



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **42906** (13) **U**
(51) МПК (2009)
C12N 1/20
A61K 35/66
A23C 9/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ АНАЕРОБНИХ БАКТЕРІЙ

1

(21) u200901929
(22) 04.03.2009
(24) 27.07.2009
(46) 27.07.2009, Бюл.№ 14, 2009 р.
(72) ШИРОБОКОВ ВОЛОДИМИР ПАВЛОВИЧ, ЯН-
КОВСЬКИЙ ДМИТРО СТАНІСЛАВОВИЧ, ДИМЕНТ
ГАЛИНА СЕМЕНІВНА
(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДА-
ЛЬНІСТЮ ФІРМА "О.Д. ПРОЛІСОК"

2

(57) Спосіб культивування анаеробних бактерій, що передбачає створення анаеробних умов росту за рахунок звільнення поживного середовища від вільного кисню повітря, який **відрізняється** тим, що як поглинач кисню використовують гель дрібнодисперсного бентоніту, що вводять в середовище культивування у вигляді 5-6 %-ї водної суспензії, при цьому співвідношення поживного середовища й гелю бентоніту становить 1:1-2:1.

Корисна модель відноситься до мікробіології й може бути використана для виділення й культивування облигатних анаеробних бактерій, зокрема при встановленні етіологічного фактору інфекційних захворювань або ускладнень, визначенні ступеня порушень складу мікробіоценозу, особливо товстої кишки, а також при використанні анаеробних штамів як продуцентів біологічно активних сполук, при одержанні пробіотиків та ін.

Робота з облигатними анаеробними бактеріями пов'язана зі значними складнощами, обумовленими високою чутливістю даної групи мікроорганізмів до кисню повітря. У медичній практиці це в багатьох випадках ускладнює виділення збудника із клінічного матеріалу й оцінку його біологічних властивостей з метою призначення адекватної етіотропної терапії. При мікробіологічних дослідженнях фекалій на дисбіоз (дисбактеріоз) кишечнику значна кількість анаеробів не враховується через складність виділення й культивування їхніх чистих культур *in vitro*. Разом з тим, як відомо, анаеробні бактерії є домінантним компонентом кишкового біоценозу й відіграють провідну роль у його функціонуванні, а порушення складу анаеробного компонента біоценозу є ключовим чинником розвитку глибоких дисбіотичних розладів, що важко піддаються корекції. Тому адекватна оцінка стану анаеробного компонента біоценозу найбільшою мірою сприяє призначенню раціональної пробіотичної терапії.

У біотехнології відсутність ефективних способів культивування анаеробних бактерій ускладнює виробничі процеси й негативно позначається на

якості кінцевого продукту. Особливе значення способи культивування анаеробних бактерій здобувають при розробці й виробництві препаратів пробіотичної дії, основою яких у більшості випадків є фізіологічно цінні штами облигатних представників нормального кишкового біоценозу, переважно біфідобактерії, пропіоновокислі бактерії й молочнокислі бактерії, серед яких багато облигатних анаеробів. Інгібування цих мікроорганізмів киснем повітря вимагає створення дорогих схем культивування й нарощування біомаси клітин, що ускладнює виробництво й підвищує собівартість продукції.

Відомо спосіб культивування анаеробів, зокрема грамнегативних неспороутворюючих облигатних анаеробних бактерій родів *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, при проведенні мікробіологічних досліджень фекалій і вагінального секрету, що передбачає внесення відібраних для аналізу зразків у пробірки з добре притертими пробками й заповнені сумішшю газів, що витісняють кисень: CO₂ (40%) + пропан (60%) або CO₂ (5%) + H₂ (10%) + N₂ (85%), проведення досліджень в анаеробному боксі, заповненому азотом, з наступним культивуванням зразків у мікроанаеростаті, у який поміщають паладієвий каталізатор для поглинання залишкового кисню, видаляють повітря за допомогою вакуумного насоса, після чого заповнюють азотом, знову видаляють газ, заповнюють мікроанаеростат газовою сумішшю: CO₂ (5%) + H₂ (10%) + N₂ (85%) й поміщають у термостат. Після інкубації чашки Петрі з посівами виймають із мікроанаеростату й поміщають у кон-

(19) **UA** (11) **42906** (13) **U**

тейнери системи Gas Pak. У контейнери постійно подають азот зі швидкістю 1,5-2,0 л у хвилину. При обліку результатів аналізу чашки із судини виймають по одній, швидко повертаючи їх в анаеробні умови (Ефимов Б.А., Кафарская Л.И., Коршунов В.М. Современные методы оценки качественных и количественных показателей микрофлоры кишечника и влагалища // Ж. микробиол., эпидемиол., иммунол. - 2002. - №4. - с. 72-78).

Спосіб дозволяє визначати вміст облигатних анаеробів у досліджуваному матеріалі, однак є дорогим, відрізняється високою трудомісткістю, складністю реалізації й недоступністю для використання в більшості мікробіологічних лабораторій.

Відомий також спосіб культивування облигатних анаеробів, наприклад бактероїдів, біфідобактерій і молочнокислих бактерій, що передбачає анаеробне вирощування культури під годинниковими скельцями з використанням як поглинача кисню культури бактерій виду *Serratia marcescens*, яку засівають на поверхню щільного поживного середовища, що розлите у годинникові скельця й попередньо підрощують у термостаті протягом 4-х годин. Цими скельцями закривають ділянки агаризованого поживного середовища з краплями посівного матеріалу, скельця злегка вдавлюють у середовище, а їхні краї обмазують культурою *Serratia marcescens* (Грачева Н.М., Гончарова Г.И. Применение бактериальных биологических препаратов в практике лечения больных кишечными инфекциями, диагностике, лечения дисбактериозов кишечника // Методические рекомендации. - М., 1986. - 23 с).

За рахунок високої кисеньпоглинаючої здатності бактерій виду *Serratia marcescens* створюються сприятливі умови для росту облигатних анаеробів, однак ці мікроорганізми є потенційно патогенними для людини, що значно обмежує галузі застосування методу. Крім того, вирощування анаеробів під годинниковими скельцями абсолютно не прийнятно для реалізації біотехнологічних процесів у промислових масштабах.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб вирощування біфідобактерій, який передбачає спільне культивування в молоці біфідобактерій і оцтовокислих бактерій видів *Acetobacter acetii* і *Acetobacter pasteurianus*, що стимулюють ріст біфідобактерій та інших сахаролітичних анаеробів (Авт. свід. СРСР №1604847, С12N1/20, А23С9/12, 1990 - прототип).

Спосіб передбачає використання як поглинача кисню й біологічного стимулятора анаеробів роду *Bifidobacterium* безпечних для здоров'я людини аеробних мікроорганізмів і дозволяє ефективно культивувати сахаролітичні анаероби, однак затрудняє виділення чистих культур анаеробних бактерій, оскільки оцтовокислі бактерії утворюють із сахаролітичними анаеробами міцні симбіози, які важко розділяються на монокультури. Крім того, спосіб не дозволяє вирощувати асахаролітичні анаеробні бактерії, які в багатьох випадках також мають велику клінічну й біотехнологічну значимість.

Завданням корисної моделі є створення уніфікованого й безпечного способу культивування

анаеробних бактерій, у якому шляхом використання як поглинача кисню гелю дрібнодисперсного бентоніту забезпечується підвищення ефективності культивування широкого спектра мікроорганізмів, чутливих до кисню.

Поставлене завдання вирішується тим, що в способі культивування анаеробних бактерій, що передбачає створення анаеробних умов за рахунок звільнення поживного середовища від вільного кисню повітря, як поглинача кисню використовують гель дрібнодисперсного бентоніту, що вводиться в середовище культивування у вигляді 5-6%-ої водної суспензії, при цьому співвідношення поживного середовища й гелю дрібнодисперсного бентоніту становить 1:1-2:1.

Пропонований спосіб передбачає використання як поглинача кисню при культивуванні облигатних анаеробних бактерій гелю бентоніту. Бентоніт - це природний глинистий матеріал, що відноситься до класу алюмосилікатів і має високі гідратаційні й адсорбційні властивості. Використовуваний у пропонованому способі як сорбент гель бентоніту являє собою натрієву форму дрібнодисперсної фракції бентоніту, що одержують із сухого природного бентоніту шляхом обробки його вуглекислим натрієм і очищення від забруднюючих речовин і грубих часток бентоніту. Бентоніт є абсолютно безпечним для здоров'я людини матеріалом. Він відноситься до природних глин і йому властиві всі позитивні ефекти, об'єднані в поняття «глинотерапія». Як показали спеціально проведені дослідження, дрібнодисперсний гель бентоніту має високу кисеньзв'язуючу здатність, внаслідок чого створює оптимальні умови для активного розвитку всіх видів облигатно анаеробних бактерій без використання аеробних мікроорганізмів, анаеростатів і іншого дорогого устаткування. Крім високої кисеньпоглинаючої здатності, гель бентоніту є цінним джерелом макро- і мікроелементів, за рахунок чого додатково стимулює ріст анаеробних бактерій.

При культивуванні анаеробних бактерій гель бентоніту вводиться в поживне середовище у вигляді 5-6%-ої водної суспензії. Зниження концентрації бентоніту в суспензії менш 5% знижує ефективність способу через недостатню адсорбцію кисню й зменшення стимулюючої активності бентоніту відносно облигатних анаеробних бактерій. Підвищення концентрації бентоніту в суспензії вище 6% недоцільно, оскільки не впливає на адсорбційні властивості гелю щодо кисню.

При здійсненні способу співвідношення поживного середовища й 5-6%-го гелю бентоніту становить 1:1-2:1. Як показали результати досліджень, дане співвідношення є найбільш оптимальним. При зміні співвідношення у бік зменшення частки гелю бентоніту середовище не повністю звільняється від кисню, що негативно позначається на розвитку й збереженні життєдіяльності культур облигатних анаеробів. Крім того, зменшується стимулюючий ефект бентоніту відносно анаеробів за рахунок зниження в середовищі культивування рістстимулюючих мінеральних компонентів. Зміна співвідношення у бік збільшення частки гелю бентоніту не відбивається на адсорбції кисню, але може зменшувати пожив-

ну цінність середовища за рахунок її зайвого розведення й сорбції окремих живильних сполук, що може негативно позначитися на розвитку культур анаеробних бактерій, тому є недоцільним.

Різні варіанти реалізації способу наведені в прикладах.

Приклад 1. Спосіб культивування анаеробних бактерій при мікробіологічних дослідженнях фекалій і вагінального секрету.

Випорожнення забирають із останньої порції фекалій стерильним шпателем і поміщають у пробірку (попередньо зважену), що містить рівний об'єм стерильного 6%-го гелю дрібнодисперсного бентоніту. Вагінальний матеріал збирають у транспортні пробірки (попередньо зважені), що містять рівний об'єм стерильного 6%-го гелю дрібнодисперсного бентоніту. У бактеріологічній лабораторії проводять повторне зважування пробірок, визначаючи таким чином вагу забраного матеріалу й потім з матеріалу готують серійні розведення з використанням як розчину 5%-го стерильного гелю дрібнодисперсного бентоніту. Фекальний матеріал, поміщений при доборі в 6%-й гель дрібнодисперсного бентоніту, попередньо гомогенізують у порцеляновій ступці, а потім готують серійні розведення з використанням в якості розчину 5%-го стерильного гелю дрібнодисперсного бентоніту. Отримані розведення висівають у селективні поживні середовища, які традиційно використовуються для визначення окремих видів анаеробних бактерій. Але при готуванні кожного із селективних середовищ перед стерилізацією середовище змішують у співвідношенні 1:1 з 6%-м гелем бентоніту. Використання пропонованого способу дозволяє здійснювати всі операції з виділення й культивування облигатних анаеробних бактерій без використання мікроанаеростатів і спеціальних анаеробних боксів, заповнюваних інертним газом. Це дозволяє полегшити роботу з анаеробами, знизити трудомісткість і тривалість процесів і виключити необхідність використання спеціального дорогого устаткування й додаткових матеріалів. Порівняльні результати досліджень фекалій на вміст окремих представників облигатних анаеробних бактерій, проведених пропонованим і відомим способами, представлені в таблиці 1.

Приклад 2. Використання пропонованого способу для діагностики інфекцій, що спричиняються неспороутворюючими анаеробами.

Неспороутворюючі анаероби включають близько 800 видів мікроорганізмів різних родів і сімейств, характерними ознаками яких є відсутність спор, висока чутливість до кисню повітря й складні поживні потреби. Багато представників неспороутворюючих анаеробів (роди *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Veillonella* і ін.) є умовно-патогенними й при створенні сприятливих умов для їхньої життєдіяльності можуть спричиняти широкий спектр важких патологічних процесів в організмі людини, успішне лікування яких вимагає етіологічного розшифрування збудника й виділення його в чистій культурі з метою призначення адекватної етіотропної терапії.

Взяті для дослідження зразки (шматочки ура-

жених тканин; матеріал, узятий із глибини рани; кров; пунктати з абсцесів, флегмон, порожнини суглобів та ін.) повинні бути захищені від токсичної дії молекулярного кисню. Тому відібрані зразки патологічного матеріалу негайно поміщають у глибину стерильного 5,5%-го гелю дрібнодисперсного бентоніту, а потім транспортують у спеціалізовану лабораторію. У поживні середовища, що використовуються для виділення і ідентифікації мікроорганізмів, також додають стерильний 5,5%-ний гель дрібнодисперсного бентоніту в співвідношенні 1:1. Це дозволяє не тільки створити оптимальні умови для росту облигатних анаеробів, але й виключити розвиток аеробних і факультативно-анаеробних супутніх мікроорганізмів, що ускладнюють виділення й ідентифікацію анаеробного збудника. Використання пропонованого способу дозволяє значно спростити схему виділення й ідентифікації збудників анаеробних інфекцій і знизити вартість діагностичного методу.

Приклад 3. Використання пропонованого способу для нарощування біомаси біфідобактерій при виготовленні препарату із пробіотичними властивостями.

Як відомо нарощування біомаси чистих культур біфідобактерій є досить складним процесом, обумовленим інгібуванням цих мікроорганізмів молекулярним киснем. Тому поживні середовища збагачуються додатковими сполуками, що сприяють зниженню окислювально-відновного потенціалу, а в технологічний процес вводяться додаткові операції, що сприяють витисненню повітря з ферментерів. Додатковою проблемою, що обумовлена повільним розвитком монокультур біфідобактерій, є високий ризик контамінації середовища сторонніми аеробними й факультативно-анаеробними мікроорганізмами. Відповідно до пропонованого способу поживне середовище перед стерилізацією розводять в співвідношенні 1:1 5%-м гелем дрібнодисперсного бентоніту. Це виключає використання додаткових сполук і операцій, що забезпечують зниження вмісту кисню в середовищі й відповідно окислювально-відновного потенціалу. Зв'язування залишкового кисню гелем бентоніту перешкоджає розвитку сторонніх мікроорганізмів, чутливих до відсутності кисню. Динаміка росту культури біфідобактерій у середовищі з бентонітом представлена в таблиці 2.

Приклад 4. Використання пропонованого способу для одержання препарату вітаміну В₁₂ із застосуванням як продуценту пропіоновокислих бактерій.

Особливість даного виробництва полягає в тому, що синтез вітаміну В₁₂ вимагає анаеробних умов росту культури продуцента. Тому через необхідність застосування дорогої апаратури і прийняття інших мір, що забезпечують оптимальний ріст пропіоновокислих бактерій, виробництво вітаміну В₁₂ є досить складним. Вітамін утворюється, в основному, внутрішньоклітинно й накопичується в молодій культурі, яка інтенсивно розмножується. Тому кількість утвореного вітаміну прямо залежить від інтенсивності утворення біомаси клітин.

Культуру пропіоновокислих бактерій вирощують у середовищі, яке традиційно використовується

ся для цих цілей та містить глюкозу, кукурудзяний екстракт, сірчаноокислий амоній і сіль кобальту. Однак перед внесенням культури в поживне середовище додають 6%-й гель бентоніту у співвідношенні 2:1. Процес ферментації проводять протягом 96г із безперервною нейтралізацією кислоти, що утворюється в результаті бродіння, розчином гідроксиду натрію (NaOH). Після завершення ферментаційного процесу біомасу відокремлюють центрифугуванням і виділяють із неї вітамін шляхом екстракції гарячою водою, підкисленою до pH 4,5-5,0. Потім біомасу відокремлюють, водний розчин вітаміну охолоджують, очищають від сторонніх домішок і кристалізують. Динаміка накопичення біомаси й продукції вітаміну B₁₂ представлена в таблиці 3.

У таблиці 1 представлена порівняльна характеристика ефективності відомого й пропонованого способу при виділенні з фекалій окремих представників анаеробних бактерій. Як видно із представлених у таблиці даних, пропонований спосіб дозволяє більш точно визначити вміст анаеробів у досліджуваному матеріалі.

У таблиці 2 представлена динаміка наростання клітин біфідобактерій у поживному середовищі при використанні відомого й пропонованого способу. Як видно з даних таблиці, при використанні пропонованого способу помітно збільшується швидкість розвитку культури біфідобактерій, концентрація життєдіяльних клітин і кількість біомаси.

У таблиці 3 представлені дані, що характеризують динаміку наростання біомаси й синтезу вітаміну B₁₂ пропіоновокислими бактеріями, при використанні відомого й пропонованого способу. Використання пропонованого способу дозволяє оптимізувати технологічний процес за рахунок більш інтенсивного росту культури, накопичення більшої кількості біомаси клітин і вітаміну B₁₂.

Таблиця 1

Результати аналізу фекалій на вміст окремих видів облигатних анаеробів при використанні відомого й пропонованого способу

Мікроорганізм	Концентрація клітин, Іg КУО/см ³	
	Відомий спосіб	Пропонований спосіб
Bifidobacterium	9,1	10,7
Lactobacillus	8,4	8,9
Propionibacterium	5,8	7,0
Bacteroides	8,8	10,3
Fusobacterium	5,1	6,9
Prevotella	3,6	5,0
Porphyromonas	0	3,9
Peptococcus	5,8	6,7
Peptostreptococcus	6,4	7,7
Eubacterium	4,8	6,0
Veillonella	0	3,5

Таблиця 2

Динаміка росту клітин і накопичення біомаси біфідобактерій при використанні відомого й пропонованого способу культивування для одержання пробіотика

Показник	Час культивування, год						
	4	8	12	16	20	24	28
Концентрація клітин, КУО/см ³ (відомий спосіб)	2,2x10 ⁷	5,1x10 ⁷	1,7x10 ⁸	3,3x10 ⁸	5,8x10 ⁸	1,8x10 ⁹	2,4x10 ⁹
Концентрація клітин, КУО/см ³ (пропонований спосіб)	3,4x10 ⁷	9,5x10 ⁷	4,8x10 ⁸	1,4x10 ⁹	4,3x10 ⁹	8,4x10 ⁹	9,1x10 ⁹
Біомаса, г/л (відомий спосіб)	3,1	3,8	4,6	5,8	7,7	9,1	10,1
Біомаса, г/л (пропонований спосіб)	3,9	5,4	6,8	8,2	9,8	14,5	18,4

Таблиця 3

Динаміка накопичення біомаси пропіоновокислих бактерій і синтезу вітаміну В₁₂ при використанні відомого й пропонуваного способів

Показник	Час культивування, година						
	12	24	48	60	72	84	96
Концентрація вітаміну В ₁₂ , мг/л (відомий спосіб)	4,9	6,3	8,4	12,3	17,9	20,6	25,8
Концентрація вітаміну В ₁₂ , мг/л (пропонований спосіб)	8,1	12,9	22,7	33,0	49,5	61,7	63,8
Біомаса, г/л (відомий спосіб)	3,1	3,8	4,6	5,8	7,7	9,1	10,1
Біомаса, г/л (пропонований спосіб)	5,8	9,4	14,0	17,2	20,8	26,5	29,4