

УДК 636.09:006.07:579.864

Л. І. АКІМЕНКО кандидат біологічних наук

В. О. УШКАЛОВ доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН України

В. О. ПОСТОЄНКО доктор сільськогосподарських наук, старший науковий співробітник*

Р. С. МАКСИМЧУК, аспірант

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

**Інститут ветеринарної медицини НААН України, м. Київ*

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ВИДУ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

*У статті наведено основні підходи, нормативні документи, методи для розробки стандартної операційної процедури щодо ідентифікації мікроорганізмів виду *Lactobacillus acidophilus*, стабілізації і стандартизації біотехнологічних показників виробничих штамів з метою контролювання якості препаратів.*

*Ключові слова: *Lactobacillus acidophilus*, ідентифікація, стандартизація.*

Розробка пробіотичних препаратів на основі молочнокислих бактерій для використання у ветеринарній медицині за визначенням ряду авторів [1] має певні труднощі пов'язані з недостатнім рівнем розвитку біотехнології для потреб агропромислового комплексу, відсутністю бази для наукових досліджень у дрібнотоварних виробників та доступністю штамів з промислових колекцій мікроорганізмів і створення на їх основі препаратів для ветеринарії та тваринництва, що не завжди є прийнятним.

Пробіотики на основі молочнокислих бактерій роду *LACTOBACILLUS* знайшли широке використання як в гуманній, так і у ветеринарній медицині. Аналіз продукції [1] провідних світових виробників пробіотиків дозволив визначити бактерії, які найбільш часто використовують (у порядку зменшення): *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis*. Загальноновизначеними тестами [1, 2, 3] для відбору штамів пробіотичних препаратів для тварин є: джерело виділення (від тварин); високий колонізаційний потенціал (адгезивність); резистентність до низьких значень рН, жовчних кислот; кислотоутворення, продукція антимікробних субстанцій (антагоністична активність, продукція перекису, лізоциму); стабільність характеристик в клінічному і технологічному планах; висока швидкість розмноження.

Збереження стабільних біотехнологічних характеристик виробничих штамів мікроорганізмів має важливе значення для колекційної роботи і гарантує якість отриманого продукту. Показано [4], що адаптація молочнокислих бактерій до несприятливих умов – вичерпання джерел живлення, надкритичної клітинної щільності популяції або дії антибіотиків – включає: утворення цистоподібних

клітин (ЦПК), що знаходяться у спокої, призначених для переживання і збереження виду; реалізацію внутрішньопопуляційної фенотипової варіабельної, що проявляється при розсіванні ЦПК на щільні середовища розвитком колоній недомінантного типу. Іркітова А. М. [3] показала, що на збільшення біомаси і антагоністичну активність

L. acidophilus по відношенню до штамів тест-культури *E. coli* впливають такі екологічні чинники, як аеробні і анаеробні умови, активна кислотність середовища і наявність молочної кислоти в культуральній рідині. У анаеробних умовах антагоністична активність досліджуваних штамів *L. acidophilus* підвищується в порівнянні з аеробними умовами.

У зв'язку з вимогами до виробничих штамів, які повинні відповідати паспортним характеристикам, без змін основних показників у процесі довготермінового їх зберігання в колекції виникають завдання створення оптимальних умов, які забезпечують стабільність біотехнологічних показників. Стандарти встановлюють критерії, які забезпечують якість проведення робіт по ідентифікації бактерій роду *LACTOBACILLUS* [6, 7]. Підтримання їх життєздатності та активності на визначеному рівні передбачає розробку документально оформлених поетапних дій (8).

Мета роботи – вибір показників для розробки стандартної операційної процедури (СОП) в НЦШМ для контролювання паспортних характеристик і поглибленого наукового опису виробничих штамів роду *Lactobacillus acidophilus*.

Матеріали і методи досліджень. Перевірку життєздатності ліофілізованих культур після визначеного у паспорті терміну зберігання здійснювали методом десятиразових розведень з наступним висівом у рідкі поживні середовища (капустяне, знежирене молоко) та на чашки Петрі з агаризованим середовищем MRS, середовище з гідролізованим молоком. Чашки культивували за температури 37°C протягом 2 діб. Чистоту культур перевіряли згідно з ДСТУ 4483. Відповідність властивостей штамів паспортним характеристикам визначали за наступними показниками: культурально-морфологічні, фізіолого-біохімічні з використанням середовищ Гіса, генетичні особливості штаму (стійкість до антибіотиків) згідно з МУК 4.2.1890-04 [9], активність штаму – титровану кислотність за Тернером згідно з МУК 4.2.2602-10 [10].

Результати досліджень та їх обговорення. В Україні зареєстровано препарати [11] для виробництва яких використовують штами *Lactobacillus acidophilus*. Зберігаються колекційні зразки у ліофілізованому стані за температури +8°C. При перевірці властивостей штамів мікроорганізмів на відповідність паспортним характеристикам встановлено, що це дрібні нерухомі палички, розташовані поодинокі, утворюють колонії у вигляді шматочків вати при культивуванні у агарі з гідролізованим молоком, дріжджовим екстрактом і глюкозою. Спори не утворюють. Оптимальна температура росту 37°C. Добре росли на поживному середовищі MRS. Грампозитивні. Факультативні анаероби. Колонії на агаризованих середовищах опуклі з цілним краєм, непрозорі і непігментовані. Вивчення фізіолого-біохімічних властивостей показало, що штами *Lactobacillus acidophilus* активно засвоювали лактозу, галактозу, мальтозу, манозу; не ферментували маніт, рафінозу, арабінозу, стійкі до 0.4-0.5 % фенолу. Титрована кислотність через 24 год культивування 260⁰-360⁰Г. Що стосується генетичних особливостей штаму, то лише один з них характеризувався стійкістю до фталозолу і

синтоміцину. Досліджувані штами відповідали паспортним характеристикам, але багато показників, які необхідні для характеристики штамів *Lactobacillus acidophilus* були відсутні. Опис родових ознак за визначником бактерій Берджі [12] включає такі характеристики: клітини паличковидні, правильної форми, 0.5-1.2 x 1.0-10.0 мкм. Грампозитивні, спор не утворюють. Факультативні анаероби, інколи мікроаерофіли, слабкий ріст на повітрі. Ріст звичайно стимулюється додаванням 5% CO₂. Колонії на агаризованих середовищах діаметром 2-5 мм, випуклі, з цільним краєм, непрозорі, непігментовані. Хемоорганотрофи, потребують збагачених середовищ для культивування. Метаболізм бродильного типу. Нітрат не відновлюють, желатину не розріджують, каталазонегативні, цитохромів немає. Оптимальна температура росту 30- 40⁰ С. Типовий вид *Lactobacillus delbrueckii*. Опис характеристик закінчується зауваженням про те, що для ідентифікації видів цього обширного роду необхідна спеціальна підготовка співробітника, тому що багато тестових реакцій слабо виражені і залежать від складу середовища та умов культивування. В тому випадку, коли штам уже давно використовується для виготовлення пробіотичних препаратів, його ефективність, безпечність і технологічність не потребує підтвердження. Але при дослідженні перспективних штамів необхідним вважається поглиблений науковий опис. Квасніковим Е.І. з співавт. зазначаються показники, які необхідно використовувати для ідентифікації *Lactobacillus acidophilus*: наявність гранул (-), ріст за 15⁰ С (-), ріст за 45⁰ С (+), кислоти в молоці, % – (0.3-1.9), конфігурація молочної кислоти – (DL), утворення NH₃ з аргініну, гідроліз ескуліну (+), серологічна група (X), потреба у факторах росту – рибофлавін (+), піридоксал (-), вітамін В₁₂ (+), тимідин (-), фолієва кислота (+), вміст Г+Ц в ДНК – 36.7+0.7. Банникова Л.А. [14] для характеристики *Lactobacillus acidophilus* пропонує використовувати показники: ріст в гідролізованому молоці з 2% NaCl (+), ріст в гідролізованому молоці з 4% NaCl (-), ріст в гідролізованому молоці з 6% NaCl (-), ріст в гідролізованому молоці з 20% жовчі (+), ріст в гідролізованому молоці з 40% жовчі (+), ріст в м'ясопептонному бульйоні за рН 8.3 (+), ріст в молоці з 0.4 0% фенолу (+), нагрівання за температури 60⁰С впродовж 90 хв (-), нагрівання за температури 65⁰С впродовж 30 хв (-), відношення до лакмусового молока – відновлює, звертає, межа кислотоутворення, Т⁰ – 200-300, активність кислотоутворення, год- 4-5, зброджування арабінози(-), глюкози(+), лактози(+), сахарози (+), мальтози(+), рафінози(-), маніту (-), саліцину (-) **(ПРИМІТКА: (+) – позитивний результат, (-) – негативний результат, (+) – можливий і позитивний і негативний результат)**

За визначенням ряду авторів [15,16] важливими на сьогодні є молекулярно-генетичні методи дослідження щодо видової ідентифікації пробіотичних штамів. На сучасному етапі основні вимоги щодо пробіотичних штамів мікроорганізмів, що використовуються при виготовленні кормових добавок для тварин, передбачають авторизацію штаму – ретельну таксономічну ідентифікацію на рівні роду, виду і штаму в порівнянні з референс-штамом [17]. Паспортизація включає такі показники: фенотипові і біохімічні тести (АРІ – тест-система), генотипування методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) по фрагментам гену 16 S рРНК, або методом ДНК-ДНК гібридизації, характеристику плазмідних профілів, відсутність факторів патогенності (адгезивність, інвазивність, вірулентність) і

токсичності (і цитотоксичності) в тестах *in vitro* та *in vivo*, ПЛР-обґрунтовані докази відсутності токсигенного і вірулентного потенціалу, спектр біологічно активних метаболітів, стійкості до антибіотиків. Наступним кроком при реєстрації новоствореного препарату є депонування виробничого штаму у депозитарії, тому паспортні характеристики повинні відповідати міжнародним вимогам і включати достатню кількість інформації.

Висновки. 1. Виробничі штами *Lactobacillus acidophilus*, що зберігаються в колекції ДНКІБШМ відповідають вказаним паспортним характеристикам, але потребують поглибленого наукового опису. 2. Умови зберігання виробничих штамів в НЦШМУ забезпечують їх життєздатність і стабільність визначених у паспортах біотехнологічних показників. 3. У наступних дослідженнях необхідно відпрацювати підхід до оптимізації параметрів довготермінового зберігання лактобацил у колекції та провести поглиблений науковий опис цих штамів.

Список використаної літератури

1. О создании коллекции промышленных штаммов молочнокислых микроорганизмов с целью использования в инновационных разработках // Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»). – Режим доступа : <http://www.vgnki.ru/news/2013/160/>. – Заглавие с экрана.
2. Панин А. Н. Пробиотики в животноводстве – состояние и перспективы / А. Н. Панин [и др.] // Ветеринария. – 2013. – № 3. – С. 3–9.
3. Лясковский Т. М. Оценка пробиотиков, согласно рекомендациям международных организаций (FAO/WHO) / Т. М. Лясковский, В. С. Подгорский // Микробиологічний журнал. – 2005. – Т.67, № 6. – С. 104–112.
4. Адаптация молочнокислых бактерий к неблагоприятным для роста условиям / А. Голод [и др.] // Микробиология. – 2009. – Т. 78, № 3. – С. 317–327.
5. Иркитова А. Н. Эколого-биологическая оценка штаммов *Lactobacillus acidophilus*, используемых в производстве пробиотических продуктов : автореф. дис. на соиск. ученой степени канд. биол. наук : спец. 03.02.03 «Микробиология» / А. Н. Иркитова. – Пермь, 2012. – 22 с.
6. ГОСТ 10444.11-89 Продукты харчові. Методи визначення молочнокислих мікроорганізмів.
7. ДСТУ ISO 9232/IDF 146:2012 Йогурт. Ідентифікація характерних мікроорганізмів (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* та *Streptococcus thermophilus*)
8. Стандартные операционные программы. – Режим доступа: http://www.usq.com.ua/news_vatt_2009_02_03.htm. – Заглавие с экрана.
9. МУК 4.2.1890-04.Чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания (Утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 04.03.2004).
10. МУК 4.2.2602-10 Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков : утв. Гл. гос. санитар. врачом РФ 21 апр. 2010 г.

11. Перелік ветеринарних імунобіологічних препаратів, що зареєстровані в Україні. – Спосіб доступу: <http://biocontrol.kiev.ua/files/spisok2.pdf>. – Назва з дисплею
12. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта [и др.]. – 9-е изд. – М. : Мир, 1997. – Т. 1. – С. 570, 574.
13. Квасников Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников, О. А. Нестеренко. – М. : Наука, 1975. – С. 116–117.
14. Банникова Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л. А. Банникова. – М. : Пищевая промышленность, 1975. – С. 22–23.
15. Ідентифікація пробіотичних штамів молочнокислих бактерій / Т. М. Ляковський [та ін.] // Мікробіологічний журнал. – 2008. – Т. 70, № 6. – С. 3–9.
16. Индикация и идентификация бактерий рода *Lactobacillus* с использованием полимеразной цепной реакции / А. Г. Точилина [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 2008. – № 3 – С. 69–73.
17. Современный подход к регуляции безопасности пробиотиков / А. Н. Панин [и др.] // Ветеринария. – 2011. – № 1 – С. 41–44.

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ПРОЦЕДУРИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКРООРГАНІЗМІВ ВИДА *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* / Л.И. Акименко, В.А. Ушкалов, В.А. Постоечко, Р.С. Максимчук

*В статье представлено основные подходы, нормативные документы, методы для разработки стандартной операционной процедуры для идентификации микроорганизмов вида *Lactobacillus acidophilus*, стабилизации и стандартизации биотехнологических показателей производственных штаммов с целью контроля качества препаратов.*

*Ключевые слова: *Lactobacillus acidophilus*, идентификація, стандартизація.*

STANDARDIZATION of MICROORGANISMS *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* PROCEDURE AUTHENTICATION / L. Akimenko, V. Ushkalov, V. Postoenko, R. Maksimtchuk.

*Basic approaches, normative documents, methodes are presented in the article for creation standard operating proced ure of authentication of microorganisms of type of *Lactobacillus acidophilus*, stabilizing and standardizations of biotechnological indexes of productive strains with the purpose of controlling of quality of preparations.*

*Keywords: *Lactobacillus acidophilus*, identification, standardization.*

Рецензент - кандидат біологічних наук **Н.А. Пархоменко**