

Отчет об оценке ингибирующего эффекта лактобактерий Реутери NCIMB 30351, влияющего на рост различных видов клостридий

Цель:

Проверить, способны ли лактобактерии Реутери NCIMB 30351 влиять на рост 3 разных штаммов клостридий: энтеритной клостридии типа А, энтеритной клостридии типа С и вида Клостридиум диффициле.

Материалы:

- (3 бутылки емкостью 100 мл) с усиленной клостридиальной средой, патент США. Производитель: Hardy Diagnostics, номер по каталогу: U172.
- (3 бутылки емкостью 1 л) со средой по де Мену, Рогозе и Шарпу (МРШ). Производитель: Hardy Diagnostics, номер по каталогу: C5934.
- 0,9%-й физиологический раствор.
- (18) пластинок с яично-желточным агаром. Производитель: Hardy Diagnostics, номер по каталогу: AG401.
- (3 x 10 мл) лактобактерии Реутери NCIMB 30351, влажный рабочий штамм (WWS)
- (1 флакон для лиофильной сушки) энтеритной клостридии типа А ATCC®13124™
- (1 флакон для лиофильной сушки) энтеритной клостридии типа С ATCC®3628™
- (1 флакон для лиофильной сушки) вида Клостридиум диффициле ATCC®BAA-1870™

Метод:

а) По каждому из тестируемых штаммов клостридий – взять каждый флакон для лиофильной сушки (энтеритной клостридии типа А ATCC®13124™, энтеритной клостридии типа С ATCC®3628™ или вида Клостридиум диффициле ATCC®BAA-1870™)

и оживить их в специальной усиленной клостридиальной среде (100 мл). Дать каждому штамму вырасти в инкубаторе в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 48 часов.

б) Подготовить три бутылки емкостью 1 л с автоклавной стерилизованной средой МРШ (поместив в бутылку магнитную мешалку с тефлоновым покрытием). Охладив ее до комнатной температуры, инокулировать лактобактерии Реутери NCIMB 30351 (штамм WWS) в каждую бутылку с МРШ. Дать каждой бутылке вырасти в инкубаторе в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 12 часов, [начать ферментацию в момент, совпадающий с окончанием ферментации на этапе (а)].

с) Подготовить три бутылки емкостью 1 л с автоклавным стерилизованным 0,9%-м физиологическим раствором (поместив в бутылку магнитную мешалку с тефлоновым покрытием).

д) После выращивания штаммов клостридий в соответствующей среде в течение 48 часов перенести пипеткой 10 мл каждого штамма в отдельные бутылки емкостью 1 л с ферментативным бульоном лактобактерий Реутери NCIMB 30351 и 0,9%-м физиологическим раствором.

е) Дать каждой бутылке емкостью 1 л с инокулированными 10 мл каждого штамма клостридий постоять еще 12 часов для смешивания внутри инкубатора с анаэробными условиями.

ф) Нанести метки на 18 пластинок с яично-желточным агаром (селективным агаром для видов клостридий):

- 3 пластинки будут использоваться для тестирования энтеритной клостридии типа А, добавленной в ферментативный бульон лактобактерии Реутери.

BIOAMICUS LABORATORIES

106-3150 Dufferin St., Toronto Ontario, CANADA M6A 2T1 (КАНАДА)

Отчет об оценке ингибирующего эффекта лактобактерий Реутери NCIMB 30351, влияющего на рост различных видов клостридий

- 3 пластинки будут использоваться для тестирования энтеритной клостридии типа А, добавленной в 0,9%-й физиологический раствор.
- 3 пластинки будут использоваться для тестирования энтеритной клостридии типа С, добавленной в ферментативный бульон лактобактерии Реутери.
- 3 пластинки будут использоваться для тестирования энтеритной клостридии типа С, добавленной в 0,9%-й физиологический раствор.
- 3 пластинки будут использоваться для тестирования вида Клостридиум диффициле, добавленного в ферментативный бульон лактобактерии Реутери.
- 3 пластинки будут использоваться для тестирования вида Клостридиум диффициле, добавленного в 0,9%-й физиологический раствор.

g) Накапайте пипеткой 1 мл из каждой бутылки емкостью 1 л на специальные пластинки с яично-желточным агаром. Равномерно посейте образец штрихом по всей поверхности агаровых пластинок.

f) Поместите каждую агаровую пластинку в анаэробный инкубатор с температурой 37°C на 48 часов.

g) Через 48 часов посчитайте количество колоний, образовавшихся на каждой агаровой пластинке.

Добавьте или энтеритную клостридию типа А, или энтеритную клостридии типа С, или Клостридиум диффициле в усиленную клостридиальную среду.

Среда МРШ с лактобактериями Реутери

Посейте 10 мл каждого штамма клостридий в специальный набор бутылок с МРШ и физраствором. Дайте постоять 12 часов для смешивания.

Поместите образцы (1 мл) из каждой бутылки на пластинки с яично-желточным агаром в трех параллельных опытах.

Посчитайте количество колоний через 48 часов после инкубации.

0,9%-й физиологический раствор

Результаты:

После анаэробной инкубации в течение 48 часов при температуре 37°C каждый образец на пластинках с яично-желточным агаром наблюдали на предмет образования колоний. По каждой агаровой пластинке велся подсчет количества сформировавшихся колоний. Полученные результаты приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Количество колоний, образовавшихся на образцах пластинок с яично-желточным агаром

Штамм, выросший в клостридиальной среде	Раствор, в который был произведен посев 10-мл образца клостридии	Обозначение пластинки	Количество колоний, образовавшихся на пластинках с яично-желточным агаром через 48 часов при температуре 37°C (анаэробная инкубация)	Среднее количество колоний

BIOAMICUS LABORATORIES

106-3150 Dufferin St., Toronto Ontario, CANADA M6A 2T1 (КАНАДА)

Отчет об оценке ингибирующего эффекта лактобактерий Реутери NCIMB 30351,
влияющего на рост различных видов клостридий

Энтеритная клостридия типа А	Ферментативный бульон Л. Реутери NCIMB 30351 в среде МРШ	1	28	28,67
		2	32	
		3	26	
		1	420	
		2	412	
		3	388	
		1	33	
		2	42	
		3	22	
		1	368	
		2	390	
		3	401	
		1	21	
		2	16	
		3	12	
		1	260	
		2	223	
		3	240	

Разбор:

Если сравнивать образцы на пластинках с яично-желточным агаром, полученные с использованием ферментативного бульона Л. Реутери NCIMB или 0,9%-й физиологического раствора, налицо выраженное различие между двумя группами по числу образовавшихся колоний (см. Таблицу 1. Количество колоний, образовавшихся на образцах пластинок с яично-желточным агаром).

Пластинки с образцами энтеритной клостридии типа А, полученными с использованием ферментативного бульона Л. Реутери в среде МРШ, в среднем дали 28,67 колоний. Это число сильно отличается от количества колоний, рост которых наблюдался после инкубации в 0,9%-м физиологическом растворе (в среднем 406,67 колоний). Образцы данной группы, полученные с использованием ферментативного бульона Л. Реутери в среде МРШ, дали всего 7,05% колоний по сравнению с образцами, полученными с помощью 0,9%-го физиологического раствора.

Пластинки с образцами энтеритной клостридии типа С, полученными с использованием ферментативного бульона Л. Реутери в среде МРШ, в среднем дали 32,33 колоний. Это число также сильно отличается от количества колоний, рост которых наблюдался после инкубации в 0,9%-м физиологическом растворе (в среднем 386,33 колоний). Образцы данной группы, полученные с использованием ферментативного бульона Л. Реутери в среде МРШ, дали всего 8,37% колоний по сравнению с образцами, полученными с помощью 0,9%-го физиологического раствора.

Пластинки с образцами Клостридиум диффициле, полученными с использованием ферментативного бульона Л. Реутери в среде МРШ, в среднем дали 16,33 колоний. Это

BIOAMICUS LABORATORIES

106-3150 Dufferin St., Toronto Ontario, CANADA M6A 2T1 (КАНАДА)

Отчет об оценке ингибирующего эффекта лактобактерий Реутери NCIMB 30351,
влияющего на рост различных видов клостридий

число также сильно отличается от количества колоний, рост которых наблюдался после инкубации в 0,9%-м физиологическом растворе (в среднем 241 колония). Образцы данной группы, полученные с использованием ферментативного бульона Л. Реутери в среде МРШ, дали всего 6,78% колоний по сравнению с образцами, полученными с помощью 0,9%-го физиологического раствора.

Выводы:

Добавление каждого вида клостридий в данном исследовании к каждому ферментативному бульону Л. Реутери NCIMB 30351 показывает, что Л. Реутери служит действенным ингибитором в присутствии энтеритной клостридии типа А, энтеритной клостридии типа С и вида Клостридиум диффициле по сравнению с использованием только 0,9%-го физиологического раствора.

Можно выделить несколько причин подобного явления: разные виды клостридий могут вступать в средовую конкуренцию за ресурсы Л. Реутери. Кроме того, известно, что Л. Реутери выделяет антимикробное средство РЕУТЕРИН, который может негативно сказываться на выживаемости клостридий. И, наконец, ферментативный бульон Л. Реутери отличается повышенной кислотностью, его рН обычно варьирует от 2,0 до 3,0; при этом протестированные виды клостридий фактически не могут выживать в среде с таким низким числом рН.