

УДК 636.09:602:579.864:615.24:615.375

Р. С. МАКСИМЧУК, аспірант **Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (м. Київ)***ДОВГОТЕРМІНОВЕ ЗБЕРІГАННЯ ШТАМІВ ГРУПИ *LACTOBACILLUS* В КОЛЕКЦІЇ НЦЦІМ ДНКІБШМ**

*Наведено огляд даних літератури щодо культурально-морфологічних, біохімічних та інших біологічних властивостей лактобактерій. Охарактеризовано біотехнологічний процес довготермінованого зберігання виробничих штамів лактобактерій у колекції НЦЦІМ ДНКІБШМ. Показано, що актуальним напрямком у майбутніх дослідженнях є оптимізація процесу ліофілізації, підбір умов підвищення стабільності під час довготермінового зберігання та розробка методу відновлення основних видових ознак *Lactobacillus* після тривалого зберігання.*

Ключові слова: Lactobacillus, штами, біотехнологія, оптимізація, процес довготермінового зберігання, пробіотики.

Пробіотики широко використовуються у ветеринарній медицині для стимуляції росту та розвитку молодняка, профілактики шлунково-кишкових захворювань при відновленні кишкового біоценозу та стресах, а також як альтернативний метод антибіотикотерапії. Пробіотики є екологічно безпечними препаратами, не мають побічної дії при тривалому та регулярному їх використанні. Вони можуть бути, в деяких випадках, заміниками антибіотиків в загальній схемі неспецифічної профілактики шлунково-кишкових захворювань [1,2].

Нині відома значна кількість пробіотичних препаратів на основі молочнокислих і біфідобактерій, які є однією з основних захисних груп мікроорганізмів кишечника для людини і тварин [3, 4, 5]. Біотехнологічний процес їх виробництва постійно вдосконалюється [6]. Аналіз даних літератури показує, що центральне місце при роботі з біологічною складовою, яка складає основу пробіотичних препаратів, займає процес довготермінового зберігання виробничих культур у колекціях [7,8,9].

Директиви ЄС та Національна законодавча база визначають необхідність депонування та довготермінового зберігання виробничих штамів мікроорганізмів у колекціях з метою отримання стабільних показників специфічної активності та гарантування безпеки препаратів .

Проте у світі існують різні підходи до роботи з виробничими культурами. Вони формуються на основі глибоких наукових досліджень і складають «ноу-хау» кожного окремо взятого виробника. Тому надзвичайно актуальною є проблема розробки власних наукових підходів до процесу довготермінового зберігання у колекціях виробничих штамів мікроорганізмів. Особливо важливим є розвиток власної біологічної промисловості, яка почала формуватися на початку 90-х років минулого століття.

* Науковий керівник – доктор сільськогосподарських наук Постоєнко В. О.

Так, Постановою Кабінету Міністрів України № 705 від 12 жовтня 1994 року «Про створення системи депонування штамів мікроорганізмів» засновано ряд депозитаріїв і серед них депозитарій Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів, до задач якого входить депонування з метою патентної процедури. Постанова Кабінету Міністрів України № 673 від 7 травня 1998 року затвердила «Положення про Національний центр штамів мікроорганізмів України і порядок депонування штамів мікроорганізмів». Законом «Про ветеринарну медицину», ст. 63 п. 11, визначено, що при реєстрації ветеринарних імунобіологічних препаратів, виробничий штам повинен бути задепонований в НЦШМ ДНКІБШМ. Створення умов довготермінового гарантованого зберігання виробничих штамів мікроорганізмів передбачає виконання повного циклу досліджень, стабільності, транспортних характеристик штамів мікроорганізмів та відпрацювання наукових основ кожної зі стадій зазначеного процесу.

В колекції штамів НЦШМ ДНКІБШМ нараховується 15 видів лактобацил.

Метою даної роботи є огляд даних літератури з дослідження культурально-морфологічних, біохімічних та інших біологічних властивостей лактобацил та обґрунтування визначальних стадій біотехнологічного процесу їх довготермінового зберігання у колекції, що потребують детального вивчення й удосконалення.

Робота з виробничими штамми лактобацил, які підтримуються в НЦШМ ДНКІБШМ ведеться за наступною схемою :

ліофілізована культура;

відновлення культурально-морфологічних, біохімічних, біологічних властивостей культури після тривалого зберігання у ліофілізованому стані;

виділення чистої культури;

визначення концентрації живих клітин (КУО);

контрольне визначення культурально-морфологічних, біохімічних і біологічних властивостей штамів після ліофілізації;

ліофільне висушування;

зберігання лактобактерій в колекції НЦШМ у ліофільному стані.

Дані літератури та наведена вище схема показує, що визначальними стадіями при роботі з *Lactobacillus* є дослідження їх культурально-морфологічних, біохімічних та інших біологічних властивостей, оптимізація процесу ліофілізації, підбір умов підвищення стабільності під час довготермінового зберігання та розробка методу відновлення основних видових ознак після тривалого збереження [3,10].

За видовими культурально-морфологічними властивостями *Lactobacterium* відносять до паличкоподібних організмів; клітини прямі або викривлені з густою, що різко переломлює світло плазмою й чіткими контурами, нерухомі, грам-позитивні, спор не утворюють. У процесі розвитку клітини вкорочуються майже до коковидних. В середині клітин містяться зерна метакроматину, іноді в великій кількості у вигляді округлих зерен, які нагадують репродуктивні тільця у мікобактерій. Величина клітин змінюється з віком, в залежності від складу середовища і умов культивування. На молочному агарі чи інших диференційних поживних середовищах молоді культури утворюють маленькі палички, 1,5-5,0*0,6 м, або довгі 7-10 м чи більші, а деякі культури у великій кількості ниткоподібної форми. Нерідко ці форми зустрічаються у різних варіантів одного і того ж виду, які отримані у процесі розщеплення основної культури. Розмножуються молочно-кислі бактерії діленням. Іноді перешнуванням, а також спостерігається утво-

рення бокових виростів – гілок. Ці штами є типовими за своїми культурально-морфологічними та фізіологічними ознаками. Природним поживним середовищем культивування є молоко, при метаболічному перетворенні якого утворюється молочна кислота. Завдяки ферментолізу лактози цей процес у часі проходить відповідно зі зниженням показника рН у кислу сторону. Ці властивості і закладено при виробництві пробіотиків [8,9,10,11].

Лактобактерії входять до групи мікроорганізмів, що практично не синтезують всі органічні сполуки, що необхідні для росту, і тому залежать від присутності їх в середовищі культивування. Ці фактори можна об'єднати в три групи: вітаміни (в низьких концентраціях), амінокислоти, пурини і піримідини [8,7,11].

Усі ці фактори варіюються в середовищі культивування в залежності від виду бактерій. Для росту лактобацил необхідна присутність в середовищі культивування всіх амінокислот, пуринів, піримідинів та вітамінів. Основним поживним середовищем культивування *Lactobacillus* у лабораторних умовах є лактобакагар. Морфологія колоній при вирощуванні на цьому середовищі типова (рис. 1).

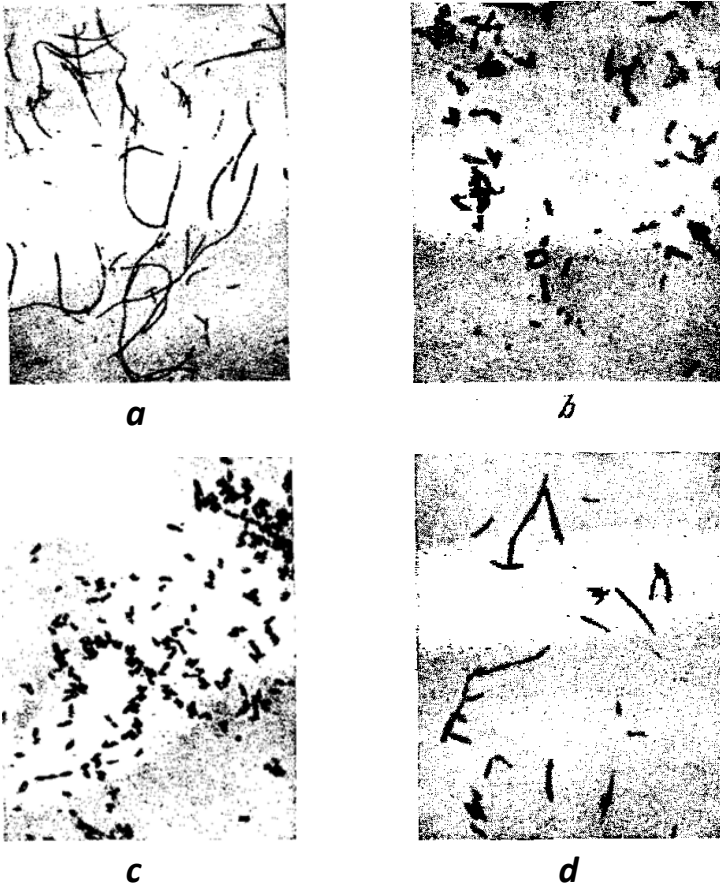


Рис. 1. Морфологія колоній *Lactobacillus* при вирощуванні на лактобакагарі [1,3,5]:

а-ниткоподібні клітини; б-палички середнього розміру із закругленими кінцями; с-коковидна форма клітин; д-подовжені палички з голкоподібними відростками.

Культивують *Lactobacillus* на лактобакагарі наступним чином: стерильно розливають у чашки Петрі штами *Lactobacillus*, культури висівають штрихом або газоном. Витримують у термостаті при 28°C 24 години. Після інкубаційного періоду проводять візуальний аналіз колоній. Колонії, що виростили на вище зазначеному середовищі є типовими за культурально-морфологічними ознаками.

Вони зазвичай дрібні, гладкі або зернисті, плоскі або злегка опуклі, безбарвні [1,5].

Лактобактерії культивують на декількох поживних середовищах. Достатній ріст культуральної суспензії спостерігають при вирощуванні на поживному середовищі МРС з цистеїном. Але також можливе культивування штамів молочнокислих бактерій і на напів синтетичних поживних середовищах з вмістом складових, 2/л: глюкоза - 20,0; пептон - 1,0; дріжджовий екстракт - 5,0; (NH₄)₂SO₄ - 5,0; KH₂PO₄ - 1,5; MgSO₄ - 7H₂O - 0,5; Ca(NO₃)₂ - 0,1; NaCl - 5,0; MnSO₄ - 5H₂O - 5,0; ZnSO₄ - 7H₂O - 0,01; FeCl₃ - 6H₂O - 0,005; вода дистильована; рН 6,8-7,0 [7,11,12]. Характерною особливістю цих мікроорганізмів є їх здатність зброджувати вуглеводи, з утворенням молочної кислоти. Істинні (гомоферментативні) молочнокислі бактерії утворюють в основному молочну кислоту. Деякі культури при зброджуванні цукру, крім молочної кислоти, утворюють вуглекислий газ і оцтову кислоту у помітних кількостях (гетероферментативні). Антибіотико резистентність лактобактерій наведена в (табл. 1).

Таблиця 1

Резистентність *Lactobacillus plantarum* та *Lactococcus lactis* *ubsp. cremoris* до різних антимікробних агентів

Антибіотик	Концентрація, мкг/мл	Резистентність			
		Лактобацили		Лактококи	
		24 год	48 год	24 год	48 год
Кларитриміцин	2,5	-	-	-	-
	5	-	±	-	±
	7,5	±	+	±	±
	10	±	+	±	+
Азитроміцин	2,5	±	±	±	±
	5	±	+	±	+
	7,5	+	+	+	+
	10	±	+	+	+
Тримоксазол	2,5	±	+	±	±
	5	+	+	±	±
	7,5	+	+	+	+
	10	+	+	+	+
Ципрофлоксацин	2,5	-	±	-	±
	5	±	±	±	±
	7,5	±	±	±	±
	10	±	+	±	+
Метронідазол	2,5	±	+	±	±
	5	±	+	±	+
	7,5	+	+	+	+
	10	±	+	±	+
Амоксицилін	2,5	±	±	±	±
	5	±	+	±	+
	7,5	+	+	+	+
	10	±	+	±	+

Примітки: - - повне інгібування росту культури; ± - часткове інгібування; + - відсутність інгібування.

Однією із видових ознак культури молочнокислої бактерії є дія на них антибіотиків з характерною для них реакцією. Антимікробну активність лактобактерій визначають методом дифузії в агарі при сумісному культивуванні з патогенами. Резистентність бактерій до антибіотиків визначають методами з використанням дисків насичених антибіотиками. Стимуляція імунітету у тварин при використанні пробіотиків здійснюється завдяки збільшенню рівня антитіл та збільшенню активності макрофагів. Усі ці види молочнокислих бактерій мають бактеріофаги. Вони всі суворо специфічні і тому завдяки явищу бактеріофагії можна диференціювати молочнокислі бактерії. Для ідентифікації видової приналежності використовують серологічні методи та реакцію преципітації. Межі використання різноманітних пробіотиків залежить від багатьох факторів, в тому числі і від видової приналежності патогенного мікроорганізму. Ці властивості пробіотичних штамів наведені в (табл. 2).

Таблиця 2

Антагоністична активність молочнокислих бактерій до щойно виділених клінічних штамів сальмонел і колибактерій.

Назва штамів	Діаметр зон затримки росту тест-культур, мм				
	S.typhimurium K	S.typhimurium O	S.gallinarum	E. coli K	E. coli O
<i>Lactobacillus plantarum 1</i>	11±0,0	11±0,3	10±0,3	10±0,0	12±0,0
<i>Lactobacillus brevis</i> Б-3	12±0,3	11±0,5	10±0,5	10±0,0	14±0,3
<i>Lactobacillus celloblosus</i> 58н	10±0,5	15±0,0	16±0,0	13±0,3	12±0,5
<i>Lactobacillus casei</i> 7	0	16±0,0	13±0,0	14±0,5	0
<i>Lactobacillus p/antarum</i> 1 н	12±0,5	11±0,8	12±0,3	12±0,0	13±0,0
<i>Lactobacillus/Jus fermentum</i> 50	0	14±0,3	0	12±0,0	13±0,0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 11	10±0,3	0	0	0	12±0,5
<i>Lactobacillus salivarius</i> 20н	0	0	0	11±0,0	12±0,6
<i>Streptococcus faeca/is</i> 48н	13,5±0,8	12,5±0,4	12±0,5	0	0
<i>Lactobacillus sp.</i>	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i> 8н	0	0	0	13±0,3	0
<i>Lactobacillus salivarius</i> 26с	0	0	0	0	11±0,0
<i>Lactobacillus plantarum</i> 25м	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i> 173а	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus fermentum</i> 15	0	0	0	0	12±0,8
<i>Streptococcus faecium</i> 14в	0	10±0,3	0	0	0
<i>Lactobacillus celloblosus</i> 20	16±1,0	15 ±0,5	0	16±0,3	14,5±0,8
<i>Lactobacillus cremoris</i> 21	0	0	0	0	11±0,3

Після досліджень стосовно ідентифікації культур *Lactobacillus* та встановлення їх типових видових ознаках штами *Lactobacillus* депонують, стабілізують стандартні фізіологічні властивості методом ліофільного висушування. Цей етап передбачає оптимізацію складових захисного середовища. На сьогодні відомі такі рецептури захисних середовищ: лактоза 20%, желатин 1% та полівініл піролідон [5,8]. Також важливим етапом збереження типових видових ознак є етап освіження культур клітин *Lactobacillus*. Велике значення для одержання культури *Lactobacillus* із типовими стабільними показниками при ліофілізації має оптимізація технологічних процесів висушування, а саме Т° (температура висушування), Р (глибина вакууму). Контроль клітин культури *Lactobacillus* перед закладанням на зберігання повинен складатись з кількісно-якісних показників (кількості життєздатних клітин, КУО) та типові культурально-морфологічні ознаки. Із

літературних даних відомо, що параметри етапу досушування при ліофілізації становить 22°C, тривалість 20 годин [5,6].

Проведений нами огляд літературних даних щодо культурально-морфологічних ознак, фізіологічних властивостей, а також можливих умов зберігання у колекціях штамів *Lactobacillus* у ліофільно висушеному стані спонукає нас в наступних дослідженнях на розробку підходів з оптимізації умов довготермінового зберігання виробничих штамів лактобактерій у колекціях.

Висновки. 1. Проведений огляд літератури свідчить про те, що на сьогодні не відпрацьована система підходу щодо факторів впливу на ефективність довготермінового зберігання *Lactobacillus* в колекціях.

2. Встановлено, що в подальшому слід звертати увагу в дослідженнях на критичні етапи процесу довготермінового зберігання штамів *Lactobacillus* у колекції НЦШМ ДНК ІБШМ.

3. Враховуючи багатофакторність впливів на збереження життєздатності клітин *Lactobacillus* при довготерміновому зберіганні необхідно оптимізувати цей процес.

1. В. С. Шевелуха. Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: «Высшая школа», 1998. – С. 2-11.

2. Н. Н. Гаврилова, И. А. Ратникова, К. Баякышова, Л. И. Захаренко Создание ассоциации из молочнокислых и пропионовокислых бактерий, активной в отношении возбудителей колибактериоза и сальмонеллеза // Биотехнология, 2005, № 2. С. 26-32.

3. Н. А. Красильников Определитель бактерий и актиномицетов Издательство академии наук СССР Москва-Ленинград, 1949, 270 с.

4. Г. И. Новик, А. А. Самарцев, Е. Ф. Конопля, Л. Г. Борткевич Получение нового продукта Бифибак и изучение его влияния на продукцию цитокинов // Биотехнология, 2008, № 1. – С. 64-71.

5. Е. П. Рыжкова, ХАО ЛИ, Т. В. Быковченко, И. В. Данилова, Р. Д. Поландова Микробиологическая защита с использованием трофической цепи *Lactobacillus delbrueskii* и *Propionibacterium fruedenreichii* Биотехнология, 2009, № 2. – С. 29-36.

6. Б. И. Бланков, Д. Л. Клебанов Применение лиофилизации в микробиологии. – М.: Государственное издательство медицинской литературы Медгиз, 1961, 268 с.

7. Н. С. Егоров Основы учения об антибиотиках. – М.: «Высшая школа», 1986, 368 с.

8. А. Д. Васин, Н. К. Ковалевская Изготовление, контроль и применение некоторых биологически активных препаратов в животноводстве и ветеринарии (Методическое пособие), 1983, 15 с.

9. Pepe, O. ore-producing of *Bacillus* spp. from wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacterial / O. Pepe, G. Blaiotla, G. Moschetti, T. Greco, F. Villiani // App. Environ. Microbiol. – 2003. – V. 69. – N. 4. – P. 2321-2329.

10. Tone-Shimokava, Y. Toida T., Kovashima T. // G. Bacterial – 1996. – V. 178. – P. 300-320.

11. Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. Учебник. – М: МГУ, 1994, – 512 с.

12. Новик Г. И. Получение нового продукта Бифибак и изучение его влияния на продукцию цитокинов // Микробиология 1998. – Т. 67. – №3. –С.376-383.

ДЛИТЕЛЬНОЕ ХРАНЕНИЕ ШТАММОВ ГРУППЫ *LACTOBACILLUS* В КОЛЛЕКЦИИ НЦШМ ГНКИБШМ / Р. С. Максимчук

*Представлен обзор данных литературы по вопросу культурально-морфологических, биохимических и других биологических свойств лактобактерий. Охарактеризован биотехнологический процесс длительного хранения производственных штаммов лактобактерий в коллекции НЦШМ ГНКИБШМ. Показано, что актуальным направлением будущих исследований является оптимизация процесса лиофилизации, подбора условий повышения стабильности на протяжении всего срока хранения и разработка метода восстановления основных видовых свойств *Lactobacillus* после длительного хранения.*

*Ключевые слова: *Lactobacillus*, штаммы, биотехнология, оптимизация, процесс длительного хранения, пробиотики.*

LONG-TERM STORAGE OF GROUP OF *LACTOBACILLUS* STRAINS IN THE COLLECTION OF SSCIBSM / R. S. Maksymchuk

*There are literature overview about *Lactobacillus* biological properties, cultural and morphological, biochemical and other features. The biotechnological process of long-term storage of *Lactobacillus* strains in the collection of NCSM SSCIBSM is described. This article shows actual direction for future researches as optimization of freeze-drying process, selection condition for higher of stability during all process of storage, elaboration of the method of renewal of basic properties of *Lactobacillus* after long-term storage.*

*Key words: *Lactobacillus*, strains, biotechnology, optimization, process of long-term storage, probiotics.*

Рецензент – кандидат біологічних наук Л. І. Акименко