

## **ПРЕБИОТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛАКТИТА И ЛАКТУЛОЗЫ ПРИ СОЗДАНИИ СИНБИОТИКОВ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS***

*Проведены исследования по изучению влияния лактита и лактулозы на рост пробиотических штаммов *B.subtilis* УКМ 5139 и *B.subtilis* УКМ 5140 и условно патогенных микроорганизмов. Показано, что степень влияния этих веществ зависит от их концентрации. При добавлении в питательную среду лактита или лактулозы в концентрации 15–20 % стимулировался рост пробиотических штаммов бацилл и ингибировался рост условно патогенных микроорганизмов, что опосредованно указывает на пребиотические свойства изучаемых дисахаридов. Установлено, что степень ингибирования лактулозой *P. vulgaris*, *S. flexneri*, *S. enterica abony*, *E. coli* 028 была более высокой в сравнении со степенью ингибирования их лактитом, но в свою очередь лактит был более эффективным по отношению к культурам *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans*, *S. derby* и *S. aureus*.*

*Ключевые слова:* *Bacillus*, антагонизм, лактит, лактулоза, пребиотики.

Препараты-пробиотики широко используются для коррекции дисбиотических состояний. Важное место при этом занимают бактерии рода *Bacillus*, составляющие основу многих известных пробиотиков (бактосубтилин, биосубтилин, биоспорин, энтерогермин, субалин).

Однако во всем мире проводятся исследования по созданию более совершенных и активных препаратов на основе различных групп микроорганизмов. Одним из путей усовершенствования пробиотиков является создание синбиотиков, в которых антагонистическое действие пробиотиков по отношению к условно патогенным и патогенным микроорганизмам сочетается с бифидогенным и лактогенным действием пребиотиков – веществ, которые благоприятно влияют на макроорганизм за счет выборочной стимуляции роста и активности представителей нормальной микрофлоры кишечника [2]. Классическим пребиотиком на сегодняшний день считают лактулозу [3, 4]. В сочетании с лактобациллами и бифидобактериями она входит в состав известных синбиотиков, которые широко используются для нормализации видового и количественного состава кишечной микрофлоры [1, 7]. В последнее время появились сведения о пребиотических свойствах нового дисахарида лактита, полученного, как и лактулоза, из молочного сахара химическим путем [11].

В научной литературе существуют лишь единичные данные о возможности создания синбиотиков на основе бактерий рода *Bacillus*. Поэтому исследования лактита и лактулозы как пребиотиков в сочетании с бактериями рода *Bacillus* являются актуальными и перспективными.

Одним из условий использования какого-либо вещества в качестве пребиотика является высокая биосовместимость его с пробиотическими штаммами, а также ингибирование условно патогенной и патогенной микрофлоры кишечника. Для обоснования возможности использования лактита и лактулозы в качестве пребиотиков в комплексном синбиотическом препарате необходимо изучение их влияния на рост и активность пробиотических штаммов, а также на ряд представителей условно патогенной и патогенной микрофлоры, что и стало целью нашей работы.

**Материалы и методы.** Объектами исследования были пробиотические штаммы *B.subtilis* УКМ 5139 и *B.subtilis* УКМ 5140, являющиеся основой препарата эндоспорин, созданного для лечения и профилактики дисбактериоза и различных кишечных инфекций [13]. Для определения влияния различных концентраций лактита и лактулозы на штаммы различных условно патогенных микроорганизмов в качестве тест-культур использовали 10 штаммов родов *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и *Candida*.

Культивирование штаммов бацилл осуществляли в периодических условиях на качалке (200 об/мин) при 37 °С в колбах емкостью 750 мл с 50 мл питательной среды (г/л): глюкоза – 15,0, натрия цитрат – 1,29;  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  – 4,75,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 9,6,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,18, pH среды –  $7,0 \pm 0,2$  [8]. В качестве дополнительных источников углерода использовали лактит или лактулозу в концентрации от 1 до 20 %.

Интенсивность роста микроорганизмов в стационарных условиях культивирования оценивали по оптической плотности выросшей культуры путем фотометрии суспензии при 540 нм (зеленый светофильтр) с толщиной кюветы 1 см. При глубинном культивировании концентрация жизнеспособных клеток бактерий определялась путем посева 0,1 мл соответствующего разведения суспензии на плотную питательную среду с последующим подсчетом КОЕ в 1 мл культуральной жидкости.

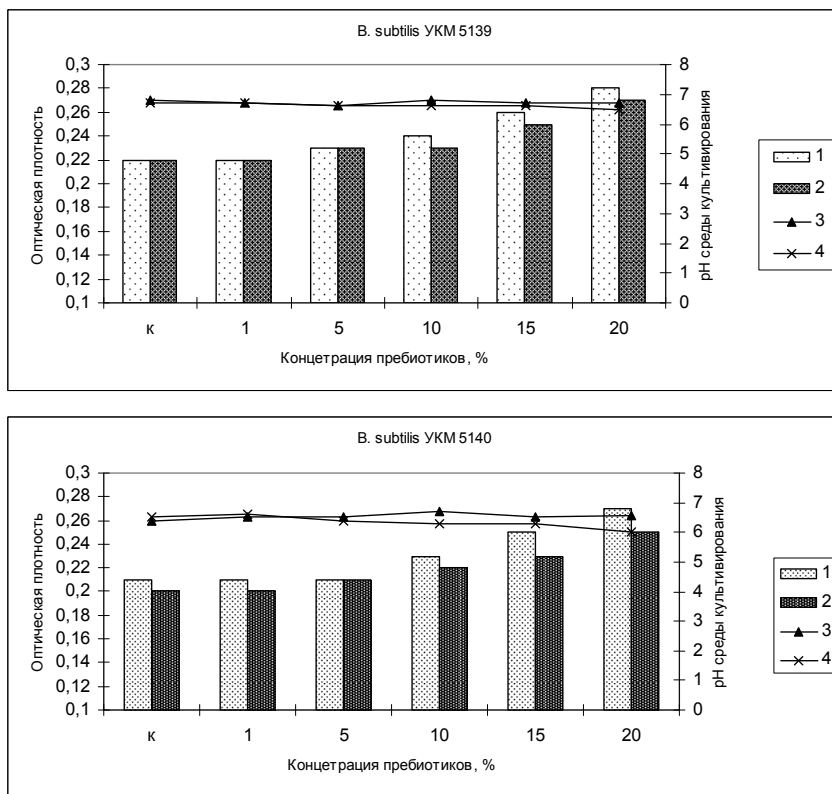
Совместное культивирование тест-культур, пробиотических штаммов и пребиотиков проводили на стрептомицетной среде (Гаузе №2) при температуре 37 °С в течение 24 ч. После чего по 0,1 мл культуральной жидкости из соответствующих десятикратных разведений высевали на дифференциально-диагностические среды: Эндо для определения количества жизнеспособных клеток бактерий р. *Escherichia*, малахитовый агар – *Pseudomonas*, стафилококковый агар – *Staphylococcus* и Сабуро агар – *Candida*.

Степень ингибирования роста бактерий определяли по методике [10].

Эксперименты проводили в 3 повторностях, в качестве критерия достоверности использовали критерий Стьюдента при 5 % уровне значимости.

**Результаты и их обсуждение.** В предыдущих исследованиях было показано, что лактит активно использовался в качестве источника углеводного питания представителями нормофлоры кишечника и изучаемыми пробиотическими штаммами *B.subtilis* [11]. Для дальнейших исследований необходимо было определить и сравнить концентрации лактулозы и лактита, оптимальные для роста пробиотических штаммов при глубинном способе культивирования.

В результате проведенных исследований установлено, что *B.subtilis* УКМ 5139 и *B.subtilis* УКМ 5140 активно накапливают биомассу на средах со всеми исследуемыми концентрациями лактулозы и лактита, при этом степень стимуляции роста бактерий зависела от концентрации этих веществ в среде (рис 1).



**Рис. 1. Влияние различных концентраций лактита и лактулозы на рост *Bacillus subtilis* в стационарных условиях культивирования**

Обозначения: 1, 2 – рост *B. subtilis* в присутствии лактита и лактулозы соответственно; 3, 4 – рН среды культивирования *B. subtilis* при наличии лактита и лактулозы соответственно

Однако характер действия лактулозы несколько отличался от характера действия лактита. Как показано на рис. 1, лактит уже в 10 %-й концентрации стимулировал рост бацилл, а лактулоза начинала стимулировать их рост при 15 %. Наибольший уровень стимуляции роста бактерий отмечался при 15–20 % как лактулозы, так и лактита. При этих концентрациях пребиотиков наблюдалось накопление значительного количества жизнеспособных клеток бацилл (от 10,3 до 10,8 lg КОЕ/мл), что свидетельствует о высокой биосовместимости пробиотических штаммов *B.subtilis* как с лактитом, так и с лактулозой, что в сочетании с их бифидо- и лактогенными свойствами соответствует требованиям к пребиотикам. В дальнейших исследованиях по глубинному культивированию использовалась концентрация лактита и лактулозы, равная 15 %.

В существующей литературе известны данные относительно снижения содержания условно патогенных микроорганизмов, главным образом, под воздействием лактулозы, которая уже стала классическим веществом, влияющим на метаболизм микрофлоры кишечника [3, 4, 14]. В них показана ее эффективность при терапии носительства шигелл и сальмонелл. Имеются также данные об ингибировании лактулозой роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* и бактерий родов *Pseudomonas*, *Proteus* [3]. Однако все исследователи приходили к выводу о том, что лактулоза первоначально стимулирует рост лакто- и бифидобактерий, а уже потом под воздействием этих бактерий в присутствии лактулозы снижается численность условно патогенных микроорганизмов.

Результаты исследований влияния лактита и лактулозы на рост представителей условно патогенных и патогенных микроорганизмов показали, что оба дисахарида подавляли рост исследуемых штаммов микроорганизмов, но степень влияния значительно зависела от концентрации исследуемых веществ в среде и видовой принадлежности тест-микроорганизмов (таблица).

Таблица

**Влияние лактита и лактулозы на рост условно патогенных и патогенных микроорганизмов**

Тест-микроорганизм	Лактит		Лактулоза			
	Степень ингибирования роста, %					
	1	10-15	15-20	1	10-15	15-20
<i>E. coli ATCC 25922</i>	4	38	42	4	35	35
<i>C. albicans 690</i>	0	28	32	8	23	23
<i>P. aeruginosa 4141</i>	0	7	7	0	7	11
<i>P. vulgaris U-8</i>	11	18	23	7	20	30
<i>S. derby 2659</i>	8	25	38	0	22	32
<i>S. flexneri 337</i>	14	29	31	32	41	41
<i>S. enterica abony</i>	8	22	36	7	27	50
<i>P. vulgaris 72</i>	0	15	26	0	28	59
<i>S. aureus 209</i>	15	32	41	2	13	26
<i>E. coli 028</i>	7	42	42	9	48	48

Как видно из таблицы, лактит уже в концентрации 1 % ингибировал рост *S. aureus 209*, *S. flexneri 337*, *S. derby 2659*, *P. vulgaris U-8*, *S. enterica abony*, лактулоза в этой же концентрации подавляла рост *S. enterica abony*, *C. albicans 690*, *P. vulgaris U-8*, *S. flexneri 337*, *E. coli ATCC 25922*. С увеличением концентрации лактита до 10–15 % в среде культивирования наблюдали торможение роста всех исследуемых тест-культур, за исключением *P. aeruginosa 4141*. А при добавлении в питательную среду лактита в концентрации 15–20 %, при которой, как было показано раньше [11], стимулировалось накопление биомассы изучаемых пробиотических штаммов, ингибировался рост изучаемых тест-культур на 25–40 %. Исключением был штамм *P. aeruginosa 4141*, численность жизнеспособных клеток которого снижалась лишь на 7 %.

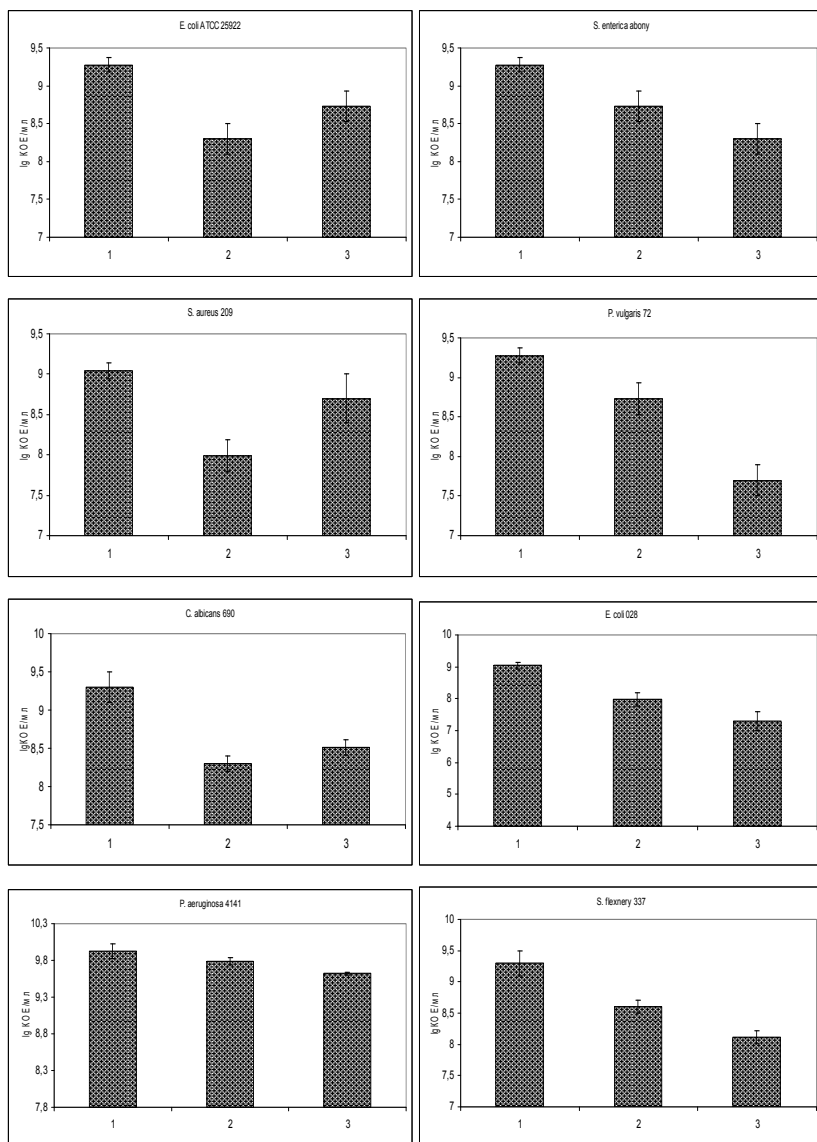
В то же время лактулоза, которая в концентрации 1 % в среде культивирования способна была подавлять лишь рост культур *E. coli 028*, *C. albicans 690*, *P. vulgaris U-8*, *S. flexneri 337*, *S. enterica abony*, при концентрации 15–20 % ингибировала на 23–58 % рост всех исследуемых тест-культур, за исключением *P. aeruginosa 4141*. При этом степень ингибирования лактулозой таких культур как *P. vulgaris U-8*, *P. vulgaris 72*, *S. flexneri 337*, *S. enterica abony*, *E. coli 028* была более высокой в сравнении со степенью ингибирования их лактитом. Однако, в свою очередь,

лактит был более эффективным по отношению к культурам *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* 690, *S. derby* 2659, *S. aureus* 209 p.

Такая разница в степени влияния лактита и лактулозы на рост исследуемых культур условно патогенных микроорганизмов объясняется, главным образом, тем, что в процессе их культивирования в присутствии лактулозы снижение pH среды происходило более резко, чем с лактитом. Как известно, такое снижение pH среды при ферментации лактулозы и лактита микроорганизмами происходит в результате образования молочной и уксусной кислот, которые способны подавлять рост многих условно патогенных микроорганизмов [3, 5, 12].

Таким образом, полученные результаты показали, что лактит и лактулоза способны ингибировать рост условно патогенных и патогенных микроорганизмов, что указывает на их пробиотические свойства, что не противоречит известным данным [4, 5, 14].

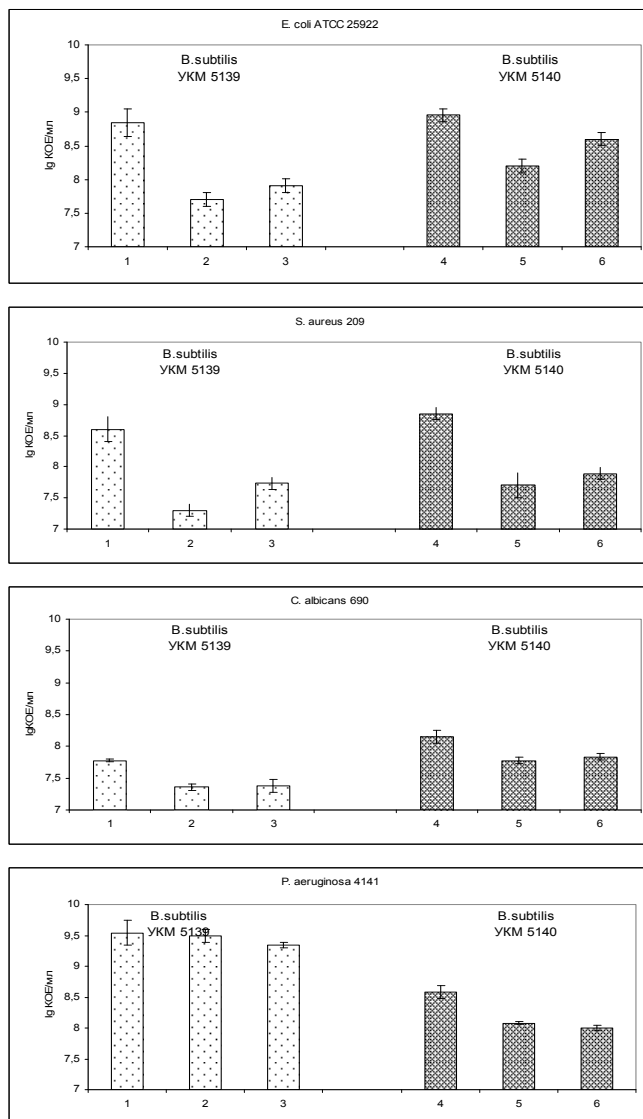
Полученные результаты были подтверждены также в опытах при совместном культивировании тест-культур условно патогенных микроорганизмов с пробиотиками и пробиотическими штаммами бацилл. Установлено, что в таких условиях лактит в большей мере, чем лактулоза, ингибировал рост *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* 690, *S. aureus* 209 p, при этом оба пробиотика наиболее слабо влияли на рост тест культуры *P. aeruginosa* 4141 (рис. 2).



**Рис 2. Влияние лактита и лактулозы на рост тест-культур условно патогенных микроорганизмов в условиях глубинного культивирования**

Обозначения: 1 – тест- культура, 2 – тест -культура + лактит, 3 – тест -культура + лактулоза

Наряду с этим показано, что при совместном культивировании тест-культур условно патогенных микроорганизмов и пробиотических штаммов в присутствии лактата или лактулозы количество жизнеспособных клеток исследуемых тест-культур было значительно меньшим, чем при культивировании без добавления пребиотиков в среду (рис. 3), что является свидетельством того, что лактит и лактулоза не снижают антагонистичную активность *B.subtilis* УКМ 5139 и *B.subtilis* УКМ 5140 в отношении тест-культур *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans* 690, *S. aureus* 209p и *P. aeruginosa* 4141. Как показано на рис. 3, опыты по совместному культивированию подтвердили более высокую эффективность лактата.



**Рис. 3. Рост тест-культур при совместном культивировании с пробиотическими штаммами *B. subtilis* в присутствии 15 % лактулозы и лактата в условиях глубинного культивирования**

Обозначения: 1, 4 – тест -культура + штамм пробиотика, 2, 5 – тест -культура + лактит + штамм пробиотика, 3, 6 – тест культура + лактулоза + штамм пробиотика.

Следует отметить, что, по сравнению с лактулозой, пробиотические свойства лактата стали исследоваться не так давно и преимущественно за рубежом, компанией Pirac (Нидерланды). Эти работы посвящены в основном описанию результатов его эффективного клинического применения [9, 6, 14]. В России даже стали производить жидкие препараты под названием «нормофлорин» на основе лактата и живых клеток бифидо- и лактобактерий [6, 14].

Нами впервые показано высокую биосовместимость изучаемых пробиотических штаммов бацилл с лактитом и лактулозой, что обеспечивало значительное накопление биомассы клеток бацилл с сохранением их высокой антагонистической активности, значительное ингибирование этими веществами роста патогенных и условно патогенных микроорганизмов. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования исследуемых дисахаридов в качестве пребиотиков в составе биопрепаратов на основе бактерий рода *Bacillus* для нормализации микрофлоры кишечника при профилактике и лечении заболеваний желудочно-кишечного тракта.

*М.А. Хархота, А.І. Осадча, Л.В. Авдеева*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ*

## **ПРЕБИОТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ЛАКТИТУ І ЛАКТУЛОЗИ ПРИ СТВОРЕННІ СИНБІОТИКІВ НА ОСНОВІ БАКТЕРІЙ РОДУ *BACILLUS***

Резюме

Проведено дослідження щодо вивчення впливу лактиту і лактулози на ріст пробіотичних штамів *B.subtilis* УКМ 5139 і *B.subtilis* УКМ 5140 та умовно патогенних мікроорганізмів. Показано, що ступінь впливу цих речовин залежить від їх концентрації. При додаванні в поживне середовище лактиту або лактулози в концентрації 15–20 % стимулювався ріст пробіотичних штамів бацил та інгібувався ріст умовно патогенних мікроорганізмів, що опосередковано вказувало на пребіотичні властивості дисахаридів, що вивчалися. Встановлено, що ступінь інгібування лактулозою *P. vulgaris*, *S. flexneri*, *S. enterica abony*, *E. coli* 028 був вищим порівняно зі ступенем інгібування їх лактитом, але, у свою чергу, лактит був ефективнішим стосовно культур *E. coli* ATCC 25922, *C. albicans*, *S. derby* і *S. aureus*.

Ключові слова: *Bacillus*, антагонізм, лактит, лактулоза, пребіотики.

*М.А. Kharkhota, A.I. Osadchaya, L.V. Avdeeva*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology,  
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## **PREBIOTIC PROPERTIES OF LACTITE AND LACTULOSE UNDER CREATION OF SYNBIOTICS OF *BACILLUS* GENUS BACTERIA**

S u m m a r y

The influence of lactite and lactulose on growth of probiotic strains *B. subtilis* UKM 5139 and *B. subtilis* UKM 5140 and conditionally pathogenic microorganisms has been studied. It is shown that the extent of influence of these substances depends on their concentration. Addition of lactite or lactulose in the nutrient medium stimulated growth of probiotic bacilli strains in concentration of 15-20 % and inhibited growth of conditionally pathogenic microorganisms. It specifies the prebiotic properties of the studied disaccharides. It is established that the extent of inhibition of *P. vulgaris*, *S. flexneri*, *S. enterica abony*, *E. coli* 028 by lactulose was higher in comparison with the extent of their inhibition by lactite, but in turn lactite was more effective in relation to the strains *E.coli* ATCC 25922, *C. albicans*, *S. derby* and *S. aureus*.

The paper is presented in Russian.

**Key words:** *Bacillus*, antagonism, lactite, lactulose, prebiotics.

**The author's address:** *Kharkhota M.A.*, Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D03680, Ukraine.

1. Бондаренко В.М., Воробьев А.А. Дисбиозы и препараты с пробиотическими функциями // Журн. микробиология. – 2004. – № 1. – С. 84–92.
2. Боровик Т.Э., Ревякина В.А., Макарева С.Г. Диетотерапия при пищевой аллергии у детей раннего возраста // Российский аллергологический журнал. – 2004. – № 4. – С. 1–2.
3. Буторова Л.И., Калинин А.В. Возможности коррекции нарушения кишечного микробиоценоза лактулозой // Гастроэнтерология для врачей. – 2001. – Т. 11, № 1. – С. 79–82.

4. Грибакин С.Г. Лактулоза в детском питании: пребиотик «со стажем» // Вопросы детской диетологии. – 2003. – Т. 1, № 4. – С. 46–52.
5. Конн Г.О., Либертал М.М. Синдром печеночной комы и лактулоза. Пер. с англ. М.: Медицина, 1983. – 516 с.
6. Наханетян Л.А. Лактит // Лечащий врач. – 2004. – № 4. – С. 53.
7. Оноприев В.В., Ковалевская О.В., Лымарь М.С., Лымарь И.П. Опыт применения нормофлоринов в лечении хронического запора // Клиническое питание. – 2007. – № 1–2. – С. 58–59.
8. Осадчая А.И., Кудрявцев В.А., Сафронова Л.А., Козачко И.А., Смирнов В.В. Стимуляция роста и спорообразования *Vacillus subtilis* оптимизацией углеродного питания при глубинном культивировании // Прикл. биохимия и микробиология, 1997 – **33**, №3, – С. 321–324.
9. Полищук В.М. Лактит, возможность создания новых продуктов // Молочная промышленность. – 2003. – № 6 (9). – С. 8–9.
10. Пульхеровская Л.П., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Методические указания к лабораторно-практическим занятиям по дисциплине «пробиотики». Ульяновск. – 2010. – 70 с.
11. Сафронова Л.А., Осадчая А.И., Иляш В.М. Пребиотик лактит как компонент биопрепарата из аэробных бацилл // Микробиол. журнал. – 2008. – Т. 70, № 6. – С. 34–41.
12. Храпцов А.Г., Рябцева С.А., Евдокимов И.А., Ким В.В., Дыкало Н.Я. Новое направление использования лактулозы // Молочная промышленность. – 1999. – № 6. – С. 23–24.
13. Пат. Украина №76669 А61К35/74 Биопрепарат для лечения и профилактики кишечных инфекций у животных. / Сафронова Л.А., Кудрявцев В.А., Осадчая А.И. Опубл. 15. 08. 2006 Б. № 8.
14. Ballongne J. Effect of lactulose and lactitol on colonic microflora and enzymatic activity // Scand. Gastroenterol. – 1997. – 32, Suppl 222. – P. 41–44/Klin Wochenschr. – 1964. – **42**. – S. 126–130.

Отримано 17.02.2011