Хорошо красятся всеми анилиновыми красками, грамположительны.[51,45]

Большинство стрептококков является факультативными анаэробами, но встречаются и строгие анаэробы (в полости рта и кишечнике). На простых питательных средах стрептококки растут плохо. Хорошо культивируются на питательных средах с глюкозой, кровью, сывороткой при pH 7,2—7,6 и температуре 37°C. На жидких питательных средах стрептококки растут пристеночно или придонно в виде зернистого осадка, оставляя бульон прозрачным. На плотных средах колонии мелкие или средней величины (0,5—2,5 мм), полупрозрачные, плоские, блестящие, гладкие, реже шероховатые. При выращивании на кровяном агаре одни стрептококки образуют колонии, окруженные зоной полного гемолиза, другие — зоной зеленого цвета в результате перевода гемоглобина в метгемоглобин, третьи не изменяют среды. Стрептококки обладают выраженной ферментативной активностью: разлагают

глюкозу, мальтозу, лактозу, сахарозу с образованием кислоты, желатин не разжижают.

Полезные кокки несут самые разнообразные функции: регуляция обмена веществ, газового состава кишечника, поддержание циркуляции желчных кислот и препятствие образованию желчных камней, поддержание нормального уровня холестерина, образование ферментов, витаминов, антибиотиков, гормонов и даже выработки веществ, растворяющих раковые клетки[37,54].

Кишечная палочка (лат.*Escherichia coli*) впервые была выделена из испражнений человека Эшерихом в 1885 г. Встречается много разновидностей кишечных палочек, которые объединены в один род *Escherichia*. Они являются сапрофитами кишечника человека и животных. Обнаружение их во внешней среде указывает на ее фекальное загрязнение, поэтому кишечную палочку относят к санитарно-показательным микроорганизмам.

E. coli представляют собой короткие полиморфные палочки размером в среднем 0,5—1 мкм. Имеют перитрихально расположенные жгутики, спор не образуют, грамтрицательны. Встречаются неподвижные штаммы. Некоторые разновидности образуют капсулу. Факультативные анаэробы, хорошо растут на простых питательных средах при рН 7,2—7,8 и температуре 37°C, но выдерживают довольно значительные колебания этих показателей. Штаммы, выделенные из кишечника человека и теплокровных животных, хорошо развиваются при температуре 43—45°C, что используют при выращивании посевов. При росте в жидких средах *E. coli* дают диффузное помутнение и осадок. На плотных питательных средах колонии средней величины (2—4 мм), круглые, слегка выпуклые, мутные, с гладкой, блестящей поверхностью. На дифференциально-диагностических средах (Эндо, Левина) колонии окрашены в цвет индикаторной краски, входящей в состав среды. На среде Эндо колонии кишечной палочки малиново-красного цвета с металлическим блеском, на среде Левина — сине-фиолетовые. [39,29,62]

Штамм кишечной палочки *Escherichia coli* Nissle 1917 считается наиболее

эффективным пробиотиком, помогающим уменьшить воспаление и оттянуть следующий приступ язвенного колита. [19]

Бифидобактерии (лат. *Bifidobacteria*). Род *Bifidobacterium* семейства *Actinomycetaceae* отдела *Firmicutes* образован неподвижными палочками размером 0,5-1,3x1,5-8 мкм. Палочки бифидобактерий могут быть утолщёнными на концах или ветвиться. В мазках они располагаются одиночно, парно, в виде палисады или римской цифры «V», что делает их похожими на дифтероиды. По Граму бифидобактерии окрашиваются неравномерно; кислотонеустойчивы. Оптимум pH 6,0; температурный оптимум 37 - 40 °C. [13]

Бифидобактерии — это апатогенные микробы, участвуют в белковом, жировом и минеральном обмене, в выработке витаминов и ферментов, активно продуцируют кислоты, губительные для сальмонелл, стафилококков, возбудителей дизентерии. В норме бифидобактерии начинают заселять кишечник новорожденного с первых часов его появления на свет и к 5—6-м дню жизни уже становятся в нем преобладающими.

Бифидобактерии ферментируют с образованием кислот (преимущественно уксусной и молочной) глюкозу, лактозу, сахарозу и маннит. Они хорошо растут на обычных мясо-пептонных сахарных средах, но нуждаются во внесении в среду витаминов. Бифидобактерии обитают в полости рта и кишечнике млекопитающих; составляют более 40-50% всей микрофлоры кишечника. Бифидобактерии вырабатывают витамины группы В и антибиотические субстанции, подавляющие рост условно-патогенных микроорганизмов. Другой механизм подавления условно-патогенной микрофлоры обусловлен их способностью связывать рецепторные структуры эпителиальных клеток (с ними взаимодействует большинство бактерий). [58,42]

Бифидобактерии обитают в полости рта и кишечнике млекопитающих; составляют более 40-50% всей микрофлоры кишечника. Бифидобактерии вырабатывают витамины группы В и антибиотические субстанции, подавляющие рост условно-патогенных микроорганизмов. Другой механизм

подавления условно-патогенной микрофлоры обусловлен их способностью связывать рецепторные структуры эпителиальных клеток (с ними взаимодействует большинство бактерий).[29]

К положительным свойствам бифидобактерий относят: высокая приспособленность к различным условиям существования; разнообразие метаболических процессов, генетическая, биохимическая вариабельность; устойчивость к литическим и пищеварительным ферментам. Конечными продуктами метаболизма бифидобактерий являются сильные кислоты - молочная и уксусная, которые снижают рН кишечного содержимого и обладают в связи с этим антибактериальными свойствами, продуцируют витамины, в основном группы В, и некоторые ферменты, такие как казеинфосфатаза и лизоцим, способны восстанавливать нормальный баланс микрофлоры после проведения массивной антибиотикотерапии. (рис.1.1.)

Рост бифидобактерий сопровождается их активной адгезией на эпителиальные клетки, предотвращая фиксацию грамположительных бактерий.

Таким образом, к положительным свойствам бифидобактерий относят: высокая приспособленность к различным условиям существования; разнообразие метаболических процессов, генетическая, биохимическая вариабельность; устойчивость к литическим и пищеварительным ферментам.[61]

Лактобактерии (лат. *Lactobacillus*). Род *Lactobacillus* семейства *Lactobacillaceae* отдела *Firmicutes* состоит из палочковидных бактерий размером 1,0-10x0,5-1,2 мкм. Лактобациллы характеризуются сложными потребностями в источниках питания, слабой дыхательной активностью, незначительным воздействием на белки и жиры. Для них приятны анаэробные или микроаэрофильные условия культивирования, они относительно кислотоустойчивы, лучше всего растут при рН 5,5. Физиологически они близки к кислым (ниже), чувствительностью к неблагоприятным условиям, особенно к избытку кислорода. Лактобациллы обнаруживают в молочных, зерновых и к роду *Strept-*

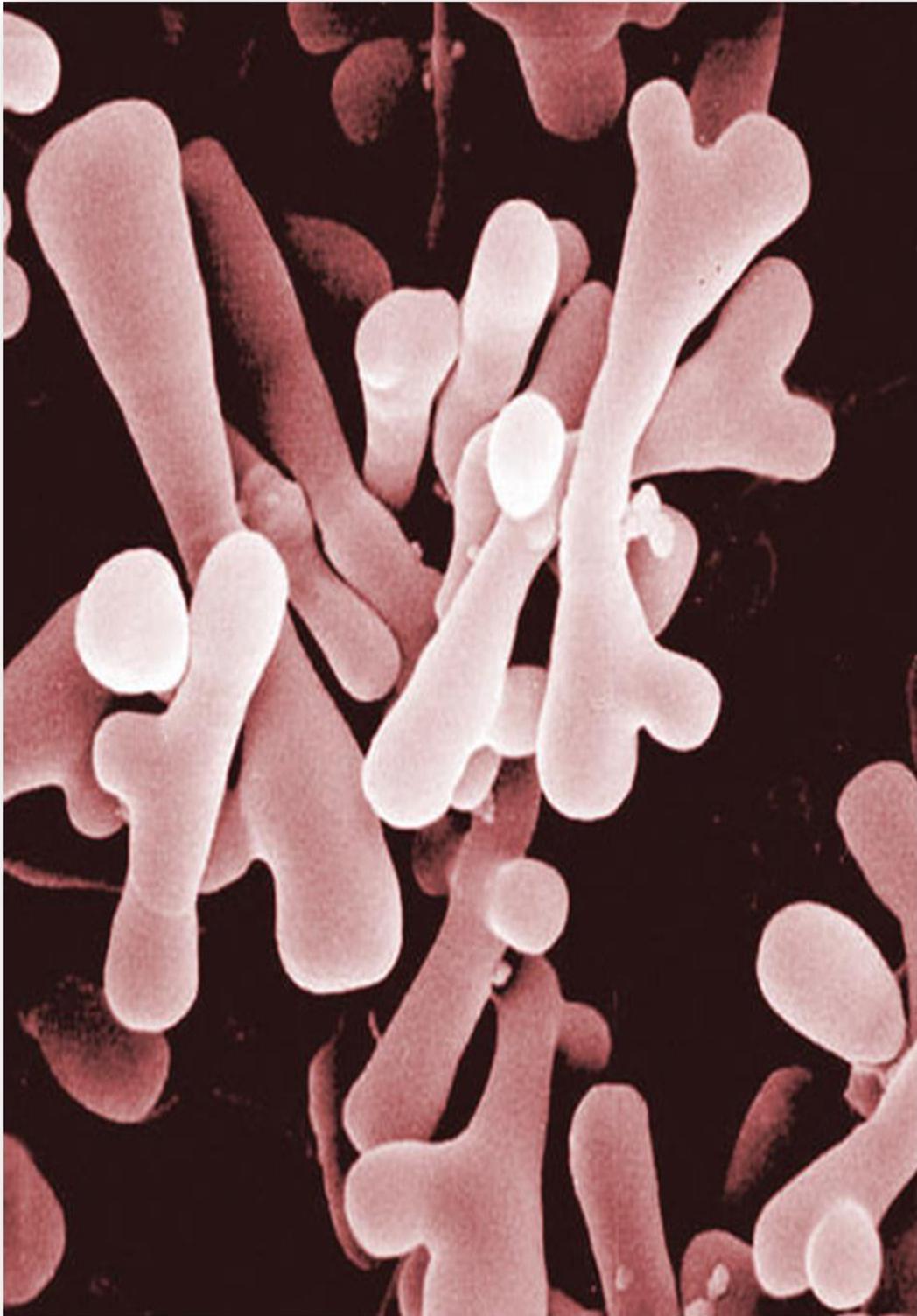


Рис.1.1.Бифидобактерии (лат. Bifidobacteria)[55]

tococcus, отличаясь от него главным образом формой клеток, активностью роста, способностью расти в средах с более низким рН(3,8 и мясных продуктах, сточных водах, пиве, вине, фруктах и соках, соленьях и маринадах.[21]

Видовой состав лактобацилл в различных отделах ЖКТ и влагалище неодинаков: в полости рта обитают *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus* (палочка Боаса-Опплера), *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. brevis* и *L. Buchneri*; в желудке и тонкой кишке лактобацилл нет или их очень мало (от 0 до 10^4 в 1 г фекалий); в толстой кишке содержание лактобацилл в 1 г фекалий достигает 10^6 - 10^{10} и более; основные виды-- *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. brevis*. Изменения в рационе приводят к варьированию видового состава; растительная диета способствует колонизации лактобацилл, преобладание в рационе мяса подавляет её; во влагалище лактобациллы идентифицируют как влагалищные палочки, или лактобациллы Дедерлейна; у 80% здоровых женщин их число достигает 10^5 - 10^7 /мл; обычно выделяют 5-6 видов-- *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*, *L. cellobiosus*. Свойства лактобацилл используют для коррекции дисбактериозов ЖКТ и влагалища, применяя лактобактерин, ацидофилин, «наринэ», пропионовоацидофильное молоко. (рис.1.2.)[58]

Лактобациллы также можно классифицировать по некоторым фенотипическим признакам. Например, по способности образовывать газ при ферментации глюкозы их разделяют на газонеобразующие и газообразующие. Лактобациллы требовательны к составу питательных сред и нуждаются во внесении в них аминокислот, витаминов, жирных кислот, углеводов и производных нуклеиновых кислот (индивидуальные для каждого вида). На КА образуют сероватые S-колонии, окружённые зоной α -гемолиза. Температурный оптимум 30-40°C; оптимум рН 5,5-5,8. Видовую принадлежность определяют по биохимическим свойствам и способности расти при разных температурах. Образование молочной кислоты лактобациллами. Все лактобациллы разделя-

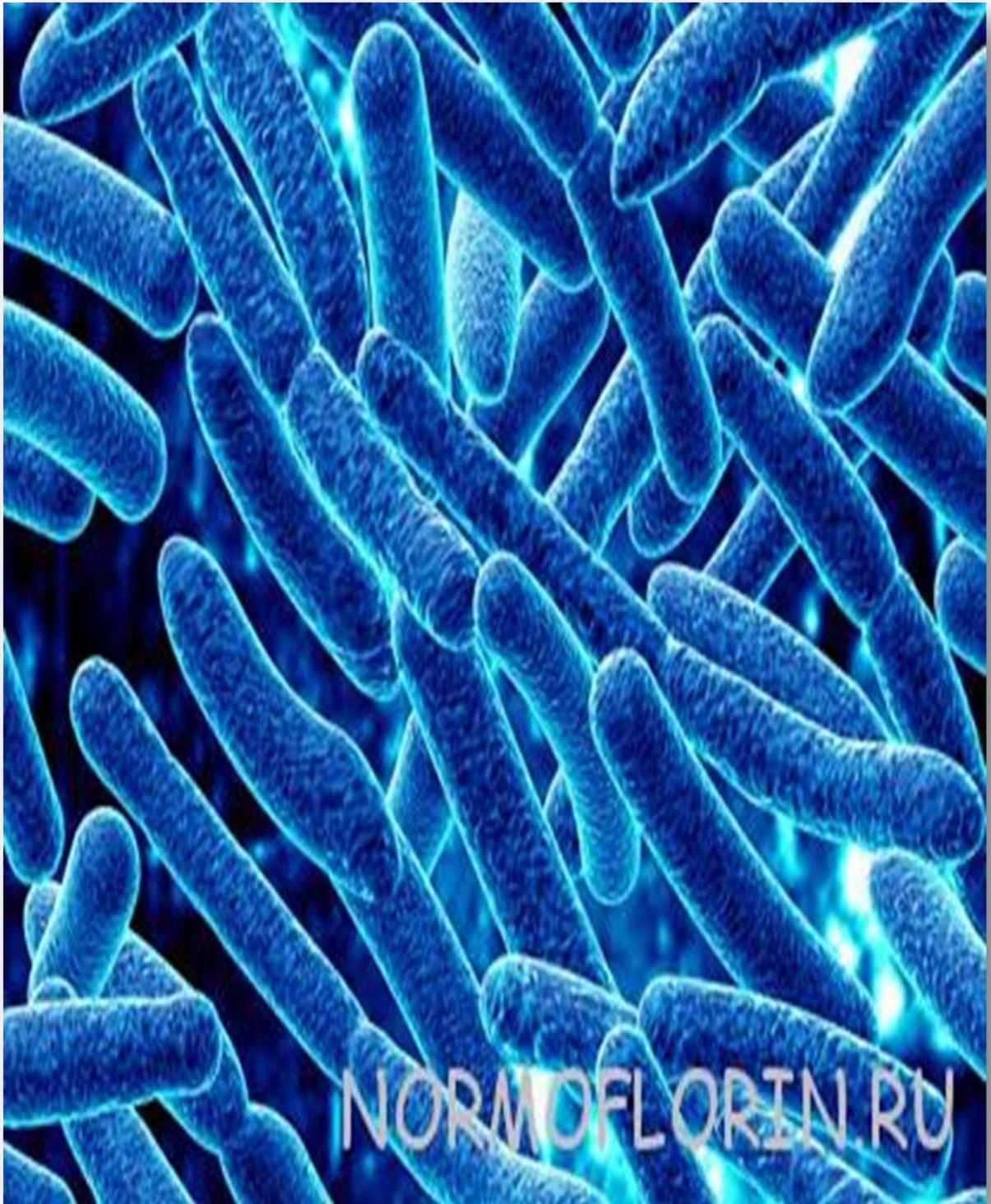


Рис.1.2. Лактобактерии (лат. Lactobacillus)[58]

ют по количественному образованию молочной кислоты при ферментации углеводов: различают строго гомоферментатив-ные (85% лактата), строго гетероферментативные (50% лактата) и факультативно-гетероферментативные (около 65-70% лактата) лактобациллы.

Лактобациллы также можно классифицировать по некоторым фенотипическим признакам. Например, по способности образовывать газ при ферментации глюкозы их разделяют на газонеобразующие и газообразующие.

Газонеобразующие лактобациллы чаще образуют плоские и узорчатые колонии на плотных средах (например, молочно-печёночный агар с дрожжевым экстрактом); в мазках преимущественно выявляют палочки и нитевидные формы. Газообразующие бактерии образуют мягкие вязкие беловатые колонии; в мазках доминируют короткие палочки.[24]

Положительные свойствам лактобактерий:

1. высокая антагонистическая активность в отношении патогенных микроорганизмов;
2. высокая протеолитическая активность;
3. иммуномодулирующее действие;
4. снижение активности кишечных ферментов, повышающих риск канцерогенеза.

Одним из важных свойств молочнокислых бактерий является формирование колонизационной резистентности, которая заключается в предотвращении адгезии патогенных агентов к кишечной стенке и их последующей колонизации, предотвращении проникновения в кровоток патогенных микроорганизмов. Экзогенные молочнокислые бактерии стимулируют колонизацию кишечника нормальной микрофлорой. [33]

В настоящее время известно более 100 видов *Lactobacillus* (лактобактерий). Наиболее распространенными являются сырная палочка (*Lactobacillus casei*), ацидофильная лактобактерия (*Lactobacillus acidophilus*), дельбрюковская палочка (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*), болгарская

лактобацилла (*Lactobacillus bulgaricus*) и молочнокислая палочка (*Lactobacillus plantarum*).

Одной из важнейших функций лактобактерий является участие в процессах формирования системной и местной иммунной резистентности (сопротивляемости) организма-хозяина. Это происходит благодаря универсальным иммуномодулирующим свойствам лактобацилл. Активируя механизмы гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответов, лактобациллы стимулируют иммунную систему, функции ретикуло-эндотелиальной системы кишечного тракта и продукцию ряда цитокинов (клеток-регуляторов процесса формирования иммунитета). Лактобактерии активизируют пролиферацию (размножение) и дифференцировку (умение выполнять определенную роль) иммунокомпетентных клеток; приводят к индукции выработки иммуноглобулинов на местном и системном уровнях. Активируя механизмы гуморального и клеточно-опосредованного иммунного ответов, лактобациллы стимулируют иммунную систему, функции ретикуло-эндотелиальной системы кишечного тракта и продукцию ряда цитокинов (клеток-регуляторов процесса формирования иммунитета). Лактобактерии активизируют пролиферацию (размножение) и дифференцировку (умение выполнять определенную роль) иммунокомпетентных клеток; приводят к индукции выработки иммуноглобулинов на местном и системном уровнях. Они проявляют весьма выраженные антиканцерогенные свойства, усиливая цитотоксические функции Т-лимфоцитов, макрофагов и естественных киллеров (ЕК). То есть лактобациллы не только сами убивают патогенные клетки, но и активизируют собственные противораковые силы организма человека.[33]

Они проявляют весьма выраженные антиканцерогенные свойства, усиливая цитотоксические функции Т-лимфоцитов, макрофагов и естественных киллеров (ЕК). То есть лактобациллы не только сами убивают патогенные клетки, но и активизируют собственные противораковые силы организма человека.[50]

3. Получение пробиотиков и их практическое использование.

Термин «пробиотики» предложен в 1974 г. Паркером для обозначения организмов и субстанций, обеспечивающих равновесие кишечной микрофлоры. Пробиотики от лат. Pro “для”+ греч. Bio “жизнь”- это полезные микроорганизмы, которые создают нормальную микрофлору пищеварительного тракта. Пробиотические культуры попадая в пищеварительный тракт стимулирует иммунную систему, подавляет размножение гнилостных бактерий и восстанавливает баланс кишечной микрофлоры, это приводит к снижению риска возникновения многих заболеваний.[23]

С учётом направленности действия пробиотики можно классифицировать на следующие группы:

- 1.Используемые для обеспечения функционального питания;
- 2.Используемые для реабилитационной терапии и нормализации микробиоценоза после длительного применения антимикробных средств (антибиотики, сульфаниламиды);
- 3.Применяемые для коррекции иммунитета, стимуляции роста и развития;
- 4.Применяемые для терапии при заболеваниях бактериальной и вирусной этиологии.

Пробиотики обладают фармакологическим действием. Их положительный эффект обусловлен участием в процессах пищеварения и метаболизма организма хозяина, биосинтезом и усвоением многих биологически активных веществ, обеспечением резистентности микроорганизмов.[30]

Микроорганизмы, составляющие основу пробиотиков, являются представителями нормальной флоры ЖКТ и заселяя его, способствуют восстановлению пищеварительной, обменной и защитной функций. При приеме пробиотиков, как правило, не развиваются побочные реакции, они не имеют противопоказаний к применению. Большинство пробиотиков (бифидумбактерин, лактобактерин, аципол, ацилакт, бифилиз) могут быть

использованы уже с первых дней жизни, в том числе, и для недоношенных детей.

Пищеварительный тракт представляет собой микробиоценоз, обеспечивающий защиту и развитие организма. С первых минут жизни в желудочно-кишечный тракт поступает множество разнообразных групп микроорганизмов, однако не все они приживаются в кишечнике. В процессе эволюционного развития сформировался определенный микробиоценоз кишечника, обусловленный постоянной нормальной, или резидентной, микрофлорой.[32]

Кишечник заселяется антигенно чужеродной микрофлорой, тем не менее, кишечная иммунная система сохраняет нормальный гомеостаз и фактически толерантна к большинству кишечных микроорганизмов. Толерантность отражает преимущества, свойственные постоянной кишечной микрофлоре, обеспечивающий организм хозяина некоторыми питательными веществами, включая короткоцепочные жирные кислоты, а также витаминами К и группы В, аминокислотами, колонизируя желудочно-кишечный тракт и постоянно присутствуя в нем, нормофлора обеспечивает основную защитную функцию макроорганизма, в то время как микроорганизмы являются транзиторными.

Основные представители микробиоценозов кишечника – молочнокислые и бифидобактерии. Популяции этих бактерий расположены на поверхности оболочки слизистой, примыкая к мембранам энтероцитов, или локализованы в непосредственной близости от поверхности эпителия, в слое муцина, покрывающего мембраны эпителиальных клеток. С учетом этого принципа микроорганизмы, ассоциированные со слизистой оболочкой, составляют мукозную микрофлору, а локализующиеся в просвете – полостную.[30,31]

Постоянное присутствие в кишечнике адгезированных на его стенке резидентных микроорганизмов предотвращает размножение патогенов, их внедрение в энтероциты и прохождение через кишечную стенку. Благодаря успешной конкуренции за необходимые питательные вещества или за

эпителиальные места прикрепления, бактерии кишечника предотвращают кишечную колонизацию патогенными микроорганизмами. Образуя антимикробные соединения, энергозависимые жирные и химически модифицированные желчные кислоты, бактерии кишечника создают локальную окружающую среду, неблагоприятную для развития патогенных микроорганизмов. Резидентная кишечная микрофлора стимулирует восстановление иммунных клеток подслизистого слоя, который образует второй слой защиты. Поэтому важную роль в восстановлении нормального микробиоценоза кишечника играют пробиотики, созданные на основе живых микроорганизмов- представителей нормальной микрофлоры.[31]

В настоящее время появилось новое понятие – биотерапевтические агенты (БТА), представляющие собой препараты микроорганизмов на основе штаммов лактобифидобактерий. Бифидумбактерин, лактобактерин, кисло-молочный бифидумбактерин относятся к категории БТА. Для этих препаратов характерна способность выживать в кислой среде, эффективно прикрепляться к эпителиоцитам, осуществлять колонизацию слизистой, продуцировать антимикробные субстанции, стимулировать иммунную систему, предупреждать избыточный рост и размножение патогенных микроорганизмов, восстанавливать нормальную микрофлору.

Эффективной мерой (профилактической и лечебной) борьбы с дисбактериозом является применение биологических препаратов, нормализующих микрофлору желудочно-кишечного тракта человека. Особенно эффективны препараты прямого действия, в состав которых входят активные микроорганизмы – представители облигантной микрофлоры пищеварительного тракта. К ним относятся молочно-кислые, целлюлозолитические, лактоферментирующие бактерии, E.coli и др. Что касается препаратов косвенного действия (убитые микробы, продукты микробного синтеза), то они могут активизировать и нежелательную микрофлору.[55]

Биологические препараты природного происхождения, содержащие жи-

вые или лиофильно высушенные бактерии различных видов (колибактерин, бификол, лактобактерин, линекс и др.), наряду с положительными эффектами, проявляющимися в благоприятном воздействии на пищеварение, в поддержании и регулировании физиологического равновесия кишечной микрофлоры, обладают рядом существенных недостатков, ограничивающих их эффективность, а именно: ограниченной антагонистической активностью, используемой в производстве штаммов, узким спектром дисбиотической коррекции препаратов, зависимостью эффекта от количества жизнеспособных микробных клеток, содержащихся в препарате, а также от адгезивной способности микроорганизмов, участием микроорганизмов препарата в межмикробных взаимодействиях. Использование препаратов способствовало положительной динамике копрологических показателей: содержание перевариваемой клетчатки, внутриклеточного крахмала и йодофильной микрофлоры.[52,53]

Вывод.

1. Изучение методов микробиологического синтеза биологически активных веществ, обзор основных этапов биотехнологического производства показало следующие этапы: получение ассоциации чистых культур, подготовки питательных сред, выращивание на питательных средах, накопления биомассы, ферментация, лиофильное высушивание и расфасовка препарата в ампулы.

Основные микроорганизмы, используемые для создания пробиотиков должны обладать следующими свойствами:

1. высокая антагонистическая активность в отношении патогенных микроорганизмов;
2. высокая протеолитическая активность, устойчивым к литическим и пищеварительным ферментам;
3. иммуномодулирующее действие;

4.снижение активности кишечных ферментов, повышающих риск канцерогенеза;

5.разнообразие метаболических процессов, генетическая, биохимическая вариабельность;

6. высокая приспособленность к различным условиям существования.

В клинической практике, пробиотики -являются эффективными лечебно-профилактическими средствами, их применяют для нормализации экологических систем человека. Эти препараты имеют ряд преимуществ: они физиологичны, имеют выраженную антимикробную активность в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, оказывают иммуностимулирующее и пртивовоспалительное действие, осуществляют коррекцию моторной функции кишечника.

Глава II. МЕСТО, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

1. Место исследований.

Место исследования проводились:

1. Научно-исследовательский институт Восточной Медицины, г.Самарканд.
2. Институт микробиологии АНРУз, г. Ташкент.

2. Объекты исследований.

Объектом для исследования служили местные штаммы бифидобактерий: *B.longum*-17X, *B.bifidum*-9C, *B.adolescentis*-30; и лактобактерий: *L.acidophilus* 180, *L.casei* 962/II, *L.rhamnosus* 9cX выделенных и идентифицированных в институте микробиологии АНРУз, представляющие собой лиофилизированную живую культуру штаммов.

3. Методы исследований.

Для определения видовой принадлежности свежевыделенных штаммов изучали их морфологические и биохимические свойства. Морфологические свойства изучали путём микроскопии окрашенных препаратов приготовленных из исследуемых молодых культур, выделенных на плотных или жидких питательных средах.

Преимущественно устанавливали активность культур по утилизации углеводов, определяли рН в культуральной среде вследствие кислотообразования.Для этого в модифицированную среду Блаурокка добавляли арабинозу, ксилозу, рамнозу, глюкозу, галактозу, трегалозу, рибозу,фруктозу, мальтозу, маннит, сорбит, инозит, салицин.

Концентрация углеводов составляла 0,5%. В качестве контроля была среда без добавления углеводов. Посевным материалом служила односуточная культура бифидо и лактобактерий, выращенные в жидкой среде Блаурокка и МРС, разведенная до 10^4 в физиологическом растворе. Количество вносимого инокулята в каждую пробирку со средой составляло 0,1 мл. Посевы инкубировали в термостате при 37°C, в течение 14 суток и просматривали про-

Бирки на 3, 5, 7, 10, 14 сутки. [20,25]

Антагонистическую активность бифидобактерий устанавливали по отношению к 4 штаммам тест-микробов : *E.coli* C-600, *S.typhimurium* B-869, *Pr.vulgaris* B-1667, , *Pz.aeruginosa* B-1484. Для лактобактерий к следующим 4 штаммам: *St.aureus* 003594/Wood , *Serratia marcescens* 367 , *Ps. aeruginosa* 114 и *Proteus morgani* 399. Для этого использовали метод совместного культивирования на жидких средах с тест-штаммами, с последующим высевом на плотные среды. Тест-штаммы выращивали на мясопептонном агаре 20 час, затем смывали стерильным физиологическим раствором и по стандарту мутности, соответствующему 10 ед., готовили микробную взвесь с содержанием клеток 10⁹/мл. Приготовленные взвеси каждого штамма бифидо- и лактобактерий и тест-культур вносили по 1 мл в пробирки с печеночным бульоном, разлитым по 9 мл. Контролем служило тоже количество микробной взвеси каждого тест-штамма, вносимое в печеночный бульон. Посевы инкубировали в термостате при 37-38°C в течение 48 час. После двухсуточного выращивания из посевов смешанных культур и контрольных делали десятикратные разведения в физиологическом растворе. Из разведений 10⁵, 10⁶, 10⁷ контрольных посевов и из разведений 10³,10⁴,10⁵ опытных высевали по 0,1мл.суспензии на чашки со средой. Каплю микробной взвеси равномерно растирали шпателем по поверхности агара и инкубировали в термостате 24 час. при 37°C.Для оценки степени антагонистического действия бифидо- и лактобактерий на тест-штаммы подсчитывали количество колоний тест-микробов, выросших на плотных питательных средах после совместного выращивания и без бифидобактерий.Количество колоний тест-штаммов выросших в монокультуре у бифидо- и лактобактерий устанавливали в мм [19]

.Чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов бифидо- и лактобактерий осуществляли при помощи Диско-диффузионного метода.

Инокулят готовили из чистой культуры изучаемого штамма, выросший на поверхности плотной питательной среды. Для этого 5-6 изолированных колоний

эмульгировали в 1-2 мл питательного бульона. В качестве посевного материала можно использовать также чистую 18-20 часовую бульонную культуру. Суспензию или бульонную культуру разводили физиологическим раствором хлорида натрия по мутности оптического стандарта, а затем полученную смесь разводили еще в 10 раз. Гидролизатно-молочную среду разливали по 20 мл в стерильные чашки Петри диаметром 100 мм. Перед нанесением инокулята среду подсушивали в течение 30-40 мин при комнатной температуре.

Инокулят в объеме 1,5-2 мл пастеровской пипеткой наносили на поверхность подсушенной агаровой среды, равномерно распределяли по поверхности путем покачивания чашки и той же пипеткой, наклонив чашку, тщательно удаляли избыток жидкости.

Приоткрытые чашки с нанесенным инокулятом подсушивали при комнатной температуре 10-15 мин. Затем на поверхность засеянной питательной среды накладывали диски с антибиотиками (не более 6 на чашку.). Чашки помещали в термостат сразу после положения дисков в перевернутом кверху дном положении. Инкубировали 18-20 час. при 37°C. Количество колоний тест-штаммов выросших в монокультуре у бифидо- и лактобактерий устанавливали в мм.[34,49]

Для выращивания штаммов бифидо- и лактобактерий использовали плотные, полужидкие. жидкие питательные среды: Блаурокка, гидролизатно-молочную и МРС.

Среду Блаурокка готовили по общепринятой методике: на 1 л печеночного отвара добавляли NaCl - 5 г, пептона - 10 г, лактозы - 10 г. агар-агара - 0,75 г. Стерилизовали при 121°C в течение 30 мин с предварительным прогревом паром 30 мин.

Кукурузно-лактозная среда - пептон - 10г, лактоза - 10 г, трехзамещенный натрий лимоннокислый - 5 г, кукурузный экстракт - 10 мл, ин солянокислый - 0,2 г. магний сернокислый - 0,2 г, натрий ионокислый однозамещенный - 2.0 г, агар-агар – 0,1 г, вода дистиллированная до 1000 мл. Стерилизация при

121°C 30 мин, рН ной среды 6,6-7,2.

Гидролизатно-молочную среду для лабораторных исследований готовили из восстановленного сухого обрата после гидроферментом протосубтилином Г10Х. Гидролизованное молоко разводили водой в соотношении 1:1, затем к гидролизату добавляли лактозы - 10 г, пептона - 5, NaCl - 5, ростактиваторы (кукурузный экстракт 0,5% или дрожжевой автолизат 5%), агар-агар - рН среды 7,2, стерилизация при 121°C, 15-20 мин.[12]

Полужидкая среда МРС-2 состоит из двух компонентов:
1. Гидролизат обезжиренного молока ферментативного сухого (ГОМ) в виде мелкодисперсного гигроскопического порошка бело-серого цвета - 33 г;
2. Агаризованный раствор минеральных компонентов (гель): марганец сернокислый - 0.1г, магнийсернокислый - 0.4г, калий фосфорнокислый двузамещенный - 4г, цистеин - 0.4г, глюкоза - 40г, пептон - 20г, автолизат дрожжей пекарских - 0.1л, натрий уксуснокислый - 10г, аммоний лимоннокислый двузамещенный - 4г, агар микробиологический - 2г, вода дистиллированная - до 1 л. [7]

Плотная среда МРС-4, содержащей (в граммах на 1 литр): 50,0 (или 5,0 сухого) - дрожжевого аутолизата обыкновенного; 500,0 - гидролизата обезжиренного молока жидкого; 20,0 - агар-агара; 10,0 - пептона; 20,0 - глюкозы; 1,0 - Твина-80; 2,0 - K_2HPO_4 ; 5,0 - ацетата натрия; 2,0 - цитрата аммония; 0,2 - $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05 - $MnSO_4 \cdot 4H_2O$; 0,2 - цистеина; 100,0 - печеночного экстракта; 0,04 - сорбиновой кислоты; воды дистиллированной до - 1 литра; 10% - раствора лимонной кислоты до рН среды 5,0 - 5,1.[2]

Вывод:

Морфологические свойства изучаются путём микроскопии окрашенных препаратов приготовленных из исследуемых молодых культур, выделенных на плотных или жидких питательных средах. Для определения видовой принадлежности свежевыделенных штаммов устанавливают активность культур по утилизации углеводов, определяя рН в культуральной среде вследствие

кислотообразования. Антагонистическую активность изучают методом совместного культивирования на жидких средах с тест-штаммами, с последующим высевом на плотные среды. Подавляемость тест культур измеряют в мм. Чувствительность штаммов в плотной питательной среде определяли в отношении 12 антибиотиков.

Глава III. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

1. Изучение морфологических и биохимических свойств местных штаммов бифидо- и лактобактерий.

В настоящее время в современной медицине и биотехнологии одной из актуальных проблем является разработка новых препаратов пробиотиков, содержащие новые нетоксичные биодоступные штаммы микроорганизмов, способных в процессе жизнедеятельности вырабатывать биологически активные вещества, подавлять рост патогенных микробов и злокачественных новообразований, различные патологические и биохимические процессы в организме человека . В последнее время для профилактики и лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта используют биопрепараты на основе молочно-кислых бактерий-бифидобактерий. Разнообразие метаболических процессов, генетическая и биохимическая вариабельность, устойчивость к литическим и пищеварительным ферментам послужили обоснованием для использования бифидобактерий при лечении различных заболеваний. Многообразие и возникающая антибиотикоустойчивость микроорганизмов, участвующих в развитии дисбиотических нарушений, а также вариабельность биосинтетических возможностей разных штаммов Бифидум обуславливает необходимость постоянного изучения новых штаммов, обладающих пробиотической активностью или являющихся продуцентами различных биологически активных веществ (БАВ).[43]

Пробиотики это живые микроорганизмы, которые при использовании оказывают положительное действие на здоровье человека. Бактерии, входящие в их состав должны обладать рядом важных свойств: оставаться устойчивыми и действию соляной кислоты, желчи и протеолитических ферментов, сохранять жизнеспособность в желудочно-кишечном тракте, иметь естественное происхождение, обладать антогонизмом к патогенным и условнопатогенным микроорганизмам, быстро размножаться и колонизировать кишечник, оказывать клинически положительный эффект. [22]

В связи с тем, что в состав большинство пробиотиков входят живые штаммы нормальной кишечной микрофлоры, то им присуще большинство её свойств и функций. Состав кишечных бактерий в пищеварительном тракте является постоянным, что связано со способностью микроорганизмов фиксироваться к строго определённым рецепторам эпителиальных клеток слизистой оболочки кишечника. В то же время выявлены три варианта нормального состава кишечных бактерий по функциональной активности нейтральные микроорганизмы (*E.colli*); потенциально патогенные микроорганизмы (*Bacteroidesspp*) и микроорганизмы способствующие поддержанию здоровья человека. Они включают определённые штаммы *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. [36]

Лиофилизированные живые штаммы бифидо- и лактобактерий :*B.longum*-17X, *B.bifidum*-9C, *B.adolescentis*-30, *L.acidophilus* 180, *L.casei* 962/II, *L.rhamnosus* 9cX восстанавливали методом разгонки, то есть переводим из состояния анабиоза путём пересадки их на жидкие среды. В начале лиофилизированные штаммы разводили в 1мл стерильного физиологического раствора и 0.1- 0.5мл высевали на жидкую среду МРС-2. Инкубацию проводили 24 часа при 37°C. Затем выполняли разведения от 10^{-1} до 10^{-8} в стерильном физиологическом растворе и высевали на чашки с плотной средой МРС-4. Рассев выполняли с каждого разведения. Инкубировали в течение 2-3 суток при 37°C в анаэробных условиях. Изолированные колонии пересеивали на полужидкую среду МРС-2.

Через 2-ое суток инкубации были изучены особенности морфологии колоний и клеток, изменчивость указанных фенотипических свойств при культивировании на различных средах.

Исследования, проведенные с помощью световой микроскопии, показали разнообразие морфологических форм клеток колоний бифидо- и лактобактерий.

Было показано, что штаммы имеют различную морфологическую форму: разветвленные, слегка изогнутые палочки, с булабовидными или шаровид-

ными утолщениями на одном или двух концах, или без ветвлений. (табл. 3.1.).

Для штаммов бифидобактерий клетки *B.bifidum*-9С и *B.adolescentis*-30 характерны палочки ветвящиеся, а штамма *B.longum*-17Х - булавовидные формы. Морфология штаммов изменялась в зависимости от состава питательной среды. На гидролизатно-молочных средах и молоке культуры имели склонность к образованию палочек без ветвлений, образующиеся палочки из 3-5 клеток. На средах Блаурокка и кукурузно-лактозной клетки имели четко выраженную форму - двуветвление. Клетки окрашивались слабо, однако внутри них видны более темно окрашенные гранулы. В динамике роста культуры происходили морфологические изменения на печеночной среде: к 3 часам культивирования выявлена двуветвление, к 6 часам культура образовывала скопления из клеток схожих на китайские иероглифы, к 8-ми часам размер клеток увеличивался, к 24 часам клетки имели булавовидные утолщения на концах, к 48 часам наблюдался полиморфизм, а к 72 часам клетки

Различные штаммы бифидобактерий различались по морфологии колоний: глубинные колонии в виде гвоздиков у штаммов *B.bifidum*-9С и *B.longum*-17Х; шаровидные колонии в форме кокков у штамма *B.adolescentis* 30.

При культивировании штамма лактобактерий *L.acidophilus* 180 в жидкой селективной среде МРС (бульон Мана, Рогоза и Шарпа) образует рыхлый осадок и равномерное помутнение через 24 часа. На плотной среде MRS образует круглые колонии с неровными краями, гомогенные, непрозрачные, пигмента не образуют, профиль колоний плоский, без блеска, легко снимаются петлей с поверхности плотной питательной среды. В мазках клетки имеют вид коротких и длинных прямых палочек, расположенных параллельно, образующих цепочки.

У штамма *Lactobacillus casei* 962/II клетки представляют собой средней длины палочки, с закругленными концами, могут складываться в длинные цепочки, каталазу не образуют.

На плотной питательной среде образует круглые выпуклые колонии с

Таблица.3.1.

Морфологические свойства бифидобактерий на полужидкой среде Блаурокка и лактобактерий на плотной питательной среде МРС-4.

Виды бактерий	Номер штамма	Форма колонии	Форма и величина клеток	Окраска	Тип дыхания
<i>B.bifidum</i>	9с	Отдельные, тонкие гвоздики с небольшим шлейфом	Палочки Y-образной формы 3,6, 4,2-0,5 мкм	+	анаэробное
<i>B.longum</i>	17х	Утолщенные гвоздики	Прямые палочки с утолщениями на концах 3,8-5,0 мкм	+	анаэробное
<i>B.adolesc-entis</i>	30	Колонии в виде шариков кокковидной формы	Разветвленные палочки Y, V-образной формы 3,2-5,0 мкм	+	анаэробное
<i>L.acidophilus</i>	180	круглые колонии с неровными краями гомогенные, непрозрачные, пигмента не образуют, профиль колоний плоский, без блеска	клетки имеют вид коротких и длинных прямых палочек, расположенных параллельно, образующих цепочки	+	анаэробное
<i>L.casei</i>	962/П	колонии круглые выпуклые с ровными краями, белого или кремового цвета..	клетки имеют вид средней длины палочки, с закругленными концами, могут складываться в длинные цепочки	+	анаэробное
<i>L.rhamnosus</i>	9сХ	колонии S-типа, круглые, с ровными краями, гомогенные, непрозрачные, пигмента не образуют, профиль колоний выпуклый, блестящие	клетки имеют вид коротких прямых палочек, расположенных параллельно	+	анаэробное

ровными краями, белого или кремового цвета. Отдельно выросшие колонии на полужидкой питательной среде имеют удлиненную форму колоний.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* 9сХ в жидкой селективной среде МРС образует рыхлый осадок и равномерное помутнение через 24 ч. На плотной среде MRS образует колонии S-типа, круглые, с ровными краями, гомогенные, непрозрачные, пигмента не образуют, профиль колоний выпуклый, блестящие, легко снимаются петлей с поверхности плотной питательной среды. В мазках клетки имеют вид коротких прямых палочек, расположенных параллельно. (рис.3.4;3.5;3.6)

Таким образом изучение морфологических особенностей колонии местных штаммов бифидо- и лактобактерий показало их различную морфологическую форму. Их морфология менялась в зависимости от состава питательной среды. (рис.3.1;3.2;3.3)

Для штаммов бифидобактерий клетки *B.bifidum*-9С и *B.adolescentis*-30 характерны палочки ветвящиеся, а штамма *B.longum*-17Х - булавовидные формы. Колонии на полужидкой среде Блаурокка различались по морфологии: глубинные колонии в виде гвоздиков у штаммов *B.bifidum*-9С и *B.longum*-17Х; шаровидные колонии в форме кокков у штамма *B.adolescentis* 30.

Для штаммов лактобактерий клетки *L.acidophilus* 180 имеют вид коротких и длинных прямых палочек, расположенных параллельно, образующих цепочки. На плотной среде MRS образует круглые колонии с неровными краями, гомогенные. У штамма *Lactobacillus casei* 962/II клетки представляют собой средней длины палочки, с закругленными концами, которые могут складываться в длинные цепочки. На плотной питательной среде штамм образует круглые выпуклые колонии с ровными краями, белого или кремового цвета.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* 9сХ на плотной среде MRS образует колонии S-типа, круглые, с ровными краями, В мазках клетки имеют вид коротких прямых палочек, расположенных параллельно. Морфология местных

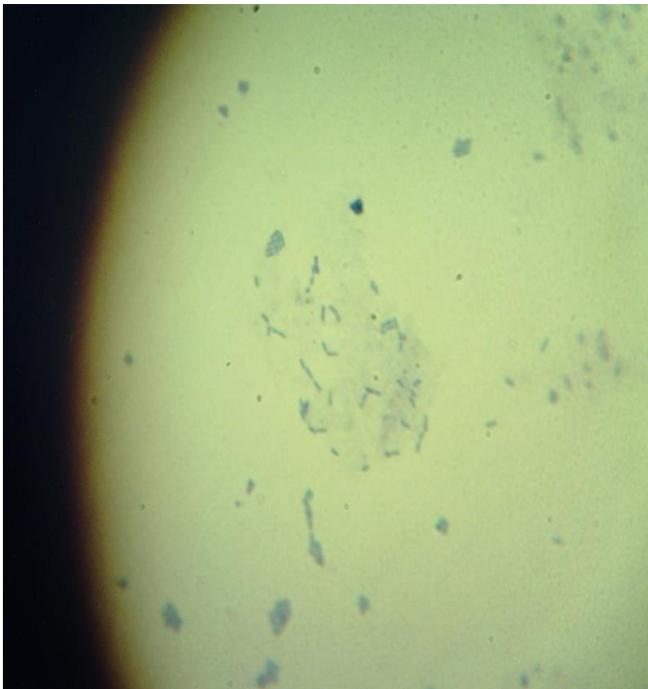


Рис.3.1.Строение клеток колоний бифидобактерий штамма *B.longum* 17x под световым микроскопом



Рис.3.2.Форма колоний бифидобактерий штамма *B. longum* 17x в полужидкой среде Блаурокка



Рис.3.3.- форма колоний бифидобактерий штамма *B. longum* 17x на плотной питательной среде МРС-4



Рис.3.4.Строение клеток колоний лактобактерий штамма *L.casei* 962/II под световым микроскопом



Рис.3.5.Форма колонии лактобактерий штамма *L.casei* 962/II в гидрализатно-молочной сред



Рис.3.6.Форма колоний лактобактерий штамма *L.casei* 962/II на плотной питательной среде МРС-4.

штаммов бактерий изменялась от состава питательной среды.

Изучение биохимических свойств бифидо- и лактобактерий, в частности способности ферментировать углеводы, является основой для видовой идентификации этих бактерий. Все молочнокислые бактерии используют в качестве источника энергии углеводы и расщепляют их с образованием молочной кислоты. Они обладают сахаролитической активностью, что лежит в основе классических схем их идентификации.

Идентификацию свежевыделенных штаммов бифидо- и лактобактерий проводили методом утилизации различных углеводов.

Классическая микробная схема идентификации местных штаммов бифидо- и лактобактерий основана на изучение метаболизма сахаров 16 углеводов. В зависимости от утилизации этих углеводов было установлены виды выделенных штаммов и их ферментативная активность.

Идентификацию свежевыделенных штаммов бифидо- и лактобактерий проводили методом утилизации различных углеводов, по определению изменения питательной среды в сторону подкисления

Из 16 тестов по ферментации углеводов показали различие между видами. (табл. 3.2.)

При ферментации углеводов местными штаммами бифидобактерий, такие углеводы, как рамноза, инулин, дульцит, не подвергаются ферментации с образованием кислоты. Из 3-х видов более слабой ферментационной способностью обладает штамм *B.bifidum* 9с.

Однако, в отличии от типовых штаммов американской коллекции АТСС 1186, 15696, 29521, которые ферментируют только лактозу и лактулозу, местный штамм *B.bifidum*-9С ферментирует активно рибозу, мальтозу, мелибиозу и медленно сахарозу, трегаллозу и маннит.

Наибольшей ферментативной активностью обладает местный штамм *B. longum*-17X сбразивал все 9 тестируемых углеводов - манноза, целлобиоза, рафиноза, трегалоза, арабиноза, ксилоза, салицин, маннит, сорбит. Штамм *B. adolescentis* 30 наиболее близок по ферментативным свойствам к типовому штамму *B. adolescentis*, слабее сбразивает маннозу и активнее маннит. Промежуточное положение двумя видами (*B. bifidum*, *B. adolescentis*) занимает вид *B. longum*-17X.

Штаммы бифидобактерий из тестируемых углеводов не ферментируют целлобиозу, салицин и маннит. Штамм бифидобактерий *B. longum*-17X по таксономическому положению наиболее близко стоит к виду *B. breve*. Однако, этот вид четко можно дифференцировать от *B. breve* по сбразиванию двух углеводов - арабинозы и меллицитозы. Таким образом наиболее ферментативной активностью обладают местный штамм *B. longum*-17X.

При ферментации углеводов местными штаммами лактобактерий, такие углеводы, как меллибиоза, арабиноза не подвергаются ферментации с образованием кислоты. Из 3-х видов более слабой ферментационной способностью обладает штамм *L. rhamnosus* 9сХ, не сбразивает 7 из тестируемых углеводов: мальтозу, меллибиозу, сахарозу, рафинозу, арабинозу, ксилозу, инулин.

Из лактобактерий нами были идентифицированы *L. acidophilus* 180, *Lactobacillus casei* 962/II и *Lactobacillus rhamnosus* 9сХ. Из которых наиболее ферментативной активностью обладал местный штамм *L. casei* 962/II сбразивал 13 тестируемых углеводов: манноза, целлобиоза, сахароза, трегалоза, ксилоза, салицин, маннит, сорбит, фруктоза, лактоза, инулин, мальтоза, галактоза.

Наибольшей ферментативной активностью обладает местный штамм *L. casei* 962/II сбразивал 13 тестируемых углеводов : манноза, целлобиоза,

Таблица 3.2.

Ферментация углеводов местными штаммами бифидобактерий и лактобактерий.

Виды бактерий	Номер штамма	Название углеводов															
		Фруктоза	Галактоза	Манноза	Лактоза	Мальтоза	Меллибиоза	Сахароза	Целлобиоза	Рафиноза	Трегаллоза	Арабиноза	Ксилоза	Инулин	Салицин	Маннит	Сорбит
<i>B.longum</i>	17x	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+	+	-	+/-	-	+/-
<i>B.bifidum</i>	9c	+	+	-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	+/-	-	-	+/-	+/-
<i>B.adolesc-entis</i>	30	+	+	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+/-	+/-	-	-
<i>L.acidoph-ilus</i>	180	+	+	+	+	+	-	+	+	+/-	+	-	+/-	-	+	-	-
<i>L. casei</i>	962/II	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+/-	+	+	+
<i>L.rhamno-sus</i>	9cX	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+

Примечание: обозначение “+” - изменение фиолетовой окраски на желтую, “-“ без изменения, “+/-“ - медленное сбразивание и изменение окраски.

сахароза, трегалоза, ксилоза, салицин, маннит, сорбит, фруктоза, лактоза, инулин, мальтоза, галактоза. Штамм *L. casei* 962/II слабее сбраживает инулин.

Штамм лактобактерий *L. acidophilus* 180 медленно сбраживает ксилозу и рафинозу, не сбраживает меллибиозу, арабинозу, инулин, маннит, сорбит. (рис.3.7; 3.8)

Проведённые исследования показали, что наиболее ферментативной активностью обладает местный штамм бифидобактерий *B. longum*-17X и лактобактерий *L. casei* 962/II.



Рис.3.7. Ферментация углеводов местными штаммами бифидобактерий



Рис.3.8. Ферментация углеводов местными штаммами лактобактерий.

2.Изучение антогонистических свойств выделенных штаммов бифидо- и лактобактерий и их устойчивости к антибиотикам.

Одной из важных сторон защитных функций бактерий нормальной микрофлоры является антогонистическая в отношении патогенных и условнопатогенных микроорганизмов. Благодаря биохимической активности микроорганизмов пищеварительного тракта , обладающих выраженной антогонистической активностью, попадающие из вне патогенные микроорганизмы быстро элиминируются из кишечника, что предотвращает развитие инфекционного процесса. Доказана роль лактобактерий в поддержании микробного баланса, благодаря продукции молочной кислоты и специфической адгезии эпителию толстой кишки.[26]

Бифидобактерии продуцируя уксусную и молочную кислоту , препятствуют размножению гнилостной и патогенной микрофлоры, нормализуют перистальтику, участвуют в процессах витаминобразования.

Бифидо- и лактобактерии обеспечивают развитие комплекса неспецифических и специфических иммунологических реакций, формируя защитно-адаптивные механизмы организма.

Органические кислоты некоторых микроорганизмов обладают антимикробными свойствами по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам, в том числе не исключены бифидо и лактобактерии, которые образуют антибиотические вещества пептидной природы.[44]

Нами были изучены антимикробные свойства местных штаммов бифидо- и лактобактерий к возбудителям кишечных заболеваний.(рис.3.9;3.10)

Для этого использовали метод совместного культивирования на жидких средах с тест-штаммами, с последующим высевом на плотные среды. Для оценки степени антагонистического действия бифидо- и лактобактерий на тест-штаммы подсчитывали количество колоний тест-микробов, выросших на

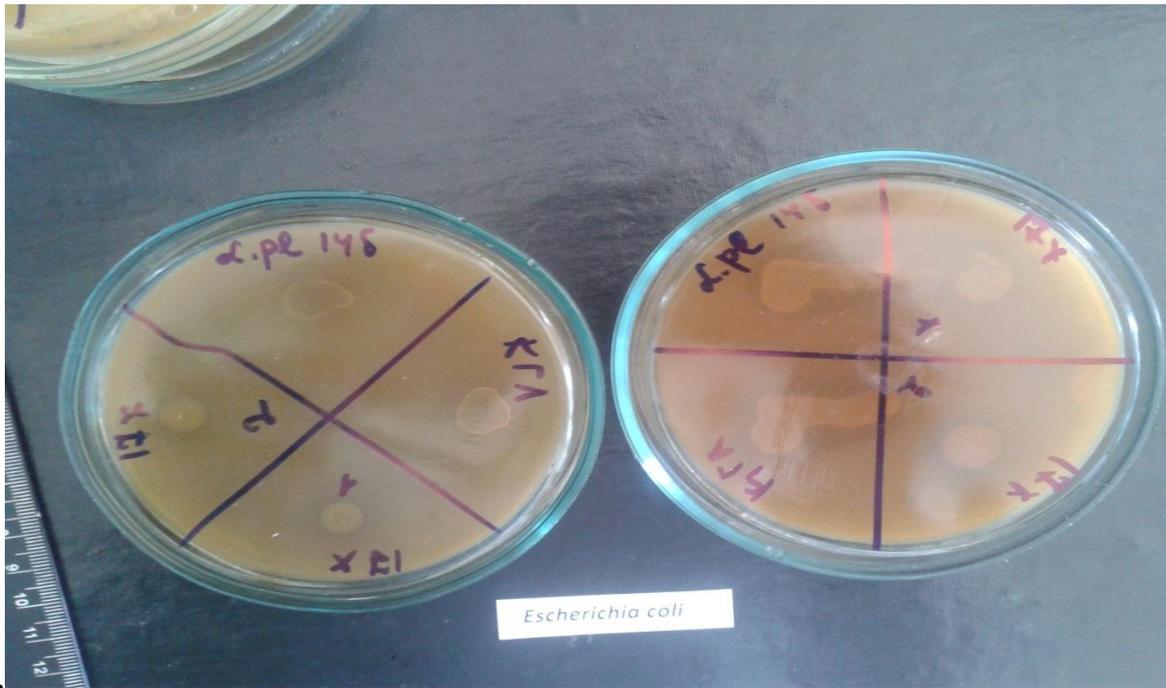


Рис.3.9. Антогонистическая активность штаммов бифидобактерий к местному патогенному штамму *E.coli* (C-600)

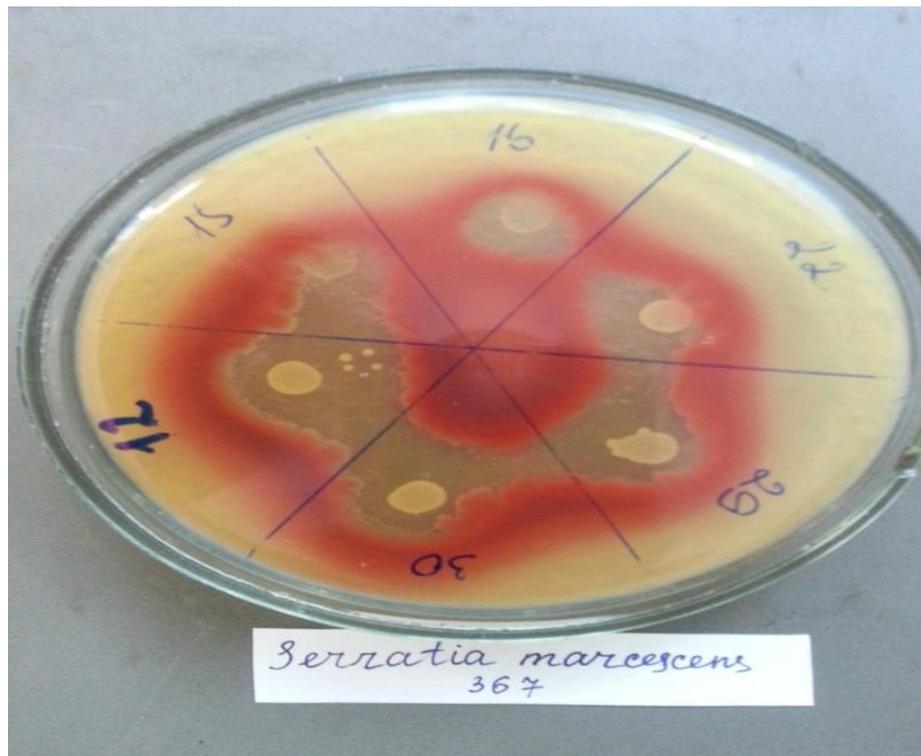


Рис.3.10. Антогонистическая активность штаммов лактообактерий к местному патогенному штамму *Serratia marcescens* 367

плотных питательных средах после совместного выращивания. Подавляемость патогенных штаммов измерялась в мм. Антагонистическую активность бифидобактерий устанавливали по отношению к 4 штаммам тест-микробов : E.coli C-600, S.typhimurium B-869, P.vulgaris B-1667, P.aeruginosa B-1484. morganii 399.(табл.3.3).

Таблица 3.3.

Антагонистическая активность местных штаммов бифидобактерий

Виды бактерий	Номер штамма	Подавляемость тест -культур, мм			
		E.coli C-600	S.typhimurium B-869	P.vulgaris B-1667	P.aeruginosa B-1484
B.longum	17x	30	32	31	28
B.bifidum	9c	13	12	10	13
B.adolescentis	30	22	26	25	30

После совместного культивирования с патогенными микроорганизмами E.coli (C-600), S.typhimurium (B-868), P.vulgaris (B-1667) ,P.aeruginosa (B-1484) в течение 24 часов. Все штаммы бифидобактерий B.longum-17X, B.bifidum-9C, B.adolescentis-30 подавляют рост патогенных микроорганизмов. Рост бактерий E.coli (C-600), S.typhimurium (B-868) полностью подавляется при совместном выращивании с местными штаммами бифидобактерий. Наиболее устойчивой тест-культурой по отношению к антимикробному действию бифидобактерий, является P.aeruginosa (B-1484).

Изучение антагонистических свойств выделенных штаммов бифидобактерий показало, что рост патогенных микроорганизмов E.coli (C-600), S.typhimurium (B-868), P.vulgaris (B-1667) ,P.aeruginosa (B-1484) полностью подавляются при совместном выращивании с выделенными штаммами бифидобактерий. Наибольшей антагонистической активностью обладал местный штамм B. longum 17x, наименьший B.bifidum9c.

Таким образом изучение антимикробных свойств местных штаммов бифидобактерий B.bifidum-9C, B.adolescentis-30, B.longum-17X показало, что все местные штаммы бифидобактерий проявляют наиболее сильные антаго-

нистические свойства на патогенные микробы *E.coli*(С-600) и *S.typhimurium* (В-868), наиболее слабо на рост патогенных микробов *P.vulgaris* (В-1667), *P.aeruginosa* (В-1484). (рис. 3.11)

Антагонистические свойства лактобактерий обусловлены продукцией органических кислот и с образованием веществ схожими с антибиотиками и пероксида водорода. Именно эти соединения предотвращают развитие других микроорганизмов [19]

Особую значимость изучения антагонистических свойств лактобактерий приобретает в свете внедрения в технологические циклы метода совместного культивирования , который является перспективным при создании перпоратов на основе нескольких штаммов бифидо- и лактобактерий.[7]

Антимикробные свойства местных штаммов лактобактерий устанавливали к местным 4 патогенным штаммам: *St.aureus* 003594/Wood , *Serratia marcescens* 367 , *Ps. aeruginosa* 114 и *Proteus morgani* 399 -возбудителям кишечных заболеваний. (табл.3.4) (рис. 3.12)

Таблица 3.4.

Антагонистическая активность лактобактерий

Виды	Номер штамма	Подавляемость тест культур, мм			
		<i>St. aureus</i> 003594/Wood-46	<i>Serratia marcescens</i> 367	<i>Ps.aeruginosa</i> 114	<i>Proteus morgani</i> 399
<i>L.acidophilus</i>	180	11	22	25	25
<i>L. casei</i>	962/II	21	25	2	25
<i>L.rhamnosus</i>	9сХ	9	23	14	29

После совместного культивирования с патогенными микроорганизмами *St.aureus* 003594/Wood-46, *Serratia marcescens* 367, *Proteus morgani* 399, *Ps aeruginosa* 114 в течение 24 часов ,все штаммы лактобактерий *L.acidophilus* 180, *L.casei* 962/II, *L.rhamnosus* 9сХ подавляют рост патогенных микроорганизмов.

Наиболее устойчивой тест-культурой по отношению к антимикробному

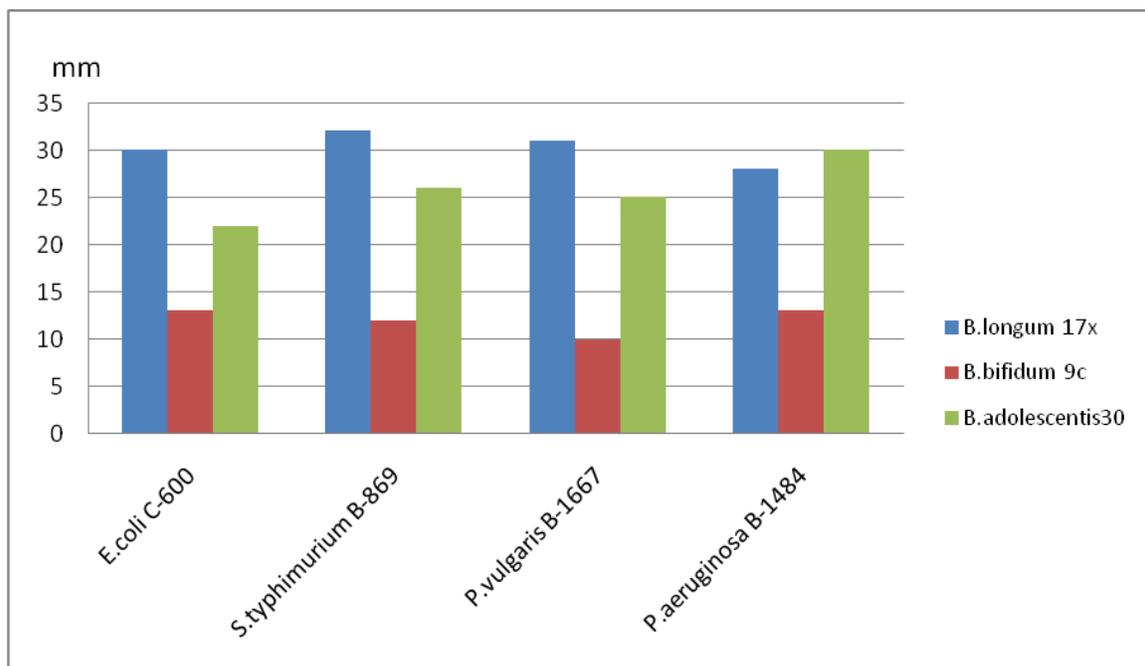


Рис.3.11. Антагонистическая активность местных штаммов бифидобактерий

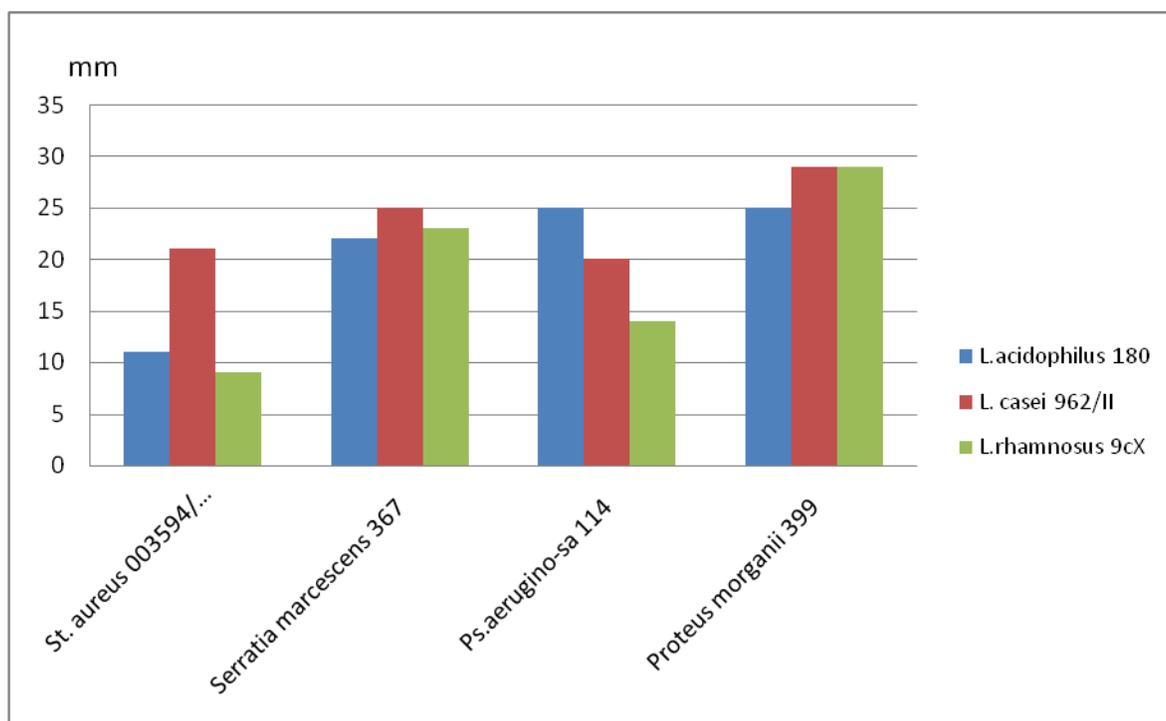


Рис.3.12. Антагонистическая активность местных штаммов лактобактерий

действию лактобактерий, является *St.aureus* 003594/Wood-46- от 9 до 21 мм, наиболее слабой оказался патогенный штамм *Proteus morgani* 399- от 25 до 29 мм.

Проведённые исследования показали антимикробные свойства местных штаммов лактобактерий *L.acidophilus* 180, *L.casei* 962/II, *L.rhamnosus* 9сХ и установлено, что все местные штаммы лактобактерий проявляют более сильные антогонистические свойства на патогенные микробы *Serratia marcescens* 367 и *Proteus morgani* 399, более слабо на рост патогенных микробов *Ps. aeruginosa* 114 и *St. aureus* 003594/Wood-46.

Изучение антогонистических свойств лактобактерий, показало, что все местные штаммы лактобактерий подавляют рост патогенных микроорганизмов *St.aureus* 003594/Wood-46, *Serratia marcescens* 367, *Proteus morgani* 399, *Ps. aeruginosa* 114. Из них наибольшей антагонистической активностью обладает местный штамм *L. casei* 962/II.

В связи с этим была изучена чувствительность местных штаммов бифидо- и лактобактерий к 12 антибактериальными препаратами: эритромицин, олеандомицин, бензилпенициллин, ампициллин, карбенициллин, линкомицин, оксациллин, тетрациклин, гентамицин, метациклин, стрептомицин, хлорамфеникол.

Опыты проведенных со штаммами учитывали на 4-е сутки, в течение которых имело место максимальное накопление микробной популяции микроорганизмов в контроле. (таблица 3.5.)

Исследования показали, что все штаммы бифидобактерий обладали высокой чувствительностью к эритромицину, олеандомицину, бензилпени-

Таблица 3.5.

Чувствительность местных штаммов бифидо- и лактобактерий к антибиотикам при
совместном культивировании

№	Антибиотики	Зона ингибирования, мм					
		<i>B.long-um</i> 17x	<i>B.adolesce-ntis</i> 30	<i>B.bifidum</i> 9c	<i>L.acidophi-lus</i> 180	<i>L. casei</i> 962/II	<i>L.rhamnos-us</i> 9cX
1	Эритромицин	25	27	38	35	27	38
2	Олеандомицин	14	16	22	18	14	22
3	Бензилпенициллин	22	25	34	30	25	34
4	Ампициллин	30	31	33	29	31	33
5	Карбенициллин	27	29	21	16	27	21
6	Линкомицин	26	28	30	28	23	30
7	Оксациллин	17	19	19	11	9	17
8	Тетрациклин	14	14	18	30	20	25
9	Гентамицин	9	11	13	12	17	16
10	Метицилин	12	10	13	15	12	13
11	Стрептомицин	9	10	11	26	14	26
12	Хлорамфеникол	8	10	10	24	10	15

циллину, ампициллину, карбенициллину и линкомицину. Чувствительность бифидобактерий к оксациллину, тетрациклину была несколько меньше. Все штаммы бифидобактерий были устойчивы к гентамицину, метициллину, стрептомицину, хлорамфениколу.

Все штаммы лактобактерий так же обладали высокой чувствительностью к эритромицину, олеандомицину, бензилпенициллину, ампициллину, карбенициллину, тетрациклину и линкомицину. Чувствительность лактобактерий к гентамицину, стрептомицину, хлорамфениколу была несколько меньше. Все штаммы лактобактерий были устойчивы к оксациллину, метициллину. Штамм *L.casei* 962/II оказался наиболее устойчивым к действию 4 антибиотиков: стрептомицину, хлорамфениколу, оксациллину, метициллину. Более слабую устойчивость оказал на олеандомицин, бензилпенициллин, тетрациклин и линкомицин. (рис.3.13)

Изучение чувствительности местных штаммов бифидо- и лактобактерий к 12 антибактериальными препаратами: эритромицину, олеандомицину, бензилпенициллину, ампициллину, карбенициллину, линкомицину, оксациллину, тетрациклину, гентамицину, метациклину, стрептомицину, хлорамфениколу показало, что по отношению к антибиотикам наименее чувствительны штаммы *B.longum* 17х и *L.casei* 962/II, которое позволяет отобрать их для совместного использования в создании комплексного мультивидового препарата. (рис.3.14;3.15.)

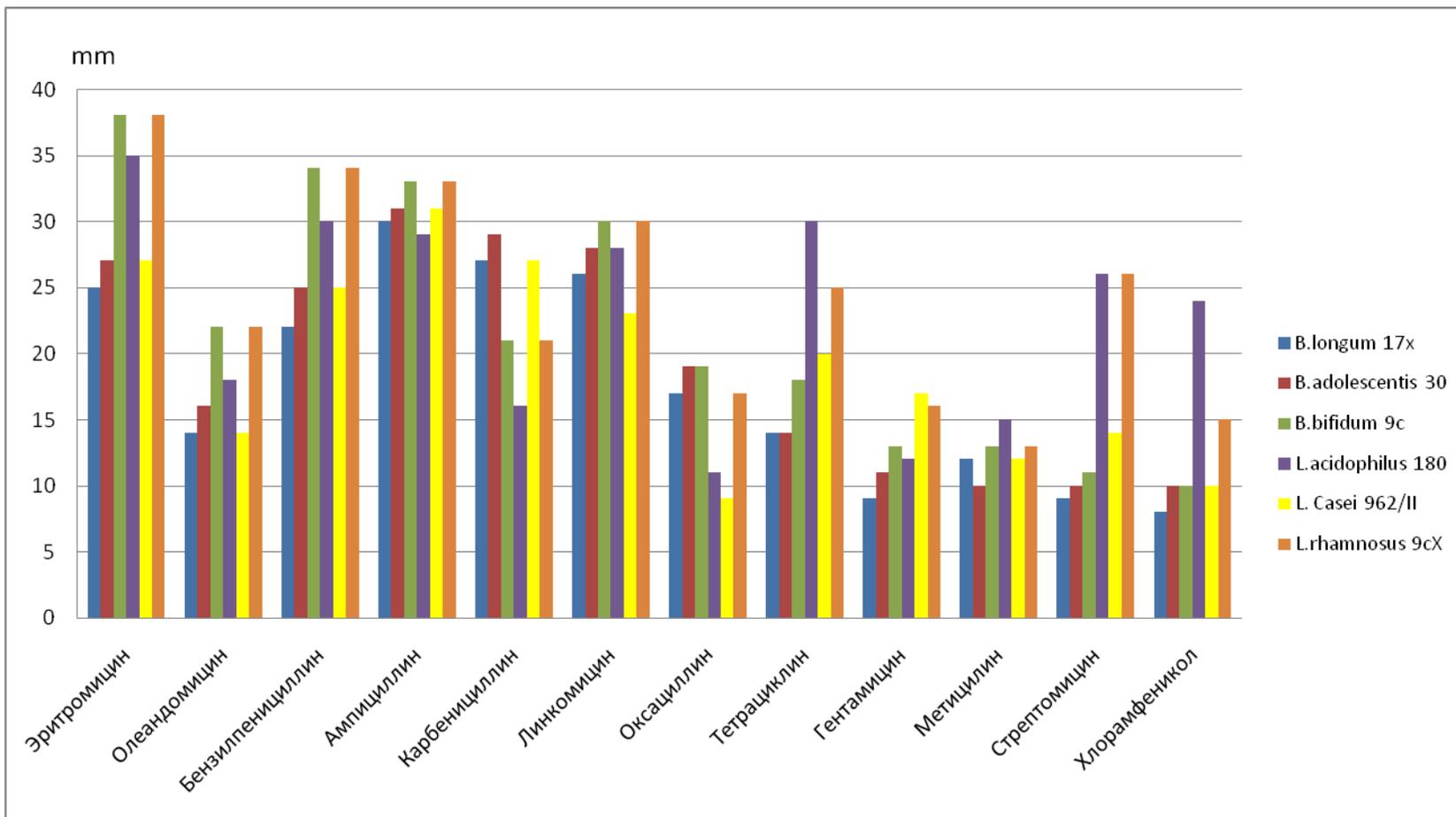


Рис.3.13. Чувствительность местных штаммов бифидо- и лактобактерий к антибиотикам при совместном культивировании

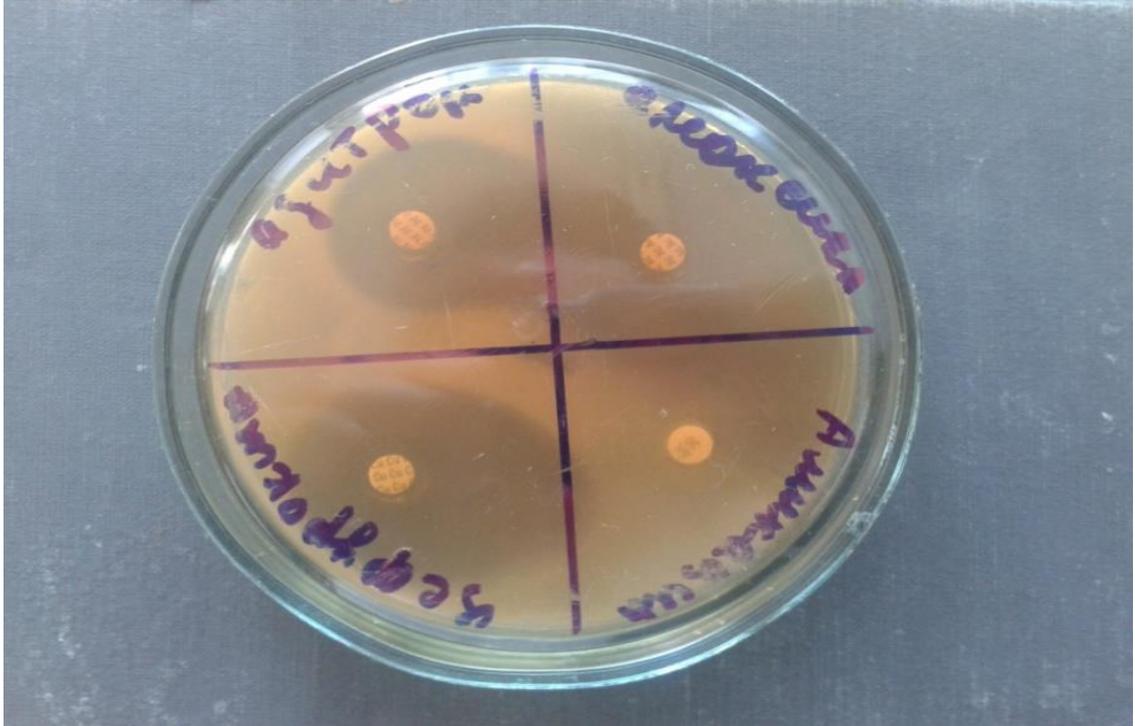


Рис.3.14. Чувствительность местных штаммов бифидобактерий к антибиотикам при совместном культивировании.

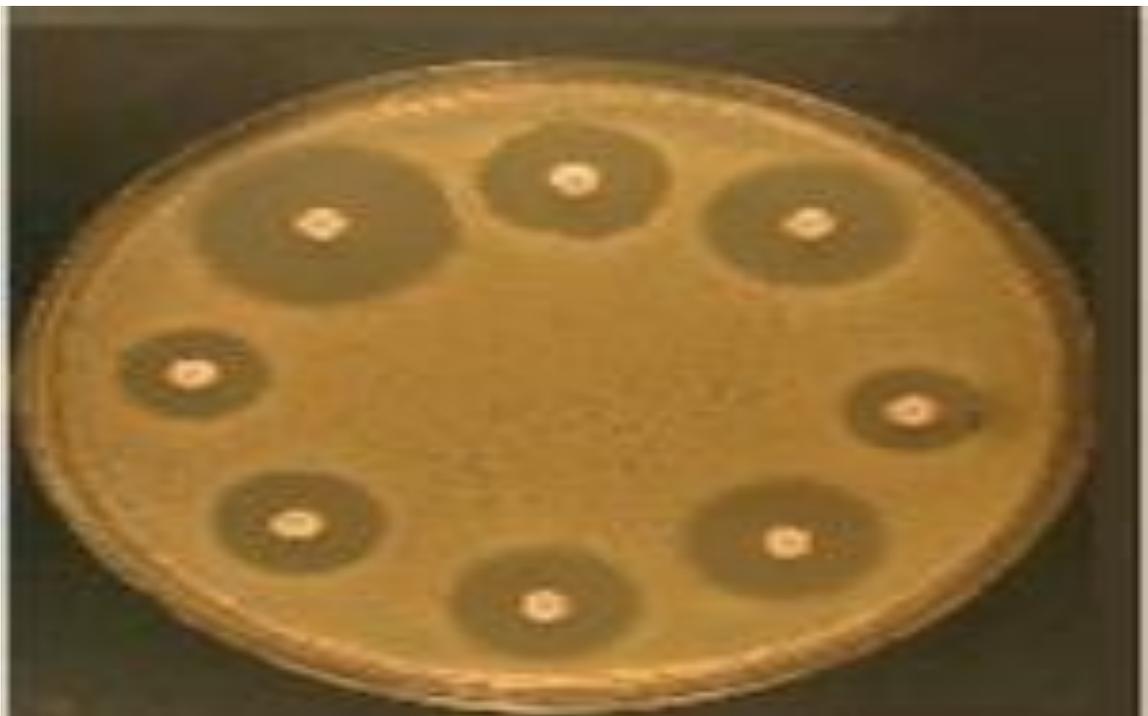


Рис.3.15. Чувствительность местных штаммов лактобактерий к антибиотикам при совместном культивировании.

3. Изучение биотехнологических основ получения пробиотиков на основе бифидо- и лактобактерий.

В связи с высокой лекарственной устойчивостью возбудителей многих инфекционных заболеваний, усилился интерес к разработке схем новых биопрепаратов, которые могут быть использованы для различного контингента людей, с разным профилем заболеваний и проживающих в изменяющихся условиях. В настоящее время разрабатываются комплексные биопрепараты, рационально считающие в себе важнейшие компоненты облигатной организменной формы, способных обеспечивать восстановление функции больного органа. Существенную роль в проявлении лечебного действия бактериальных препаратов наряду с антагонистической активностью штаммов играют их витаминобразующие, ферментативные и иммунизирующие свойства.[10]

Нами изучены технологии получения бактериальных препаратов бифидо- и лактобактерий.

В начале производственного цикла штаммы восстанавливают из состояния анабиоза путём пересадки на жидкие питательные среды, приготовленных на основе гидролизата молока, солодового экстракта с добавлением 1,5% желатина для лактобактерий и на среду Блаурокка для бифидобактерий. В промышленности этот процесс получил название разгонки.

При глубинном методе накопления биомассы культивирование бактерий ведут при температуре 37° С с перемешиванием, подачей воздуха и введением в качестве питательного субстрата 40% раствора глюкозы и лактозы. При культивировании в течение 8-10 часов получают микробные взвеси содержащие 10-15 млрд. живых бактерий в 1 мл.

Культивирование бифидо- и лактобактерий осуществляли в пробирках, того среды разливали высоким "столбиком" и стерилизовали в лаве при 121°С с предварительным прогревом паром 30 мин и лиофилизацией 20-30 мин.

Перед посевом среды регенерировали путем кипячения в течение 30-40 мин для удаления свободного кислорода. Быстро охлаждая 40-45°C, посев производили в нижний слой среды. В опытах по подбору состава среды и влияния условий культивирования на ростовые процессы бактерий, их выращивали в колбах Эрленмейера объемом 50, 100, 1000 мл. Для получения культуры бифидо- и лактобактерий в больших количествах ферментацию проводили в бутылках объемом 5,0; 10,0; 15,0 л. Стационарное культивирование посевов проводили в термостате IC-80 при температуре 37°C.

Анаэробное культивирование проводили в анаэроустате лабораторного типа путем откачки воздуха и подачи природного газа. Количество посевного материала составляло 5-10% от объема среды. Время культивирования в течение 12, 16, 18, 24, 48, 72 час.

Выращивание бифидо – и лактобактерий проводили на гидролизатно-молочной среде, для этого готовили маточную культуру:

1. Посевная культура бифидобактерий 12-16 часовая, культура выращенная на среде Блаурокка, для лактобактерий на среде МРС ,время культивирования 16-18 час при 37°C.
2. Пересев культур в колбу объемом 250 мл со 100 мл (количество посевного материала 5%). Время культивирования 16-18 час при 37°C.
3. Пересев культур в колбу объемом 1000 мл со средами в. количестве 500 мл (количество посевного материала 5%).Время культивирования 18-24 час при 37°C.

Маточную культуру в количестве 5-10%. выращенную на среде Блаурокка для бифидобактерий и на среде МРС для лактобактерий, пересевали в бутылку объемом 10,0 л с питательной средой в количестве 5.0 л. Культивировали в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 час. После культивирования бифидобактерий рН среды доводили до 7,0 при помощи 40% раствора NaOH или водного раствора аммиака.(рис.3.16)

Перед лиофилизацией в микробную смесь добавляют защитную среду (сахароза, крахмал и молоко в соотношении 1:1:0,5). Предварительное замораживание препарата проводят с учётом криогидратных температур лиофилизуемой субстанции.(рис.3.17)

Ампулы с сухим препаратом запаивают под вакуумом. Одна доза бифидо- или лактобактерина 6-7 млрд. микробных тел. Препарат содержащий в 1 дозе 4 млрд. живых клеток годен к употреблению в течение года.[44,56]

(рис.3.18;3.19)

Таким образом, основные этапы технологического процесса производства бифидо- и лактобактерий складываются из работы со штаммом, сохраняемом в лиофилизованном состоянии, накопления биомассы (с применением агарового или глубинного метода культивирования) и лиофильного высушивания препарата, расфасованного в ампулы и флаконы

Предложена технология производства комплексного препарата на основе местных штаммов *B.longum* 117х и *L.casei* 962/II для производства пробиотиков.

Для получения маточной культуры флакон с лиофилизованными палочками *B.longum* 117х и *L.casei* 962/II вскрывают стерильно и пастеровской петлёй вносят в них около 1,5-5,0 мл хлорида натрия. Полученную смесь той же пипеткой переносят стерильно в два 0,5 литровых флакона, содержащие по 40 % раствора глюкозы и лактозы. Содержимое флаконов после посевов тщательно перемешивают. Посевы выдерживают в термостате в течение 48-72 часов.

Через 24 часа инкубации для контроля чистоты культуры производят высев каждого флакона на пробирки со скошенным мясо-пептонным агаром, которые выдерживают при температуре 37⁰ С. При этом учитывают морфологические и ферментативные свойства и антогонистическую активность.

Культуру бактерий *B.longum* 117х и *L.casei* 962/II первой генерации высевают в 5л бутылки в которых находятся 3 л печёночной среды. Инкубация проводится при температуре 37⁰ С в течение 48 часов. Полученную массовую



ис.3.16. Маточная среда



Рис.3.17. Холодильная камера

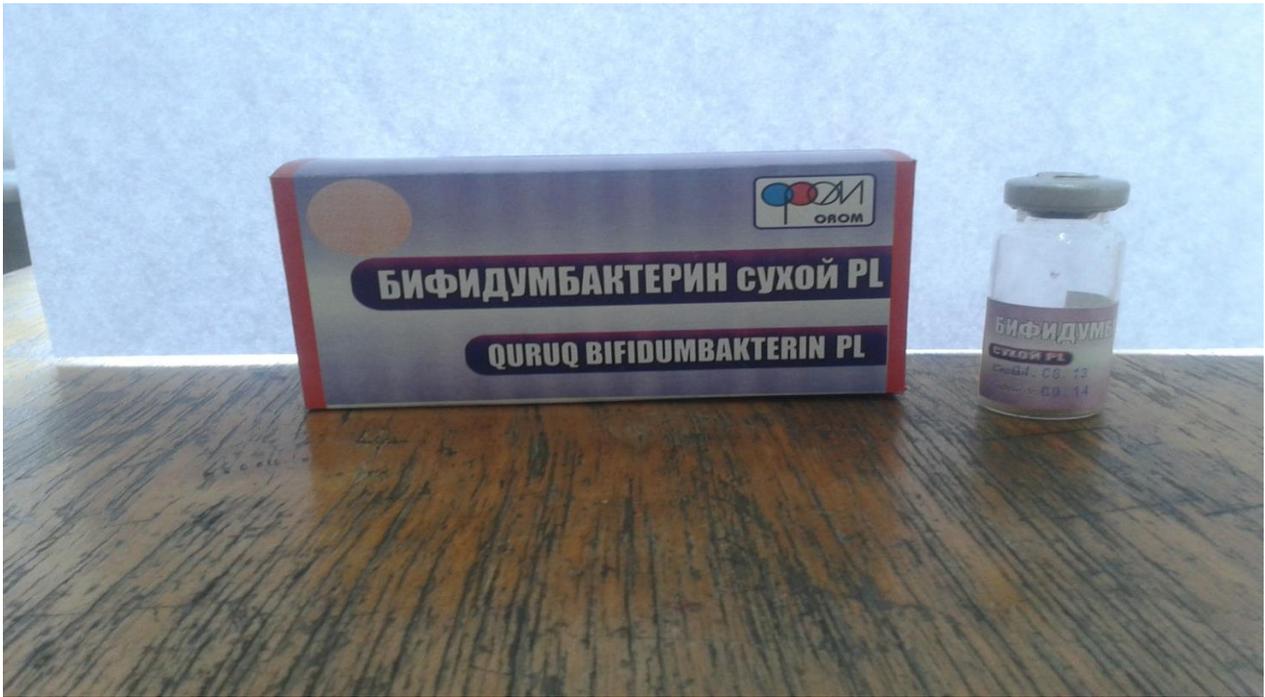


Рис.3.18. Ампулы с сухим перпаратом «Бифидумбактерин сухой»



Рис.3.19. Ампулы с сухим перпаратом «Лактобактерин сухой»

культуру 2 генерации засевают в бутылки с гидролизатно-молочной средой, солодовым экстрактом с 15% желатина и средой Блаурокка, и выращивают ассоциацию культур *V.longum* 117х и *L.casei* 962/II при температуре 37⁰С 24-48 часов, при 2-3 кратном перемешивании, Для поддержания рН на уровне 7,0 в среду вводят 5% раствор аммиака. Накопление биомассы ведут в реакторах при температуре 37⁰С, при перемешивании и аэрации. Затем добавляют защитную среду (сахаро-желатиновую) перемешивают в течение 25-30 минут и производят розлив перпарата во флаконы по 3-510 доз с соблюдением правил асептики.

Розлив микробной суспензии осуществляется путём передавливания из реактора, по стерильной силиконовой трубке, тремя бюретками, соединённые тройником. Микробную суспензию разливают в ампулы по 3-5 доз с соблюдением правил асептики.

При лиофилизации вода при пониженном атмосферном давлении испаряется из замороженного, высушиваемого материала превращаясь в пар. Заполненные ампулы закрывают при помощи пинцета рыхлым стерильным ватным тампоном, заполненные кассеты с ампулами закрывают стерильными базевыми салфетками, Далее ампулы с микробной суспензией подвергаются лиофильной сушке, после чего ампулы запаиваются и маркируются. Лиофилизацию проводят при температуре 40-45⁰С 48 часов. Доза препарата содержит не менее 200млн. палочек *V.longum* 117х и *L.casei* 962/II. (схема 3.1.)

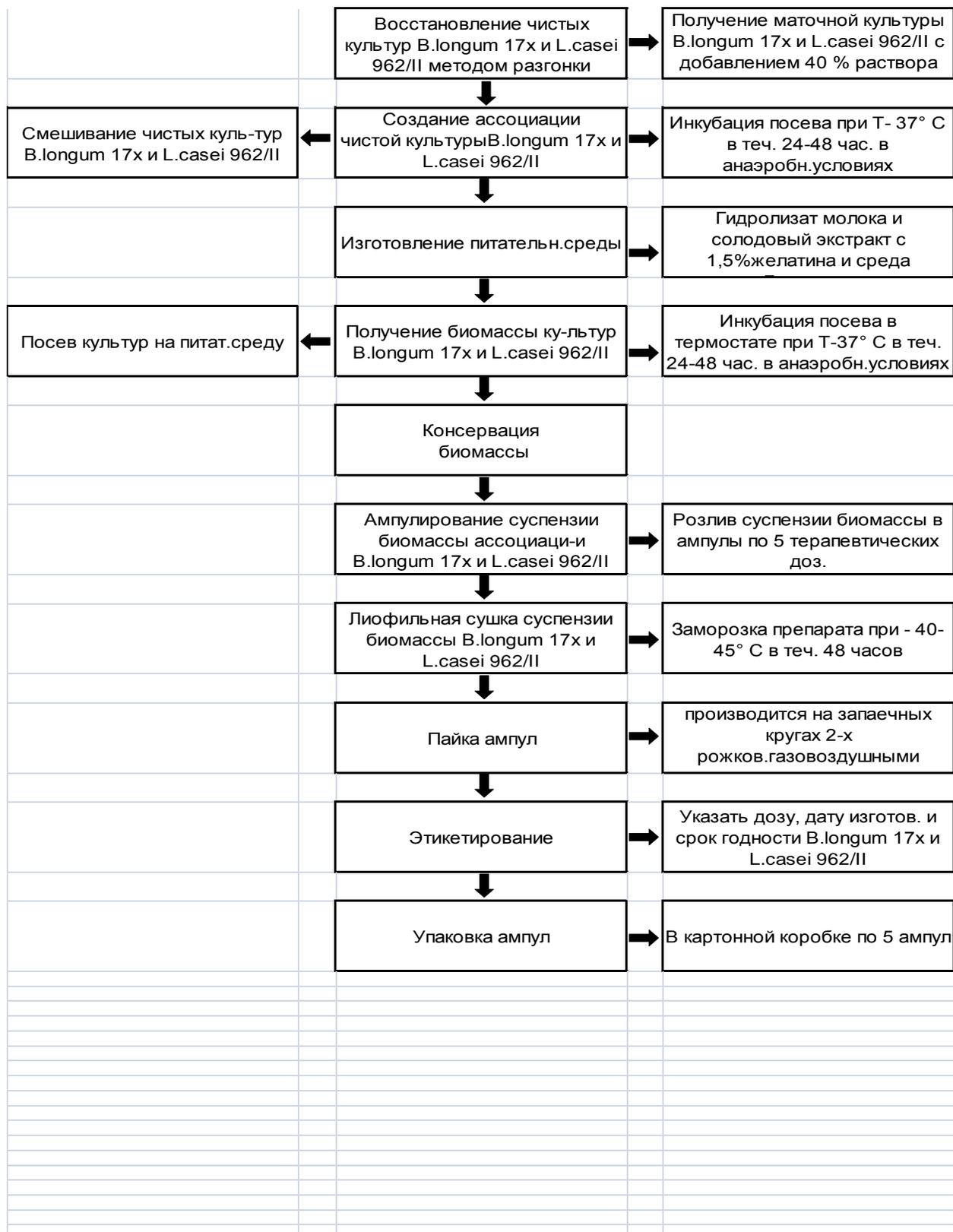
Изученная нами технология получения бактериального препарата «Бифидумбактерин сухой» и «Лактобактерин ором сухой», основные этапы которого складываются из процесса работы со штаммами, сохраняемом в лиофилизованном состоянии, накопления биомассы (с применением агарового или глубинного метода культивирования) и лиофильного высушивания.

На основе этого нами была предложена технология получения комплексного биопрепарата *V.longum* 17х и *L.casei* 962/II, которая складывае

тся из ассоциации этих культур, подготовки питательных сред, накопления биомассы в реакторе, лиофильного высушивания и расфасовки препарата в ампулы . Пробиотики полученные путём микробного синтеза, учитывая их безвредность и физиологичность для организма займут важное место для профилактики и лечения многих воспалительных и аллергических заболеваний человека.

Схема 3.1.

Технологическая схема производства комплексного биопрепарата *B.longum* 17x и *L.casei* 962/II



Вывод.

Изучены морфологические свойства и провели идентификацию местных штаммов бифидо- и лактобактерий, и их способность сбраживать углеводы, наиболее ферментативной активностью которые обладали *B.longum* 17х, *B. adolescentis*-30 и *L. casei* 962/II.

Антагонистическая активность бифидо- и лактобактерий показало, что все местные штаммы подавляют рост патогенных микроорганизмов при совместном культивировании и наибольшими антимикробными свойствами среди бифидобактерий обладали *B.longum* 17х и *B.adolescentis* 30 , среди лактобактерий *L.casei*962/II .Установлено, что по отношению к антибиотикам наименее чувствительны штаммы *B.longum* 17х и *L.casei* 962/II, которое позволяет отобрать их для совместного использования в создании комплексного мультивидового препарата.

Биотехнология производства комплексного препарата *B.longum* 117х и *L.casei* 962/II складывается из ассоциации культур *B.longum* 117х и *L.casei* 962/II, подготовка питательных сред, а накопление биомассы в реакторе, лиофильное высушивание и расфасовка препарата в ампулы или флаконы.

ВЫВОДЫ:

1. Изучение методов микробиологического синтеза биологически активных веществ, обзор основных этапов биотехнологического производства показало следующие этапы: получение ассоциации чистых культур, подготовки питательных сред, выращивание на питательных средах, накопления биомассы, ферментация, лиофильное высушивание и расфасовка препарата в ампулы.

Основные микроорганизмы, используемые для создания пробиотиков должны обладать следующими свойствами:

1. высокая антагонистическая активность в отношении патогенных микроорганизмов;
2. высокая протеолитическая активность, устойчивым к литическим и пищеварительным ферментам;
3. иммуномодулирующее действие;
4. снижение активности кишечных ферментов, повышающих риск канцерогенеза;
5. разнообразие метаболических процессов, генетическая, биохимическая вариабельность;
6. высокая приспособленность к различным условиям существования.

В клинической практике, пробиотики -являются эффективными лечебно-профилактическими средствами, их применяют для нормализации экологических систем человека. Эти препараты имеют ряд преимуществ: они физиологичны, имеют выраженную антимикробную активность в отношении патогенных и условно-патогенных бактерий, оказывают иммуностимулирующее и пртивовоспалительное действие, осуществляют коррекцию моторной функции кишечника.

2. Изучение морфологических особенностей колонии местных штаммов бифидо- и лактобактерий показало их различную морфологическую форму: короткие и прямые, разветлённые изогнутые палочки, палочки булабовидной

формы и с закруглёнными концами. Морфология колоний изменялась в зависимости от состава питательной среды.

Для штаммов бифидобактерий клетки *B.bifidum*-9С и *B.adolescentis*-30 характерны палочки ветвящиеся, а штамма *B.longum*-17Х - булавовидные формы. Колонии на полужидкой среде Блаурокка различались по морфологии: глубинные колонии в виде гвоздиков у штаммов *B.bifidum*-9С и *B.longum*-17Х; шаровидные колонии в форме кокков у штамма *B.adolescentis* 30.

У штаммов лактобактерий клетки *L.acidophilus* 180 имеют вид коротких и длинных прямых палочек, расположенных параллельно, образующих цепочки. У штамма *Lactobacillus casei* 962/II клетки представляют собой средней длины палочки, с закругленными концами, которые могут складываться в длинные цепочки. На плотной питательной среде штамм образует круглые выпуклые колонии с ровными краями, белого или кремового цвета. У штамма *Lactobacillus rhamnosus* 9сХ на плотной среде MRS образует колонии S-типа, круглые, с ровными краями.

3. Проведённые исследования показали, что наиболее ферментативной активностью обладает местный штамм бифидобактерий *B. longum*-17Х и лактобактерий *L. casei* 962/II.

Местный штамм *B. longum*-17Х ,сбраживал все 9 тестируемых углеводов - манноза, целлобиоза, рафиноза, трегалоза, арабиноза, ксилоза, салицин, маннит, сорбит. Из лактобактерий местный штамм *L. casei* 962/II сбраживал 13 тестируемых углеводов : манноза, целлобиоза, сахароза, трегалоза, ксилоза, салицин, маннит, сорбит, фруктоза, лактоза, инулин, мальтоза, галактоза.

Благодаря антагонистической активности, местные штаммы бифидо- и лактобактерий не подвергаются заражению условно патогенными и патогенными микроорганизмами.

4. Изучение антимикробных свойств местных штаммов бифидобактерий *B.bifidum*-9С, *B.adolescentis*-30, *B.longum*-17Х показало, что все местные

штаммы бифидобактерий проявляют наиболее сильные антогонистические свойства на патогенные микробы *E.coli*(C-600) и *S.typhimurium* (B-868), наиболее слабо на рост патогенных микробов *P.vulgaris* (B-1667), *P.aeruginosa* (B-1484). Изучение антогонистических свойств лактобактерий, показало, что все местные штаммы лактобактерий подавляют рост патогенных микроорганизмов *St.aureus* 003594/Wood-46, *Serratia marcescens* 367, *Proteus morgani* 399, *Ps. aeruginosa* 114. Из них наибольшей антагонистической активностью обладает местный штамм *L. casei* 962/II .

5. Изучение чувствительности местных штаммов бифидо- и лактобактерий к 12 антибактериальными препаратами: эритромицину, олеандомицину, бензилпенициллину, ампициллину, карбенициллину, линкомицину, оксациллину, тетрациклину, гентамицину, метациклину, стрептомицину, хлорамфениколу.

Установлено, что по отношению к антибиотикам наименее чувствительны штаммы *B.longum* 17x и *L.casei* 962/II, которое позволяет отобрать их для совместного использования в создании комплексного мультивидового препарата.

6. Изученная нами технология получения бактериального препарата «Бифидумбактерин сухой» и «Лактобактерин ором сухой», основные этапы которого складываются из процесса работы со штаммами, сохраняемом в лиофилизированном состоянии, накопления биомассы (с применением агарового или глубинного метода культивирования) и лиофильного высушивания.

На основе этого нами была предложена технология получения комплексного биопрепарата *B.longum* 17x и *L.casei* 962/II, которая складывается из ассоциации этих культур, подготовки питательных сред, накопления биомассы в реакторе, лиофильного высушивания и расфасовки препарата в ампулы . Пробиотики полученные путём микробного синтеза, учитывая их безвредность и физиологичность для организма займут важное место для профилактики и лечения многих воспалительных и аллергических заболеваний человека.

ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Алешкин В. А. Пробиотические микроорганизмы – современное состояние вопроса и перспективы использования. – Молочная промышленность. М – 2003. – № 1. – С. 59-61.
2. Асонов Н. Р. Микробиология. – М: Колос, 2002. – 352 с.
3. Бондаренко В. М., Грачева Н. М. Пробиотики, пребиотики и синбиотики // Фарматека. 2003, № 7, с. 56–63.
- 4 Брусилковский Л. П. Управление процессами культивирования микроорганизмов заквасок и молочнокислых продуктов. –М.: Агропромиздат, 1990. – С. 127.
5. Ганина В. И. Пробиотики. Назначение, свойства и основы биотехнологии. – М.: Изд-во МГУПБ, 2001. – С. 69.
6. Гусев М. В., Минеева Л. А. Микробиология. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1992. – С. 64. .
7. Егоров Н.С., Олескин А.В., Самуилов В.Д. Биотехнология. 1-том. Проблемы и перспективы. М.: Высшая школа-1987г., с.45-97.
8. Залашко М. В. Биотехнология переработки молочной сыворотки. – М.: Лгропромиздат, 1990. – С. 192.
9. Завгородняя Е.Ф., Зубова В.В., Кицуп Н.Е. Инструкция по отбору и контролю штаммов лактобацилл и бифидобактерий для использования в производстве бактериальных препаратов и кисломолочных продуктов лечебно-диетического питания. М.: Высшая школа- 1986г.-с.25.

10. Казарина А. В., Назарбекова Р. С., Яковенко Э. П. Роль пробиотической терапии в лечении рецидива и поддержании ремиссии язвенного колита // Кремлевская медицина. Клинический вестник. 2009, № 2, с. 54–57.
11. Калинина Т.Э. Питательные среды для культивирования бифидобактерий (биохимические подходы к конструированию) // Автореф. дисс на соиск уч. степени канд. мед. наук. Ростов-на Дону, 1995. - 23с.
12. Карпушина С.Г., Тюрин М.В. Иванов А.А., Митрохин С.Д., Лившиц В.А. Выделение, идентификация и некоторые биологические свойства бифидобактерий из кишечника человека // Биотехнология. 1998. - № 2. - С. 28-36.
13. Квасников Е.И., Нестеренко О.А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. Изд. «Наука»: М-1975 г., с. 187.
14. Красильников Н. А. Определитель бактерий и актиномицетов. – М., 1995. – 830 с.
15. Крусь А. Г. Технология молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2008. – С. 94-97.
16. Крусь Г. Н. Методы исследования молока и молочных продуктов. – М.: Колос, 2002. – 368 с.
17. Кудаярова Р. Р. Развитие кумысолечения в России // Медицинский вестник Башкортостана. – 2009. – № 5. – С. 96-99.
18. Монсензаде М., Кантере В. М., Иванова Л. А., Шихолигрова О. И. Микрофлора молока и кисломолочных продуктов и ее влияние на хранение этих продуктов. – Хранение и перераб. сельхозсырья, 1997. – № 11 – С. 41.
19. Охрименко О. В., Охрименко А. В. Исследование состава и свойств молока и молочных продуктов // Вологда, 2000. – С. 161. .

20. Перетц Л.Г. Антогонизм микробов. Большая медицинская энциклопедия. 1960г. Том 11.
21. Позмогова И.Н. Культивирование микроорганизмов в переменных условиях. М.; 1983г., 92с..
22. Под ред.Зягинцева Л.Н. Методы микробиологии и биохимии. Изд. Московского университета 1991г.,342с.
23. Соколова К.Я.,Соловьёва И.В. Дисбактериозы: теория и практика. Н.Новгород: Изд. НГТУ, 1999. 199с.
24. Степаненко П. П. Микробиология молока и молочных продуктов. – М., 2003.
– С. 89-94
25. Степанов К. М. Лабораторный практикум по биохимии молока и молочных продуктов: уч. пос. – СПб.: Реноме, 2010г. – С. 79
26. Степанов К. М. Идентификация и основные биологические свойства молочнокислых бактерий / Вестник Красноярского госагроуниверситета. – 2009. – № 9. – С. 158-162.
27. Fuller R. Probiotics in human medicine // Gut. 1991. – P. 439-442.
28. Rose S. Gastrointestinal and Hepatobiliary pathophysiology. Madison: Fence Greek Publishing LLC; 1998

Дополнительная литература:

29. . Бондаренко В. М. Молекулярно-клеточные механизмы терапевтического действия пробиотических препаратов // Фарматека. 2010. 2 (196): 26–32.

30. Степанов К. М. Лабораторный практикум по микробиологии молока и молочных продуктов: уч. пос. – СПб.: Реноме, 2010. – С. 108.
31. Фумиаки А.Б. Критерии выбора пробиотика. – Молочная промышленность, 2010. – № 5. – С. 2-99.
32. Шевелева С. А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса // Вопросы питания, 1999. – № 2. – С. 32-39.
33. . Пяткин К.Д., Кривошеин Ю.С. Учебник по микробиологии. М.; «Медицина» 1980г -С.35
34. Alvarez-Olmos M. I., Oberhelman R. A. Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy // Clin Infect Dis. 2001; 32: 1567–1576.
35. Arumugam M., Raes J., Pelletier E. et al. Enterotypes of the human gut microbiome // Nature. 2011; 473: 174–180. Berg R. D. Probiotics, probioticsandconbiotics // TrendsMicrobiol. 1998. – P. 89-92.
36. Breuer B., Radler F. Inducible resistance against nisin in *Lactobacillus casei* // Arch. Microbiol. 1996. – P. 114-118. .
- 37 Duffy B.K., Defago G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophorebiosynthesis. Applied and Environmental Microbiology.,1999., 60,732-738.
38. Donohoe D. R., Garge N., Zhang X. et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon // Cell Metab. 2011; 13: 517–526.
39. Fuller R., Gibson G. R. Modification of the intestinal microflora using probiotics and prebiotics // Scand J. Gastroenterol. 1997, vol. 32, suppl. 222, p. 28–31.

- 40 Heller K. J. Probiotic bacteria in fermented food: product characteristics and starter organism // *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. – P. 374-379. Ishibashi N., Yamazaki S. Probiotics and safety // *Am. J. Clin. Nutr.* 2001. – P. 465-470.
41. . Geuking M. B., Cahenzli J., Lawson M. A. et al. Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses // *Immunity.* 2011; 34: 794–806.
42. Gibson G. R., Roberfroid M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics // *J Nutr.* 1995; 125: 1401–1412.
43. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organisation) Working Group. London, Ontario, Canada: 2002.
44. Klaenhammer T. R, Kullen M. J. Selection and design of probiotics // *Int. J. Food Microbiology.* 1999. – P. 45-57.
45. Ogay D.K., L.Panova, R.Fimushkina, L.Charuhina, Internationl Scientific Conference Probiotics and Prebiotics, Kosicl, Slovakia, 2010, 48.
46. Simon L. G., Gorbach L. S. Intestinal flora in health and disease // *Gastroenterology.* 1984. 86: 174–194.
47. Rambaud J. C., Buts J. P., Corthier G., Flourie B. Gut microflora. Digestive physiology and pathologie. Paris: John LibbeyEurotext; 2006.
48. Round J. L., Lee S. M., Li J. et al. The toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota // *Science.* 2011; 332: 974–977.
49. Szajewska H, Ruszczyński M, Radzikowski A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2006;149:367–72.

50. Takahashi N., Kitazawa H., Shimosato T. et al. An immunostimulatory DNA sequence from a probiotic strain of *Bifidobacterium longum* inhibits IgE production in vitro // FEMS Immunol Med Microbiol. 2006, 46 (3): 461–469.
51. Tong JL, Ran ZH, Shen J, Zhang CX, Xiao SD. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during *Helicobacter pylori* eradication therapy. Aliment Pharmacol Ther 2007;25:155–68.

Источники интернета:

52. <http://www.dannonprobioticscenter.com/index.asp>
53. <http://www.isapp.net>
54. <http://www.usprobiotics.org>
55. http://www.fao.org/ag/agn/agns/micro_probiotics_en.asp
56. <http://www.FindPatent.RU>
57. <http://ru.wikipedia.org/>
58. <http://normoflorin.ru/>
59. <http://milkco.ru/>
60. <http://mybestworld.ru/>
61. <http://naturecoproducts.ru/>
62. <http://www.mikrobiki.ru/>