



УКРАЇНА

(19) UA (11) 94608 (13) C2

(51) МПК
C12Q 1/20 (2006.01)
G01N 33/48 (2006.01)МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОЇ АНТАГОНІСТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ПРОБІОТИКІВ

1

(21) a200814075
(22) 08.12.2008
(24) 25.05.2011
(46) 25.05.2011, Бюл.№ 10, 2011 р.
(72) РУДЕНКО ПАВЛО АНАТОЛІЙОВИЧ, РУДЕНКО АНДРІЙ АНАТОЛІЙОВИЧ, РУДЕНКО АНАТОЛІЙ ФЕДОРОВИЧ
(73) ЛУГАНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ АГРАРНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
(56) RU 2177152 C2, 20.12.2001.
RU 2333248 C1, 10.09.2008.
RU 2118364 C1, 27.08.1998.
RU 2350648 C1, 27.03.2009.
RU 2002102045 A, 10.09.2004.
RU 2328530 C1, 10.07.2008.
RU 2187801 C2, 20.08.2002.
RU 2177152 C2, 20.12.2001.
RU 2148639 C1, 10.05.2000.
RU 2149008 C1, 20.05.2000.
RU 2031937 C1, 27.03.1995.

2

RU 2148639 C1, 10.05.2000.
UA 22556 U, 25.04.2007.
UA 80934 C2, 12.11.2007.
(57) Спосіб визначення кількісної антагоністичної активності пробіотиків шляхом сумісного культивування пробіотичних штамів з тест-культурами патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів на поживному середовищі, який відрізняється тим, що застосовують метод серійного розведення пробіотичного штаму в середовищі МРС-2, що містить 66 г гідролізату знежиреного молока ферментативного сухого, який розчиняють у 0,5 л дистильованої води та з'єднують із 0,5 л розплавленого гелю, з наступним розливом у чашки Петрі, після затвердіння якого нашаровують м'ясо-пептонний агар, на який висівають тест-культури патогенної та умовно патогенної мікрофлори, та визначають мінімальну концентрацію пробіотичного мікроорганізму, що затримує ріст тест-культур.

Винахід належить до ветеринарної мікробіології та біотехнології, а саме до визначення антагоністичної активності молочнокислих бактерій з метою відбору виробничих штамів для виготовлення біопрепаратів.

Відомо, що одним із показників специфічної активності пробіотиків та виробничих штамів бактерій для їх виготовлення є наявність у них антагоністичної активності у відношенні патогенної та умовно патогенної мікрофлори.

Молочнокислі бактерії здатні пригнічувати ріст багатьох патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів за рахунок більш високого біологічного потенціалу, конкуренції за місця існування шляхом зміни рН середовища і довершеністю адгезивних властивостей, а також завдяки продукції токсичних для інших видів бактерій метаболітів.

Штами лактобактерій широко використовують в гуманній та ветеринарній медицині при створенні біологічних препаратів, які застосовують для лікування та профілактики багатьох інфекційних і гній-

но-запальних захворювань.

Антагоністичну активність пробіотиків і бактеріальних штамів визначають *in vitro* регламентованими способами, зокрема сумісним культивуванням з індикаторними штамами в рідкому або твердому поживному середовищі: метод агарових блочків за Єгоровим [Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. -М.: Высш. школа, 1979. - 455 с.]; метод сумісного культивування пробіотичних штамів з тест-культурами умовно патогенних та патогенних мікроорганізмів [Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник под ред. В.В. Меньшикова. -М.: Медицина, 1987. - С. 341-343.]

Прототипом винаходу є спосіб відстроченого антагонізму, що заснований на принципі сумісного культивування пробіотичних штамів з тест-культурами патогенних та умовно патогенних мікроорганізмів на поживному середовищі, коли висів тест-штамів на тверде поживне середовище проводиться через деякий час після висіву виробничої культури. Висів тест-штамів за які використовують

(13) C2

(11) 94608

(19) UA

патогенні та умовно патогенні культури ешерихій, стафілококів, протею та інших, проводять у вигляді перпендикулярних штрихів до культури пробіотика, що виріс. Антагоністична активність останньої кількісно характеризується величиною зони затримки росту кожного тест-штаму, що вимірюється в міліметрах [Способ контроля антагонистической активности препаратов для лечения и профилактики дисбактериозов RU 2177152 от 02.12.1999 г.].

Недоліком аналогів і прототипу є недостатня точність оцінювання контролю антагоністичної активності.

В основу винаходу поставлено задачу розробити більш точний спосіб визначення рівня антагоністичної активності молочнокислих мікроорганізмів.

Спосіб виконується наступним чином.

У стерильні флакони кількістю 10 шт. та об'ємом по 200 см³ за температури 45 °С наливають по 90 см³ МРС-2 в подвійній концентрації поживних речовин (66 г гідролізату знежиреного молока ферментативного сухого розчинюють у 0,5 л дистильованої води, з'єднують із 0,5 л розплавленого гелю, ретельно перемішують, фільтрують). Після цього у склянку з № 1 вносять 90 см³ накопиченої дводобової культури пробіотичного штаму у кінцевій концентрації 10 млрд. м. к.

Потім зі склянки № 1 90 см³ суміші вносять у флакон з № 2 і так далі для отримання серійних двократних розведень. В подальшому з кожного розведення відбирають по 20 см³ суміші поживного середовища з пробіотиком, заливають у чашки Петрі і ділять поверхню останньої на 20 секторів. Після затвердіння поживного середовища МРС-2 зверху нашаровують розплавлений та остиглий до 45 °С м'ясо-пептонний агар у кількості 20 см³. Після затвердіння останнього бактеріологічною петлею штрихом висівають тест-культури патогенної або умовно патогенної мікрофлори відповідно окремий вид мікроорганізму в окремий сектор чашки.

Після висіву чашки Петрі культивують в термостаті за температури 37 °С упродовж 18-24 годин і проводять оцінку результатів дослідження за визначенням мінімальної концентрації пробіотика, що затримує ріст тест-культур патогенних або умовно патогенних бактерій. Як контроль чисті культури патогенних та умовно патогенних бактерій висівають у чашку з МПА без додавання пробіотику.

Виготовлена за наступним способом оцінка антагоністичної активності пробіотиків була випробувана в лабораторії вивчення факторних інфекцій Луганського НАУ. Встановлено, що зазначений

спосіб може бути використаний для остаточного кількісного підбору дози виробничих штамів молочнокислих бактерій при виготовленні пробіотичних біопрепаратів.

Приклад 1. Готування розведень пробіотичного штаму *L. rhamnosus* № 26.

У стерильні флакони кількістю 10 шт. та об'ємом по 200 см³ за температури 45 °С наливали по 90 см³ МРС-2 в подвійній концентрації поживних речовин, зокрема брали 66 г гідролізату знежиреного молока ферментативного сухого, який розчинили у 0,5 л дистильованої води, з'єднали із 0,5 л розплавленого гелю, ретельно перемішали та фільтрували. Після цього у склянку з № 1 вносили 90 см³ накопиченої дводобової культури пробіотичного штаму у кінцевій концентрації 10 млрд. м. к.

Потім зі склянки № 1 вносили 90 см³ суміші у флакон з № 2 і так далі для отримання серійних двократних розведень. Таким чином ми отримали концентрацію пробіотичного штаму 5 млрд. м. к. у першому флаконі, 2,5 млрд. м. к. - у другому, 1,25 млрд. м. к. - у третьому, 625 млн. м. к. - у четвертому, 310 млн. м. к. - у п'ятому, 150 млн. м. к. - у шостому, 78 млн. м. к. - у сьомому, 39 млн. м. к. - у восьмому, 19 млн. м. к. - у дев'ятому та 9,5 млн. м. к. - у десятому.

В подальшому з кожного розведення відбирали по 20 см³ суміші поживного середовища з пробіотиком, заливали у чашки Петрі і ділили поверхню останньої на 20 секторів. Після затвердіння середовища МРС-2 зверху нашаровували розплавлений та остиглий до 45 °С м'ясо-пептонний агар у кількості 20 см³.

Приклад 2. Висів тест-культури та параметри культивування й урахування результатів.

Після затвердіння поверхні середовища бактеріологічною петлею штрихом висівали *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* та *S. uberis* відповідно окремий вид мікроорганізму в окремий сектор чашки.

Після висіву чашки Петрі культивували в термостаті за температури 37 °С упродовж 36-48 годин і проводили оцінку результатів дослідження за визначенням мінімальної концентрації *L. rhamnosus* № 26, що затримує ріст тест-культур мікроорганізмів. Як контроль чисті культури бактерій висівали у чашку з МПА без додавання *L. rhamnosus* № 26.

Встановили, що пробіотичний штам *L. rhamnosus* № 26 викликав повну затримку росту у *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* та *S. uberis* у мінімальних концентраціях, які відповідно дорівнювали $3,1 \cdot 10^8$, $3,9 \cdot 10^7$, $1,5 \cdot 10^8$ та $3,1 \cdot 10^8$ КУО.