

УДК 573.3.086.83:579.66

**УДОСКОНАЛЕННЯ ТЕХНОЛОГІЇ КУЛЬТИВУВАННЯ ВИРОБНИЧИХ ШТАМІВ *L. PLANTARUM* ТА *B. ADOLESCENTIS*, *STREPTOCOCCUS LACTIS* НА РІЗНИХ РОСТОВИХ СУБСТРАТАХ**

**Гужвинська С.О.**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

У науковій літературі та офіційних документах, що мають відношення до проблем збереження балансу нормальної мікрофлори в останні роки велика увага приділяється пробіотичним мікроорганізмам. Вони широко застосовуються в профілактиці та лікуванні багатьох дисфункцій здоров'я тварин [1, 2].

У біотехнологічному процесі створення лікувально-профілактичних пробіотиків велику увагу приділяють досягненню максимального рівня виходу біомаси життєздатних клітин бактерій та, відповідно, синтезованих ними біологічно активних речовин. При підборі штамів слід враховувати їх технологічність у виробничих умовах і стабільність при культивуванні з урахуванням збереження пробіотичних властивостей. Ці показники визначають продуктивність, конкурентоздатність і рентабельність технологічного процесу [3, 4, 5].

Для підвищення ефективності пробіотичних препаратів в останні роки приділяється увага використанню стимуляторів росту молочнокислих бактерій. Приводяться поодинокі дані відносно впливу лактулози, інуліну та аеросилу на ріст лактобактерій, відсутні відомості про вплив аеросилу на прояв молочнокислими бактеріями їх біологічних властивостей. Вивчення цих питань є актуальним, оскільки розкриває ще одну зі сторінок біотехнології такої важливої групи мікроорганізмів, як лактобактерії та біфідобактерії.

Метою досліджень було вивчення впливу аеросилу на ріст бактерій *L. plantarum*, *B. adolescentis* та *Str. lactis* при їх культивуванні.

**Матеріали та методи.** Об'єктом досліджень були штами: *Lactobacillus plantarum* 7-317, *Bifidobacterium adolescentis* 17-316, *Streptococcus lactis* 5.

Роботу з удосконалення технології культивування виробничих штамів *L. plantarum* та *B. adolescentis*, *Streptococcus lactis* на різних ростових субстратах проводили з додаванням аеросилу А-300. З цією метою готували зразки середовищ для культивування молочнокислих бактерій, до яких вносили аеросил А-300 в кінцевих концентраціях 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 % та 3,0 %. Після чого в середовища з аеросилом вносили молочнокислі бактерії в концентрації  $10^6$  КУО/см<sup>3</sup> і культивували за температури 37°С.

Вплив аеросилу на ростову активність молочнокислих культур оцінювали за допомогою показника відносного приросту біомаси мікроорганізмів за добовий період їх росту (X), та за показником стимуляції – відносний приріст бактерій у досліді і контролі ( ПС).

$$X = N_{24} / N_0,$$

де  $N_0$  – початкова концентрація клітин мікроорганізмів;  
 $N_{24}$  – кінцева концентрація клітин мікроорганізмів.

$$ПС = X_{\text{досл.}} / X_{\text{контр.}}$$

де ПС у контрольному середовищі приймали за одиницю.

$X_{\text{досл.}}$  – дослідне середовище;  
 $X_{\text{контр.}}$  – контрольне середовище без аеросилу.

Антагоністичну активність молочнокислих бактерій по відношенню до патогенної мікрофлори *E. coli* K 99, *S. aureus*, *Str. epidermidis*, *Salmonella Dublin*, *Ps. aeruginosa* визначали за методом Н. С. Єгорова (1997).

Активність штамів оцінювали за результатами сквашування знежиреного молока протягом 72 годин та здатністю кислотоутворення за методикою Л. А. Банникова (1987).

Кількість живих мікробних клітин визначали методом серійних розведень одержаної суспензії у фізіологічному розчині з наступним висівом культур бактерій по 0,1 см<sup>3</sup> із розведення  $10^6$  на середовище МРС-4.

**Результати досліджень.** Систему підтримання біологічних властивостей виробничих штамів молочнокислих бактерій на високому рівні та вдосконалення системи їх збереження ми розпочали з удосконалення середовища для їх вирощування.

Проведена робота з удосконалення технології культивування виробничих штамів *L. plantarum*, *B. adolescentis* та *Str. lactis* на ростових субстратах з додаванням аеросилу А-300, який здатний істотно стимулювати ростову активність і продукцію біологічно активних речовин деяких видів бактерій.

Були виготовлені зразки середовищ для культивування молочнокислих бактерій, до яких вносили аеросил А-300 у кінцевих концентраціях 0,5 %, 1,0 %, 1,5 %, 2,0 %, 2,5 % та 3,0 %. Після чого в середовища з аеросилом вносили молочнокислі бактерії в концентрації  $10^6$  КУО/см<sup>3</sup> і культивували за температури (37±0,5)°С (табл. 1).

**Таблиця 1** – Залежність ростових показників штамів бактерій *B. adolescentis* № 17-317 та *L. plantarum* № 7-316 від концентрації аеросилу в середовищі, (M±m)

Концентрація аеросилу в середовищі, %	<i>L. plantarum</i> № 7-316		<i>B. adolescentis</i> № 17-317	
	індекс стимуляції (IC)	pH	індекс стимуляції (IC)	pH
0,5	0,13±0,05	7,2	0,37±0,11	7,0
1,0	0,35±0,03	6,8	0,45±0,07	7,0
1,5	0,47±0,07	6,9	0,87±0,41	6,7
2,0	0,75±0,14	7,0	0,92±0,71	6,8
2,5	0,5±0,10	6,8	0,85±0,53	7,0
3,0	0,25±0,15	6,9	0,25±0,10	7,2
Контроль	1,0	7,2	1,0	7,2

**Примітка:** IC =  $X_{\text{досл.}} / X_{\text{контр.}}$  де  $X_{\text{досл.}}$  і  $X_{\text{контр.}}$  - відносний приріст чисельності бактерій у досліді та контролі

## **Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів**

Отримані результати показали, що найбільш оптимальною для росту бактерій концентрацією аеросилу в середовищі є 2,0 %. За 24 години росту кількість бактеріальних клітин збільшилась і склала  $1,9-4,1 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>.

Наступним етапом роботи було виготовлено дослідне середовище з аеросилом (2 %) для культивування лактобактерій та біфідобактерій.

Дослідження показали, що відносний приріст чисельності клітин, за яким ми оцінювали дію аеросилу на ріст, склав у *L. plantarum* № 7-316 ( $80,4 \pm 13$ ), що на 19 % вище за показники контролю, у *B. adolescentis* № 17-317 – ( $79,3 \pm 12,5$ ) і перевищував на 21 % дані контролю.

Якщо прийняти індекс стимуляції росту бактерій у середовищі без сорбенту за одиницю, то при оптимальній концентрації внесеного в середовище аеросилу (2,0 %) він виявився максимальним і склав  $0,75 \pm 0,14$  для *L. plantarum* № 7-316 і  $0,92 \pm 0,71$  – для *B. adolescentis* № 17-317 (табл. 2)

**Таблиця 2 – Вплив 2 % аеросилу на ріст лактобактерій та біфідобактерій, (M±m)**

Середовище культивування	<i>L. plantarum</i> № 7-316			<i>B. adolescentis</i> № 17-317		
	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	Відносний приріст клітин (X)	pH середовища	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	Відносний приріст клітин (X)	pH середовища
Дослідне середовище з аеросилом (2,0%)	1,9±0,30	80,4±13	7,0±0,2	4,1±0,15	79,3±12,5	7,0±0,2
Контроль	1,1±0,55x	65,1±11	7,2±0,2	2,4±0,31	65,2±11	7,2±0,2

**Примітка:**  $X = N_{24} / N_0$ , де  $N_0$  і  $N_{24}$  – початкова і кінцева (через 24 години росту) концентрації клітин мікроорганізму

При використанні препаратів з живих мікроорганізмів для лікування дисбактеріозів головне їх призначення щодо відновлення складу мікрофлори кишечника виконується тією незначною частиною клітин бактерій, яка зосереджена на його слизовій оболонці. Як правило, при внесенні у кишечник ліофільно висушених пробіотичних препаратів тільки 10 % бактеріальних клітин прикріплюється на його поверхні, колонізуючи слизову оболонку, а решта кількість клітин виводиться зовні. Тому одне з основних завдань, яке виникає при розробці ефективних пробіотиків є досягнення максимальної кількості живих клітин у 1 дозі препарату. Встановлена пряма залежність між числом мікробних клітин молочнокислих бактерій, які потрапляють до організму, та ступенем їх адгезії до слизової оболонки кишечника. Отримані нами результати дозволили зробити висновок про біосумісність пробіотичних штамів молочнокислих бактерій та аеросилу А-300. Тому, на нашу думку, цей сорбент є перспективним для створення ефективних комплексних препаратів. У комбінованому препараті, який буде включати і пробіотик і сорбент, досить значна частина клітин бактерій може адсорбуватися на сорбенті, утворюючи більшу площу дотику зі слизовою оболонкою, і таким чином підсилювати колонізаційну резистентність останньої.

Дослідження антагоністичної активності пробіотичних штамів бактерій показало, що їх здатність пригнічувати розвиток умовно патогенної мікрофлори стабільно зберігається з аеросилом. Встановлено, що штами молочнокислих бактерій інтенсивно росли і накопичували біомасу на поживному середовищі, в яке вносили аеросил у концентрації 2 % (табл. 3).

**Таблиця 3 – Антагоністична властивість молочнокислих бактерій, що культивувалися у середовищі з 2 % аеросилом**

Бактерії	Зона затримки росту тест-культур, мм				
	<i>E. coli</i> K 99	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Salmonella dublin</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
<b>дослідне середовище</b>					
<i>L. plantarum</i> № 7-316	17	21	9	19	0
<i>B. adolescentis</i> № 17-317	11	12	11	10	0
<i>Str. lactis</i> 5	12	11	8	7	0
<b>контрольне середовище</b>					
<i>L. plantarum</i> № 7-316	15	20	18	17	0
<i>B. adolescentis</i> № 17-317	9	14	10	9	0
<i>Str. lactis</i> 5	7	8	10	7	0

Були проведені дослідження щодо впливу аеросилу на ріст та фізіологічну активність лактобактерій і біфідобактерій. Дослідження показали, що кількість мікробних клітин, вирощених на середовищах з аеросилом підвищувалась *L. plantarum* № 7-316 ( $1,9 \pm 0,30 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>) у порівнянні з контролем ( $1,1 \pm 0,55 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>), *B. adolescentis* № 17-317 ( $4,1 \pm 0,15 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>) контроль – ( $2,4 \pm 0,31 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>), *Str. lactis* 5 ( $1,7 \pm 0,41 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>), контроль ( $1,2 \pm 0,44 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>) і корелювала із показником кислотоутворення (табл. 4).

**Таблиця 4 – Вплив 2 % аеросилу на ріст і кислотоутворення лактобактерій та біфідобактерій, (M±m)**

Середовище культивування	<i>L. plantarum</i> № 7-316		<i>B. adolescentis</i> № 17-317		<i>Str. lactis</i> 5	
	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	Кислотоутворення, Т°	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	Кислотоутворення, Т°	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см <sup>3</sup>	Кислотоутворення, Т°
Дослідне	1,9±0,30	115±30	4,1±0,15	145±20	1,7±0,41	117±21
Контрольне	1,1±0,55	105±20	2,4±0,31	115±17	1,2±0,44	104±17

Результати досліджень показали, що найбільш оптимальною для росту бактерій концентрацією аеросилу в середовищі є 2,0 %. За 24 години росту кількість молочнокислих та біфідобактерій збільшилась і склала  $1,9-4,1 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>.

**Висновки.** Удосконалена технологія культивування виробничих штамів *L. plantarum* та *B. adolescentis*, *Streptococcus lactis* на різних ростових субстратах з додаванням аеросилу А-300. Встановлено, що найбільш оптимальною для росту бактерій концентрацією аеросилу в середовищі є 2,0 %. За 24 години росту кількість бактеріальних клітин збільшилась і склала  $1,9-4,1 \times 10^6$  КУО/см<sup>3</sup>.

Список літератури

1. Банникова, Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности [Текст] / Л. А. Банникова // М.: Пищевая промышленность, 1975. – 256 с. 2. Егоров, Н.С. Микроби антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности [Текст] / Н.С. Егоров. - М.: «Высшая школа», 1965. – 211 с. 3. Коваленко, Н. К. Биотехнология культивирования молочнокислых бактерий [Текст] / Н. К. Коваленко // Молочная промышленность. – 2002. – № 2. – С. 24-25. 4. Янковський, Д. С. Микробная экология человека: современные возможности ее поддержания и восстановления [Текст] / Д. С. Янковський // К.: Эксперт ЛТД, 2005. – 362 с. 5. Ямборко, Г.В. Ефективність різних способів зберігання промислових штамів бактерій роду *Lactobacillus* [Текст] / Ямборко Г.В., Соловйова І.Л. // Мікробіологія і біотехнологія.-2007. – № 1. – С. 53-59.

**IMPROVEMENT OF CULTIVATION TECHNOLOGY OF PRODUCTION STRAINS *L. PLANTARUM* AND *B. ADOLESCENTIS*, *STREPTOCOCCUS LACTIS* ON DIFFERENT GROWTH SUBSTRATES**

**Guzhivins'ka S.O.**

*National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv*

*Data concerning the improvement of cultivation technology of production strains *L. plantarum*, *B. adolescentis* and *Streptococcus lactis* on growth substrates with adding of aerosile A-300 that stimulates growth activity and production of biologically active substances of certain bacteria are presented in the article.*

УДК 636.09:578.824:57.083:311.42

**ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДУ ELISA ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІРУСНЕЙТРАЛІЗУЮЧИХ АНТИТІЛ ДО ВІРУСУ СКАЗУ**

**Дрожже Ж.М.**

*Державний науково-дослідний інститут лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ*

Серологічний контроль ефективності антирабійних вакцинацій у домашніх м'ясоїдних швидко розвинувся в останнє десятиріччя в зв'язку з масовим введенням карантинних обмежень у країнах вільних від сказу. Скандинавські країни, Великобританія, країни Євросоюзу та Японія запровадили систему, основу на вакцинації собак і котів з подальшим визначенням титру віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу перед ввезенням на територію країни [1-3]. Виявлення та визначення титру антитіл також є одним із головних елементів оцінки ефективності проведення кампаній пероральної імунізації диких м'ясоїдних [4-7].

Методи дослідження антитіл до вірусу сказу значно удосконалились з моменту введення у вірусологічну практику реакції нейтралізації на білих мишах, що розроблена авторами методики Webster і Dawson ще в 1935 році [8, 9]. На заміну реакції нейтралізації на білих мишах для рутинної практики були запропоновані більш швидкі та дешеві варіанти реакції нейтралізації в культурі клітин – RFFIT (rapid fluorescent focus inhibition test), описаний Smith з колективом авторів в 1973 році та FAVN (fluorescent antibody virus neutralisation), описаний Cliquet з колективом авторів в 1998 році [8 - 10]. Ці методи залишаються референтними згідно вимог ВООЗ та МЕБ [8, 10].

Однак, з початку 80-х років минулого століття знаходить поширення ELISA метод визначення рівня антирабійних антитіл. Описано декілька імуноферментних тест-систем для визначення титру антитіл до вірусу сказу у сироватці крові людей, домашніх та диких м'ясоїдних [8, 9]. Перевага методу ELISA – його стандартність, швидкість та легкість у проведенні, а також відсутність необхідності використання живого вірусу сказу та культури клітин. Він також менш залежний від якості сироваток та проблем, пов'язаних із гемолізом, цитотоксичністю та бактерійною забрудненістю досліджуваних сироваток [9].

Основні характеристики методів дослідження антитіл до вірусу сказу подано у таблиці 1.

**Таблиця 1 – Основні характеристики методів дослідження антирабійних віруснейтралізуючих антитіл**

№ n/n	Показник	Метод		
		РН на білих мишах	РН в культурі клітин	ELISA
1	Час проведення, діб	14	3	0,2
2	Потреба у живому вірусі сказу	Так	Так	Ні
3	Потреба у спеціальному обладнанні	Ні	Так	Так
4	Вид тварин	Всі	Всі	Переважно м'ясоїдні
5	Вплив якості сироватки	Так	Так	Ні

**Мета дослідження:** валідація методу ELISA для визначення віруснейтралізуючих антитіл до вірусу сказу тест-системою Platelia Rabies Kit II в сироватках крові тварин, визначення його діагностичної чутливості та специфічності, кореляції титрів та граничних значень рівня антитіл.

**Матеріали та методи:** 472 зразки сироватки крові від м'ясоїдних тварин, надісланих в ДНДІЛДВСЕ для визначення рівня антитіл та отримання міжнародного сертифікату для перетину кордонів європейських країн, згідно наказів та розпоряджень Державного комітету ветеринарної медицини для визначення ефективності антирабійних вакцин, після проведення кампаній з пероральної вакцинації диких м'ясоїдних: 268 проб від собак, 98 проб від котів та 106 проб від лисиць.

Тест-система Platelia Rabies Kit II виробництва Bio-Rad, обладнання для проведення імуноферментного аналізу. Перещеплювала культури клітин нирки сирійського хом'яка – ВНК 21/13, тест-штам CVS вірусу сказу, позитивна та негативна референтна сироватка МЕБ до вірусу сказу, FITC-кон'югат (антирабійний моноклональний глобулін) виробництва FDI Diagnostics, Inc., інвертований люмінесцентний мікроскоп.