УДК 636.09:602:579.842.1/.2

ГОЛОВКО А.М., д-р вет. наук, академік НААН
ГОРДІЄНКО О.І., канд. с.-г. наук, ст. наук. сп., e-mail: admin@biocontrol.com.ua
Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

АЛГОРИТМ РОЗРОБКИ ЗАГАЛЬНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ КАРТИ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ

Обґрунтовано значення біотехнологічної карти мікроорганізму для виробництва ветеринарних біологічних препаратів. Результатом створення біотехнологічної карти виробничих штамів у колекції є відображення характеристики стадій та маніпуляційних процедур, які впливають на стабільність характерних властивостей біологічного об’єкту.

Ключові слова: *біотехнологія, біотехнологічна карта, мікроорганізм, штам*

Вступ. Будь-який мікроорганізм є живою системою, яка дуже чутлива до змін в умовах перебування. На життєздатність бактеріальних клітин та коливання типових ознак впливає багато факторів, до яких належать: температура, світло, висушування, осмотичний тиск, променева та електрична енергії. Дія хімічних речовин на бактеріальну клітину обумовлюється позитивним та негативним хемотаксисом [1].

Фенотиповість мікроорганізму впливає на ступінь вірулентності, яка може значно коливатись при зміні умов, що пов’язані з маніпуляційними процедурами. До них належать фізичні, хімічні та біологічні чинники. Тобто ступінь вірулентності можна змінювати штучно, наприклад, культивувати мікроорганізми на однаковому за складом поживному середовищі тривалий час, додавати деякі хімічні речовини, що зменшує вірулентність мікробної клітини. Також зменшують вірулентність і біологічні фактори. Тобто на властивості штаму впливає низка біотехнологічних процесів, які характеризуються ланцюгом послідовних маніпуляційних процедур [2].

Виготовлення ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ) базується на основі використання біологічної складової – виробничого штаму. Ефективність виробництва ВІЗ передбачає необхідність достатньої інформації щодо біотехнологічної характеристики виробничого колекційного штаму [3]. Наявність такої інформації є необхідною під час масштабування технології виготовлення ВІЗ.

Тому для кожного виробничого колекційного штаму треба розробляти біотехнологічну карту, яка відображатиме послідовність та характеристику всіх стадій поводження із виробничими штамами, що зберігаються у колекції Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ) ДНКІБШМ [4, 5].

Мета роботи. Мета роботи полягає у розробленні загальної біотехнологічної карти виробничого штаму мікроорганізму. Завдання розробки такої карти виробничого штаму полягає у моніторингу, систематизації та обліку всіх маніпуляцій із виробничим штамом, що зберігається у колекції, та визначенні кількісно-якісних параметрів і характерних властивостей виробничого штаму.

Матеріали і методи досліджень. Загальну біотехнологічну карту створювали з урахуванням принципів біотехнології ВІЗ та аналізу нормативних документів щодо їх виробництва.

Результати досліджень та їх обговорення Біотехнологічна карта виробничого колекційного штаму повинна відображати оптимальний вплив маніпулятивних дій в лабораторних умовах під час визначення їх властивостей [5, 6].

Ми вважаємо, що моніторинг лабораторних процедур та складання біотехнологічних карт виробничих колекційних штамів усуватиме випадковість змін їх характерних властивостей.

Тому нами запропоновано загальну біотехнологічну карту для виробничих колекційних штамів НЦШМ ДНКІБШМ, наявність якої зменшить випадковість впливу лабораторних маніпуляцій.

Карта включає ряд маніпуляційних процедур:

– культивування – визначення складу поживного середовища, показників поживності та pH, температури, експозиції, терміну активної фази росту;

– освіження – обґрунтування методики й кількості освіжень у відповідності з терміном зберігання;

– біопроба – вибір методики проведення досліджень на лабораторних тваринах;

– ліофільне висушування – оптимізація складу захисного середовища та параметрів ліофілізації;

– мікроскопія – визначення морфологічних ознак виробничого штаму;

– ферментоліз цукрів Гіса – вивчення біохімічних властивостей виробничих штамів у колекції;

– визначення КУО – аналіз життєздатних властивостей виробничих штамів у колекції (рис. 1).

Якщо передбачені генетичні дослідження, то ця маніпуляційна процедура стосується визначення генетичної характеристики виробничих штамів.

Кожна з маніпуляційних процедур обумовлена впливом показників фізичних та хімічних факторів (температура, концентрація кисню, pH, склад середовищ культивування, накопичення, освіження, стимулятори росту, захисні середовища, осмотичний тиск та ін.).

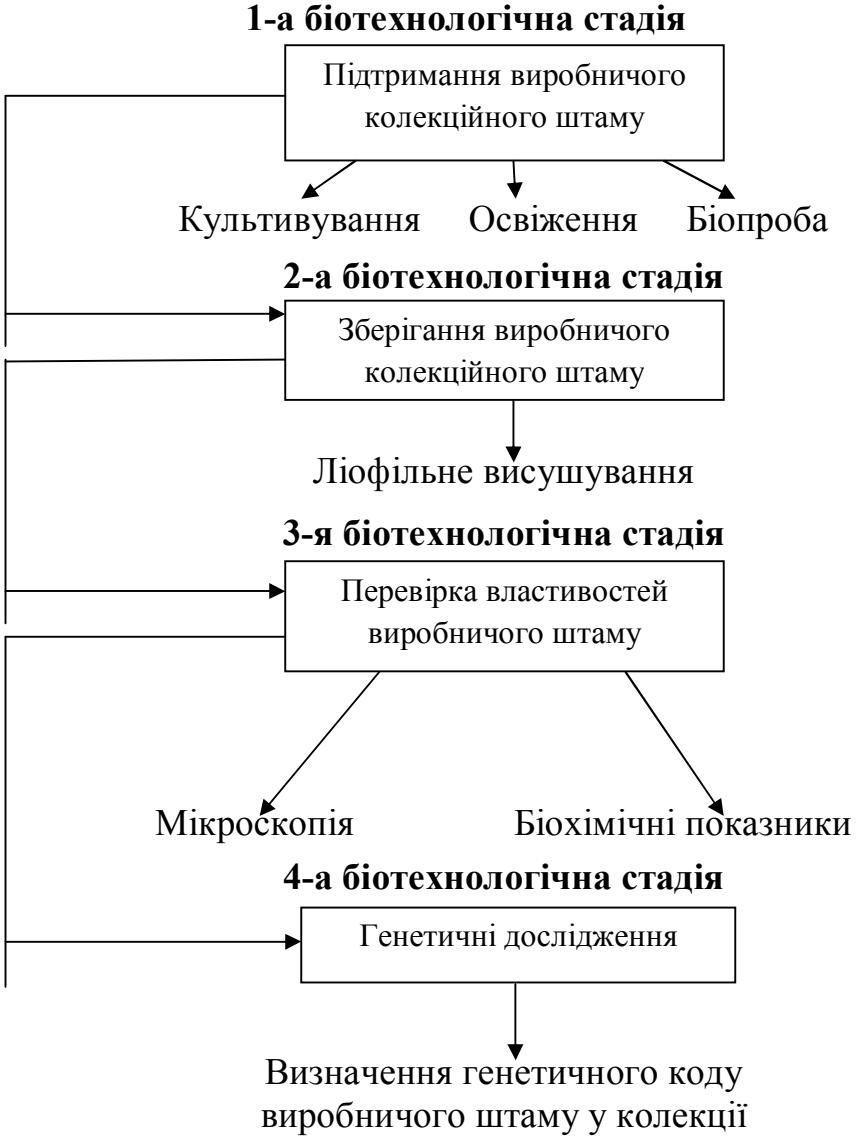

Рис. 1. Схема процедур лабораторних маніпуляцій для досліджень властивостей виробничого штаму у колекції НЦШМ ДНКІБШМ

Виробничі штами, що депонуються у колекції та згодом використовуються у виробництві вакцин, – це збудники захворювань тварин, що мають високу імуногенність, але не вірулентні, їх головною ознакою, яка повинна стабілізуватись біотехнологічними маніпуляціями при проведенні лабораторних досліджень є стабільність фізіологічних типових властивостей. Біотехнологічна карта штаму за змістом має бути відбитком біотехнологічних стадій та процедур з визначеними кількісно-якісними показниками всіх маніпулятивних заходів щодо підтримання характерних видових ознак виробничих штамів у колекції.

Нами проведено моніторинг та розроблено загальну біотехнологічну карту виробничого штаму, в якій наведено всі біотехнологічні стадії та маніпуляційні процедури (табл. 1).

Таблиця 1

Загальна біотехнологічна карта виробничого штаму колекції НЦШМ ДНКІБШМ

Назва штаму	Біотехнологічна стадія	Маніпуляційна процедура	Зазначення показників
	Підтримка виробничого штаму у колекції	Культивування виробничого штаму	Склад (назва), амінний азот, pH, інш.; Параметри культивування (об’єм, температура, експозиція активної фази росту)
		Освіження	Методика, кількість освіжень за терміном зберігання
		Біопроба	Облік результатів на тваринах
	Зберігання виробничого штаму у колекції	Ліофільне висушування	Склад захисного середовища, температура заморожування, термін заморожування, термін ліофілізації
	Перевірка на відповідність	Мікроскопія, ферментоліз цукрів Гіса, визначення концентрації живих клітин	Морфологія клітин, результат ферментолізу цукрів

Біотехнологія за визначенням характеризується багатовекторністю за приналежністю. Кожен вектор в свою чергу має розгалуженість напрямків. Так, одним із напрямів біотехнології у ветеринарній медицині є підтримання та зберігання штамів. В НЦШМ ДНКІБШМ зберігається близько 630 виробничих штамів мікроорганізмів, так ≈69 задепонованих штамів представляють ентерогрупу. Тому, як приклад, наводимо біотехнологічну карту виробничого штаму *E.coli O55*, що зберігається у нашій колекції (табл. 2).

У таблиці наведена послідовність біотехнологічних стадій поводження з виробничим штамом *E.coli O55.* Проаналізовані маніпуляційні процедури, наведені оптимальні показники та ознаки кожної з біотехнологічних стадій. Так, «підтримка» виробничого штаму *E.coli O55* у колекції НЦШМ ДНКІБШМ обумовлена маніпуляційною процедурою «культивування». Оптимальними показниками цієї процедури є використання агару *Endo* з вмістом амінного азоту 56 мг%, температурою культивування 37±0,1ºС та експозицією в межах 18–24 години. За дотримання цих умов накопичення бактеріальної маси відбувається найбільш оптимально.

Маніпуляційна процедура «освіження» передбачає проведення пересіву культури на оптимальних поживних середовищах не рідше, ніж 1 раз на 12 місяців.

Останньою маніпуляційною процедурою стадії «підтримка» є біопроба, суть якої полягає у зараженні виробничим штамом *E.coli O55* білих мишей, як найбільш сприйнятливої біологічної системи.

Таблиця 2

Біотехнологічна карта виробничого штаму *E.coli O55*

Назва штаму	Біотехнологічна стадія	Маніпуляційна процедура	Зазначення показників
E.coli O55	I.Підтримка	Культивування виробничого штаму	Агар Endo, 56 мг/% амінного азоту; температура культивування 37±0,1ºС; експозиція 18–24 год.
		Освіження	1 процедура на 12 місяців
		Біопроба	Білі миші, задовільна
	II.Зберігання	Ліофільне висушування	Середовища Файбіча, температура заморожування (мінус 63ºС); термін заморожування – 17 год.; термін ліофілізації – 24 год.; % клітин, що вижили – 70%
	III.Перевірка на відповідність характерних ознак	Мікроскопія,	Характерні клітини (фарбування за Грамом)
		Ферментоліз цукрів Гіса	Характерне ферментування
		Генетична характеристика	Підтверджена присутність стандартної послідовності амінокислот гену рРНК 16S

Стадія «Зберігання» передбачає маніпуляційні процедури, які забезпечують збереження властивостей штаму протягом тривалого часу. Для виробничого штаму *E.coli O55* такою процедурою є ліофільне висушування із застосуванням захисного середовища Файбіча. Оптимальний режим ліофільного висушування цього штаму передбачає заморожування за температури мінус 63°С протягом 17 годин, з наступним висушуванням протягом 24 годин. Результатом цієї процедури є збереження життєздатності 70% клітин у порівнянні з концентрацією нативного матеріалу до висушування.

Біотехнологічна стадія «перевірка на відповідність характерних ознак» передбачає послідовність маніпуляційних процедур з певними ознаками. Так, мікроскопія дає можливість контролювання морфологічних ознак клітини за умови фарбування за методом Грама. Ферментоліз цукрів Гіса дає можливість контролювати стабільність біохімічних властивостей штаму. Цією стадією передбачено також процедуру підтвердження генетичних характеристик штаму *E.coli O55*. Її результатом є підтвердження генетичного

коду мікроорганізму за присутністю стандартної послідовності амінокислот гену рРНК 16S, що являє собою «золотий стандарт» для бактеріальних клітин.

Результатом створення біотехнологічної карти виробничих штамів у колекції є відображення чіткої біотехнологічної характеристики стадій та маніпуляційних процедур, які впливають на стабільність характерних властивостей біологічного об’єкту.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Розроблено узагальнену схему біотехнологічних карт виробничих штамів, що зберігаються у колекції, яка дозволяє стандартизувати процес депонування мікроорганізмів у НЦШМ ДНКІБШМ.

2. Запропоновано біотехнологічну карту депонування виробничого штаму *E.coli O55,* яка ґрунтується на визначенні послідовності біотехнологічних стадій та оптимізації показників маніпуляційних процедур.

3. Властивості, що закладаються у біотехнологічну карту для кожного виробничого штаму, слугують рекомендаційною базою для виробників при масштабуванні технологій виробництва ВІЗ і розробки технологічних регламентів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Загоскина Н. В. Биотехнология теория и практика. / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина ; под редакцией Н. В.Загоскиной, Л. В. Назаренко. – М. : ОНИКС, 2009. – 115 с.

2. Биотехнология. В 8-ми кн. / Под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. – М. : Высшая школа, 1987. – Т. 3 : Клеточная инженерия / Р. Г. Бутенко, М. В. Гусев, А. Ф. Киркин и др. – 127 с.

3. Меликова Е. Н. Влияние высушивания на сохраняемость свойств дизентерийных бактерий (Автореферат) / Е. Н. Меликова // Вакцины и штаммы. – М., 1960. – Вып.1. – С. 189–190.

4. Головко А. М. Виробництво та контроль якості ветеринарних імунобіологічних препаратів в Україні / А. М. Головко, О. Є. Айшпур // Ветеринарна медицина України. – 2003. – № 8. – С. 19–20.

5. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк ; под ред. проф. Е. Н. Кондратьевой ; пер. с англ. канд. биол. наук Г. П. Мирошниченко, Т. Ю. Переслени. – М. : Мир, 1982. – 312 с.

6. Биотехнология [Текст] : учебник для высш. учеб. заведений / Ред. акад. РАСХН Е.С. Воронин. – СПб. : ГИОРД, 2005. – 792 с.

АЛГОРИТМ РАЗРАБОТКИ ОБЩЕЙ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ КАРТЫ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ / Головко А.Н., Гордиенко О.И.

Обосновано значение биотехнологической карты микроорганизма для производства ветеринарных биологических препаратов. Результатом создания биотехнологической карты производственных штаммов в коллекции есть отражение характеристики стадий и манипуляционных процедур, влияющих на стабильность свойств биологического объекта.

Ключевые слова: *биотехнология, биотехнологическая карта, микроорганизм, штамм*

AN ALGORITHM FOR THE DEVELOPMENT OF A GENERAL BIOTECHNOLOGICAL CARD FOR PRODUCTION STRAINS / Golovko A, Gordiienko O.

Introduction. *For each production collection strain a biotechnological card must be developed reflecting the sequence and characterization of all stages of handling the production strains stored at the collection of the National Centre of Strains of Microorganisms (NCSM) at SSCIBSM.*

Objective. *The purpose of this work was the development of a general biotechnological card for a production microorganism strain.*

Materials and methods. *The general biotechnological card was created taking into account the principles of biotechnology of immunological veterinary medicinal products (IVMPs) as well as the analysis of regulations for their production.*

Results and discussion. *A biotechnological card of a production collection strain should reflect the optimal effects of laboratory manipulations in determining their properties.*

We believe that the monitoring of laboratory procedures and creation of biotechnological cards of the production collection strains will eliminate accidental changes to their characteristic properties. Therefore, we propose a general biotechnological card for production collection strains of the NCSM SSCIBSM, the presence of which will reduce the probability of laboratory manipulations effects:

– *Culturing – handling procedures to determine the composition of the nutrient medium, nutrient and pH values, temperature, exposure period and the active growth phase period;*

– *Maintenance – handling procedures to determine the method of regeneration and number of subcultures due to expiration date;*

– *Bioassay – handling procedures relating to studies on laboratory animals;*

– *Freeze drying – handling procedures to determine the composition of a protective medium and parameters of lyophilization;*

– *Microscopy – handling procedure to determine the morphological characteristics of the production strain;*

– *Carbohydrate fermentation test on Hiss medium - handling procedures to determine the biochemical properties of production strains in the collection;*

– *Determining the CFU – handling procedures to determine the viability of the production strains in the collection.*

If genetic studies are required, then this handling procedure refers to the genetic characterization of a production strains.

Conclusions and prospects for further research:

1. The developed biotechnological cards for production strains stored at the collection will standardize the microorganism deposition process in NCSM SSCIBSM.

2. The clear biotechnological description that is included in the biotechnological cards for each production strain is a necessary guideline for manufacturers scaling technologies of IVMPs production and developing operating procedures.

3. An algorithm for the development of a generic biotechnological card for production strains stored in NCSM SSCIBSM was determined.

4. The proposed biotechnological card for a production strain will allow standardizing the biotechnological characteristics of a biological object.

Keywords*: biotechnology, biotechnological card, microorganism, strain*

References

1. Zagoskina N. V. Biotehnologija teorija i praktika. / N. V. Zagoskina, L. V. Nazarenko, E. A. Kalashnikova, E. A. Zhivuhina ; pod redakciej N. V.Zagoskinoj, L. V. Nazarenko. – M. : ONIKS, 2009. – 115 s.

2. Biotehnologija. V 8-mi kn. / Pod red. N. S. Egorova, V. D. Samuilova. – M. : Vysshaja shkola, 1987. – T. 3 : Kletochnaja inzhenerija / R. G. Butenko, M. V. Gusev, A. F. Kirkin i dr. – 127 s.

3. Melikova E. N. Vlijanie vysushivanija na sohranjaemost' svojstv dizenterijnyh bakterij (Avtoreferat) / E. N. Melikova // Vakciny i shtammy. – M., 1960. – Vyp.1. – S. 189-190.

4. Golovko A. M. Virobnictvo ta kontrol' jakosti veterinarnih imunobiologichnih preparativ v Ukraïni [Tekst] / A. M. Golovko, O. Є. Ajshpur // Veterinarna medicina Ukraïni. – 2003. – № 8. – S. 19-20.

5. Gottshalk G. Metabolizm bakterij / G. Gottshalk ; pod red. prof. E. N. Kondrat'evoj ; per. s angl. kand. biol. nauk G. P. Miroshnichenko, T. Ju. Peresleni. – M. : Mir, 1982. – 312 s.

6. Biotehnologija [Tekst] : uchebnik dlja vyssh. ucheb. zavedenij / Red. akad. RASHN E.S. Voronin. – SPb. : GIORD, 2005. – 792 s.

УДК 619:615.9:637

ГУСАК Л.М., e-mail: lgusak@bigmir.net
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи

АНАЛІЗ РАДІОАКТИВНОГО ЗАБРУДНЕННЯ ПРОДУКЦІЇ ТВАРИННИЦТВА І РОСЛИННИЦТВА В УКРАЇНІ ЗА ПЕРІОД 2012–2014 РР.

В статті наведено та проаналізовано результати радіологічних досліджень, отриманих державними лабораторіями ветеринарної медицини за період 2012–2014 рр. Встановлено наступне: продукція за питомою активністю ^{137}Cs та ^{90}Sr, за виключенням невеликого проценту зафіксованих перевищень, відповідає вимогам ДР-2006; значного зменшення кількості виявлених перевищень допустимих рівнів вмісту радіонуклідів ^{137}Cs та ^{90}Sr за період з 2012 по 2014 рік не спостерігалося.

Ключові слова: *радіологічний контроль, радіологічні дослідження, радіонукліди, продукція тваринництва та рослинництва.*

Вступ. Основними джерелами внутрішнього опромінювання людини в пізню фазу розвитку ядерної аварії є продукти харчування, що вироблені на забруднених територіях [1, 2]. Радіонуклідами, які визначають радіаційний стан на цей час, є цезій-137 і стронцій-90. Цезій-137 (хімічний аналог калію) бере участь у всіх реакціях обміну в рослинах та організмі тварини. Стронцій-90 (хімічний аналог кальцію) характеризується високою засвоюваністю рослинами і тваринами. Надходження цих радіоактивних елементів у продукти харчування відбувається, головним чином, у результаті їх переходу з ґрунту в рослини і далі – в продукцію рослинництва і тваринництва [3, 4].