

УДК 579.017.8

UDC 579.017.8

03.00.00 Биологические науки

Biology

**ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ  
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И ПОДБОР  
ОПТИМАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ  
ДЛЯ *LACTOBACILLUS SP.***

**STUDYING THE FEATURES OF  
CULTIVATION AND OPTIMIZATION OF  
COMPOSITION CULTURE MEDIA FOR  
*LACTOBACILLUS SP.***

Анискина Мария Владимировна  
Аспирант  
РИНЦ SPIN-код 1255-4837

Aniskina Mariya Vladimirovna  
Postgraduate student  
RSCI SPIN-code 1255-4837

Волобуева Елена Сергеевна  
Аспирант  
РИНЦ SPIN-код 7617-5411

Volobueva Elena Sergeevna  
Postgraduate student  
RSCI SPIN-code 7617-5411

Петенко Александр Иванович  
д.с.-х.н., профессор  
РИНЦ SPIN-код 7870-5435

Petenko Alexander Ivanovich  
Dr.Sci.Agr., professor  
RSCI SPIN-code 7870-5435

Волкова Светлана Андреевна  
канд. Биол. Наук, доцент  
РИНЦ SPIN-код 4482-3199  
*Кубанский государственный аграрный  
университет, Краснодар, Россия*

Volkova Svetlana Andreevna  
Cand. Biol. Sci., assistant professor  
RSCI SPIN-code 4482-3199  
*Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia*

Представлены материалы по изучению особенностей культивирования *Lactobacillus sp.* на различных средах. Проведено сравнение стандартных сред для культивирования *Lactobacillus sp.* и выявлена наиболее оптимальная среда

The article presents the materials of the study of the features of cultivation of *Lactobacillus sp.* on different culture medium. We have made a comparison of standard culture medium for cultivation *Lactobacillus sp.* and determined the most optimal culture medium

Ключевые слова: *LACTOBACILLUS SP.*, ПРОБИОТИК, ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ТОМАТНЫЙ СОК

Keywords: *LACTOBACILLUS SP.*, PROBIOTIC, CULTURE MEDIUM, CULTIVATION, TOMATO JUICE

Популярность антибиотиков и их бесконтрольное применение привело к появлению большого количества мутагенных форм микроорганизмов с неблагоприятными функциями и высокой лекарственной устойчивостью [2].

Вследствие этого появилась проблема поиска новых препаратов для поддержания здоровья людей и животных. Возникла необходимость в препаратах, не вызывающих лекарственной устойчивости, обладающих выраженным антимикробным действием в том числе и в отношении к резистентным к антибиотикам штаммам микроорганизмов. Принципиальное решение проблемы известно давно. Оно заключается в

создании пробиотиков – препаратов на основе микроорганизмов, которые оказывают антагонистический эффект на патогенную микрофлору [1].

Впервые термин «пробиотики» (от греческого *pro bios* – для жизни) был употреблен в области животноводства, им обозначались микробиологические препараты, которые состояли из живых микроорганизмов и перорально применялись для воздействия на животных. В первую очередь в состав пробиотических продуктов входили именно лактобактерии (например, *L. acidophilus*, *L. casei*), а также бифидобактерии (*B. bifidum*, *B. longum*), которые считаются высокоэффективными пробиотическими микроорганизмами и являются составной частью нормальной микрофлоры кишечника.

Основным свойством молочнокислых бактерий, по которому их объединяют в отдельную обширную группу микроорганизмов, является способность образовывать в качестве главного продукта брожения молочную кислоту. Молочнокислые бактерии неподвижны, не образуют спор, положительно окрашиваются по Граму, не восстанавливают нитраты в нитриты. По форме клеток молочнокислые бактерии — палочки и кокки. Размеры их варьируют у отдельных видов [3].

Молочнокислые бактерии – это факультативные анаэробы. Также это – единственная группа микроорганизмов, которые лишены каталазы, но способны расти при этом в присутствии кислорода воздуха. Функцию каталазы выполняет фермент пероксидаза. Молочнокислые микроорганизмы получают энергию только в процессе молочнокислого брожения, поскольку у них отсутствуют гемсодержащие ферменты. Молочнокислое брожение подразделяется на гомоферментативное и гетероферментативное. При гомоферментативном брожении основным метаболитом является молочная кислота; при гетероферментативном брожении кроме молочной кислоты образуются также диоксид углерода, этанол и уксусная кислота.

Температурный диапазон жизнедеятельности лактобактерий довольно широк: мезофильные виды растут при оптимальной температуре 25-32°C; минимальной температурой для них является 10°C. Для термофильных видов оптимальная температура роста колеблется в пределах 38-45°C, а минимальная – 20-22°C. Имеются сведения, что некоторые молочнокислые бактерии способны расти при температуре 3-5°C [4].

Молочнокислые бактерии относятся к наиболее сложным организмам, с точки зрения потребности в питательных веществах. Для своей жизнедеятельности они требуют наличия субстратов, являющихся источником энергии и веществ, необходимых им для построения бактериальной клетки (нуклеиновых кислот, полисахаридов, аминсахаров и т.п.) [4].

Наиболее важным источником энергии для молочнокислых бактерий являются моно- и дисахариды – глюкоза, лактоза, сахароза, мальтоза. Для нормального роста и развития молочнокислых бактерий, как правило, необходимы субстраты со сложными органическими формами азота – подобранными смесями аминокислот, ферментативными или кислотными гидролизатами белков – мяса, казеина, различных сортов муки.

Независимо от вида и штамма молочнокислых бактерий, большинству из них также необходимы аргинин, цистеин, глутаминовая кислота, лейцин, фенилаланин, триптофан, тирозин, валин.

Большинство видов молочнокислых бактерий (особенно палочковидных) остро нуждаются для своего развития в витаминах, чем и объясняется в значительной мере влияние на их рост добавок к средам различных растительных экстрактов (картофеля, моркови, кукурузы и т. д.), дрожжевого автолизата и других соединений.

Для обеспечения роста и развития молочнокислые бактерии нуждаются в ряде неорганических соединений – меди, железе, натрии, калии, фосфоре, йоде, сере, магнии и, особенно, марганце [3].

Таким образом для культивирования молочнокислых микроорганизмов применяют следующие среды:

Обезжиренное молоко, которое получают сепарированием цельного молока или растворением сухого обезжиренного молока в теплой воде (100 г на 1 л).

Гидролизованное молоко. Обезжиренное молоко разводят водопроводной водой (1 часть молока и 2 части воды), затем к 1 л разведенного молока, подогретого до 45°C, добавляют 1 г сухого порошка панкреатина или 5 г поджелудочной железы, измельченной на мясорубке. Через несколько минут после внесения панкреатина к разведенному молоку добавляют 5 мл хлороформа.

Агар с мелом. Среду используют для выявления молочнокислых бактерий. К питательному агару добавляют мел, в количестве 2-3%, затем среду стерилизуют.

Среда Сабуро. Основой этой среды является дрожжевая вода. На 1 л водопроводной воды берут 20 г сухих дрожжей, кипятят 15 мин, фильтруют через бумажный фильтр, разливают во флаконы и стерилизуют. К 100 мл стерильной дрожжевой воды добавляют 1% пептона, 4% глюкозы, 2% агара и стерилизуют.

Среда МРС. Представляет собой среду желтого вида, в плотном или жидком состоянии. Среды классифицируются по содержанию агара (от 0,075% до 10%). Используется для выделения ацидофильных и молочнокислых бактерий.

Молочный агар. Используется для определения протеолитической способности микробов. В пробирку с расплавленным стерильным

питательным агаром добавляют 1 – 2 мл стерильного обезжиренного молока, смешивают и разливают в чашки Петри.

Среда Эллингера. Используется для общего культивирования стрептококков и лактобацилл. Может быть как плотной, так и жидкой.

Trupticase yeast extract glucose medium. Многокомпонентная среда, в которую входят неорганические соединения, дрожжевой экстракт и гидролизат казеина.

Tomato juice agar. Жидкая среда для культивирования молочнокислых микроорганизмов. В состав входит томатный сок, дрожжевой экстракт и гидролизат казеина.

Исходя из вышесказанного следует, что изучение особенностей культивирования *Lactobacillus sp.* в качестве основы для создания пробиотических продуктов является актуальным.

**Материал и методика.** Исследования проводились на кафедре биотехнологии, биохимии и биофизики, факультета перерабатывающих технологий Кубанского Государственного Аграрного Университета.

В качестве объекта исследования выбран концентрат бактериальный лиофилизированный для ферментированных молочных продуктов Пх(л), предоставленный ФГУП «Экспериментальная биофабрика Россельхозакадемии», расположенная по адресу: Россия, город Углич, ул. Старостина, 18. Штамм хранился в музее чистых культур кафедры биотехнологии, биофизики и биохимии.

В таблице 1 представлена характеристика бактериального концентрата Пх(л).

Таблица 1 – Органолептические показатели сухого бактериального концентрата

Показатель	Характеристика
Цвет	Серый, равномерный по всей массе.
Консистенция	Порошкообразная.
Запах	Чистый, кисломолочный.
Сгусток	Плотный, без отслоения жидкости
Массовая доля влаги, %	4
Количество молочнокислых бактерий в 1 г.	$10^7$ - $10^9$
Количество посторонних микроорганизмов в 1 г	1-2
Бактерии группы кишечной палочки в 1 г	Отсутствуют

Титр определяли методом последовательных десятикратных разведений в физрастворе методом Коха и последующим посевом с инкубацией при оптимальных условиях. После проводился подсчет выросших колоний на Чашках Петри согласно ГОСТ 9225-84 (пункт 4.5.3).

Определение БГКП проводилось согласно методу определения бактерий группы кишечных палочек (ГОСТ 9225-84 (пункт 4.6.)).

Идентификация культивируемых микроорганизмов проводилась методом окраски по Граму, согласно ГОСТ 18963-73 (пункт 3.3.14.)

Общее количество микроорганизмов, которые содержатся в 1 см<sup>3</sup> среды, определялось по формуле:

$$X = n \times 10^m \quad (1)$$

где n-количество колоний, визуальнo подсчитанных на чашке Петри  
m-число десятикратных разведений.

**Обсуждение результатов.** Для получения маточной (засевной) культуры *Lactobacillus sp.* сухой бактериальный концентрат Пх(л) вносился в свежее пастеризованное молоко с помощью прокаленной бактериальной петли. Культуру выращивали в термостате 24 часа при

температуре 30°C для проверки выживаемости микроорганизмов с помощью образования сгустка.

В стерильных условиях был сделан пересев в следующие среды: Trypticase yeast extract glucose medium, Tomato juice agar и среду Эллингера, в количестве 2,5 мл закваски на 50 мл среды. Все среды стандартные и используются для культивирования молочнокислых микроорганизмов. Колбы с питательной средой и закваской ставились в термостат при 30 °С на 24 часа. Для подсчета количества колоний после инкубации использовали среду *Lactobacillus* Hetrofern Screen Agar, с температурой 40 °С, которой заливались разведения, приготовленные по методу Коха. Для посева использовались следующие разведения:  $10^{-4}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-10}$ . Культивирование микроорганизмов осуществлялось при 30°C. Эксперимент проводился в 4-х кратной повторности. На рисунке 2 представлен вид колоний молочнокислых микроорганизмов на чашках Петри.

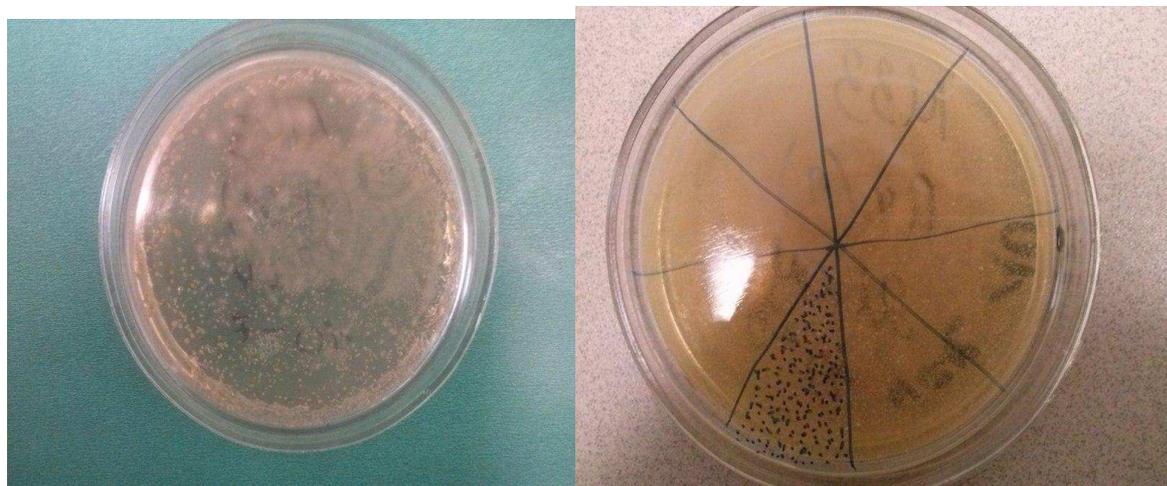


Рисунок 1 – Чашки Петри с выросшими колониями.

В таблице 2 представлены численные результаты эксперимента.

Таблица 2 – Количество колоний на плотной среде.

Название среды	Разведение	Количество колоний	Результаты
Tomato Juice Agar	$10^{-3}$	257	$8,5 \times 10^8$
	$10^{-7}$	124	
	$10^{-10}$	85	
Trypticase yeast extract glucose medium	$10^{-3}$	195	$6,5 \times 10^8$
	$10^{-7}$	69	
	$10^{-10}$	46	
среда Эллингера	$10^{-3}$	237	$7,9 \times 10^8$
	$10^{-7}$	125	
	$10^{-10}$	63	

На рисунке 2 представлен график роста колоний молочнокислых микроорганизмов на плотных средах.

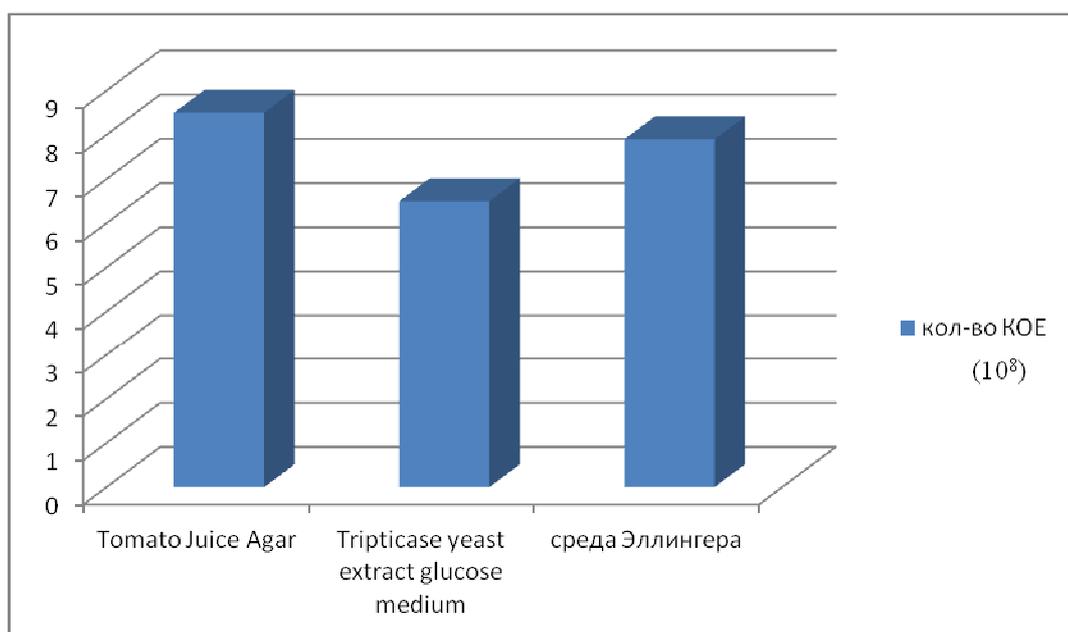


Рисунок 2 – График роста колоний на плотных средах.

Из рисунка следует, что Tomato Juice Agar имеет более высокий титр ( $8,5 \times 10^8$ ), по-сравнению с Trypticase yeast extract glucose medium ( $6,5 \times 10^8$ ) и средой Эллингера ( $7,9 \times 10^8$ ).

Анализ на присутствие бактерий группы кишечных палочек проводился высевом 0,5 мл закваски в пробирку с поплавком, в которой уже находилась среда. Эксперимент проводился в двух повторностях. В

первой повторности образец засеивался в предварительно простерилизованную среду Кода, а во второй повторности образец засеивался в среду Кесслера. Обе эти среды используются для идентификации БГКП и являются стандартными средами. Пробирки с высеянными образцами ставились в термостат при температуре 37 °С на 18 часов. На рисунке 3 представлены пробирки со средой Кода (фиолетовая среда) и средой Кесслера (желтая среда).



Рисунок 3 – Пробирки со средой Кода и средой Кесслера

По истечению срока анализировалось изменение среды и возможное образование пузырька углекислого газа, которое привело бы к всплытию поплавок. Поскольку ни в первой, ни во второй повторности не наблюдалось помутнение среды и образования пузырька углекислого газа, то был сделан вывод об отсутствии в закваске БГКП.

Анализ на контроль чистоты культуры проводился окраской по Граму и микроскопированием. Результаты микроскопирования представлены на рисунке 4.



Рисунок 4 – микроскопическая картина *Lactobacillus sp.*.

Микроскопирование посторонних морфологических форм не выявило, что позволило судить о чистоте закваски.

Вывод. Наилучшей стандартной средой для культивирования *Lactobacillus sp.* является Tomato Juice Agar, поскольку на этой среде было отмечено максимальное количество выросших колоний. Было сделано предположение о стимулирующем влиянии томатного сока, как компонента питательной среды, вследствие большого количества содержащихся в нем микроэлементов и питательных веществ.

#### Литература

1. Бондаренко В. М. Дисбиозы и препараты с пробиотической функцией / В.М. Бондаренко, А.А. Воробьев // Микробиология. – 2004. – № 1. –С. 84-92.
2. Егоров Н. С. Что такое антибиотики / Н.С. Егоров - Основы учения об антибиотиках. – М.:МГУ – 2004. – с. 528
3. Квасников В. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования. / В.И. Квасников, О.А. Нестеренко - М.: «Наука», 1975. - С. 57.
4. Красникова Л.В. Микробиология молока и молочных продуктов: Лабораторный практикум: Учеб.-метод. пособие./Л.В. Красникова. П.И. Гунькова, В.В. Маркелова - СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 130 с.

#### References

1. Bondarenko V. M. Disbiozi i preparati s probioticheskoj funkciej / V.M. Bondarenko, A.A. Vorobev. // Mikrobiologiya. – 2004. – № 1. –S. 84-92.
2. Egorov N. S. Chto takoe antibiotiki / N.S. Egorov - Osnovi ucheniya ob antibiotikah. – М.: MGU – 2004. – S. 4.
3. Kvasnikov V. I. Molochnokislje bakterii i puti ih ispolzovaniya. / V.I. Kvasnikov, O.A. Nesterenko -M.:«Nauka»-1975.-S. 57.

4. Krasnikova L.V. Mikrobiologiya moloka i molochnih produktov: Laboratornii praktikum - Ucheb. metod. posobie./L.V. Krasnikova., P.I. Gunkova, V.V. Markelova - NIU ITMO; ИИВТ - 2013. – 130 s.