



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **104983** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
C12N 1/20 (2006.01)
A61P 1/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2015 09290	(72) Винахідник(и): Козловська Ганна Володимирівна (UA), Ібатулліна Фльора Жаферівна (UA), Даниленко Світлана Григорівна (UA), Скибіцький Володимир Гурійович (UA), Постой Вікторія Вікторівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 28.09.2015	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.02.2016	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.02.2016, Бюл.№ 4	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041 (UA)

(54) ШТАМ BIFIDOBACTERIUM ADOLESCENTIS 26 ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ПРОБІОТИКІВ

(57) Реферат:

Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 для виготовлення пробіотиків первісно депонований та зберігається у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. Заболотного НАН України, за реєстраційним № IMB В 7485: родина *Bifidobacteriaceae*, рід *Bifidobacterium*, вид *Bifidobacterium adolescentis*.

UA 104983 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної мікробіології та біотехнології і може бути використана для виготовлення пробіотиків, що призначені для терапії та профілактики шлунково-кишкових захворювань у тварин.

Аналогом корисної моделі є (Патент № 69173А, опубл. 16.08.2004 р., бюл. № 8, штам *Bifidobacterium adolescentis*), ізолюваний з молока корів.

Недоліком аналога є те, що в нього не охарактеризовано антагонізм до ряду збудників шлунково-кишкових захворювань, зокрема *Yersinia enterocolitica*, не досліджено резистентність до жовчі, ряду сучасних антибіотиків.

В основу корисної моделі поставлено задачу виділити штам *Bifidobacterium adolescentis*, який має широкий спектр антагоністичної дії щодо розповсюджених збудників шлунково-кишкових захворювань у новонароджених та молодих тварин, зокрема до *Yersinia enterocolitica*.

Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 для виготовлення пробіотиків, первісно депонований та зберігається у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. Заболотного НАН України, за реєстраційним № IMB В 7485: родина *Bifidobacteriaceae*, рід *Bifidobacterium*, вид *Bifidobacterium adolescentis*.

Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 для виготовлення пробіотиків депонований 10.12.2014 р. за реєстраційним № IMB В 7485, характеризується наступними ознаками та властивостями:

1. Культуральні властивості. Анаероб. У напіврідкому середовищі утворює колонії у вигляді "цвяхів", "втягнутих веретень", зрідка "смуг". На поверхні МРС агару колонії у вигляді "дисків" та "гречаних зерен". Колонії непрозорі, випуклі розміром 3-5 мм.

2. Ферментативні властивості. Ферментує глюкозу, сахарозу, рафінозу, мелібіозу, фруктозу, лактозу, мелецитозу, рибозу, мальтозу, манніт. Виявляє варіабельне ферментування ксилози. Не розкладає целюлозу, гліцерин, арабінозу, трегалозу, сорбіт.

3. Антагоністичні властивості. Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 для виготовлення пробіотиків має виражену антагоністичну властивість щодо *Yersinia enterocolitica*, *E.coli*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Визначення антагоністичної активності штаму *Bifidobacterium adolescentis* 26 до *Yersinia enterocolitica*.

У чашки Петрі заливали по 15 см³ МПА, підсушували його у термостаті при 37 °С. Як тест-культури використали лабораторні та польові штами *Yersinia enterocolitica* (серотип О:3), *Yersinia enterocolitica* (серотип О:9), *Yersinia enterocolitica* (серотип О:8), *Yersinia enterocolitica* (серотип О:6,30). Добові культури тест-мікроорганізмів змивали з поверхні МПА фізрозчином і доводили густину бактеріальної суспензії до 10 млрд.м.кл./см³. Суспензії тест-культур вносили по 0,1 мл в чашки Петрі з МПА і розтирали шпателем по поверхні агару. Через 20-30 хв після посіву в агарі вирізали стерильною металевою трубкою лунки діаметром 6 мм на відстані 2 см від краю чашки (по 4 лунки в кожній чашці). В лунки вносили по 0,1 см³ 24-годинної мікробної культури.

Bifidobacterium adolescentis 26. Інкубували в термостаті 24 год. за температури 37 °С. Результат враховували через 24 години, при цьому визначали діаметр зони затримки росту тест-мікроорганізму навколо лунки. При відсутності ознак затримки росту, мікроорганізми вважали стійкими відносно досліджуваного штаму; в разі затримки росту до 15 мм - малочутливими; при затримці росту від 15 до 25 мм - чутливими.

Діаметр зон затримки росту становив:

Yersinia enterocolitica (серотип О:3) - 15±0,78

Yersinia enterocolitica (серотип О:9) - 23±0,76

Yersinia enterocolitica (серотип О:8) - 10±0,85

Yersinia enterocolitica (серотип О:6,30) - 19±0,64.

4. Штам має виражені адгезивні властивості. Визначений середній показник адгезії до еритроцитів крові телят та морської свинки (СПА) становить ≥ 5,0.

Визначення адгезивної активності штаму *Bifidobacterium adolescentis* 26 до еритроцитів крові великої рогатої худоби.

Кров відбирали у бичка 6-ти місячного віку з яремної вени. Еритроцити двічі відмили буферним розчином фосфату натрію (рН 7,2-7,3) шляхом центрифугування зі швидкістю 1000 об/хв. На вказаному буфері готували суспензію еритроцитів концентрацією 100 млн/см³. На предметне скло наносили краплю буферного розчину, в якому суспендували по одній краплі суміші еритроцитів та мікроорганізмів 1 млрд.м.кл./см³. Предметне скло з дослідним матеріалом поміщали у вологу камеру на 30 хв за температури 37 °С, потім препарат висушували при 37 °С, фіксували сумішшю спирт-ефіру та фарбували за методом Романовського-Гімзи. Препарати вивчали під світловим мікроскопом. Результати оцінювали, визначаючи середній показник

адгезії (СПА) - кількість мікроорганізмів, що прикріпилися до 1 еритроциту. Досліджували не менше 25 еритроцитів, враховуючи не більше 5 еритроцитів в 1 полі зору.

Адгезивність вважали нульовою при СПА від 0 до 1,0, низькою - при СПА від 1,01 до 2,0, середньою від 2,01 до 4,0, високою - більше 4,0.

5 Середній показник адгезії *Bifidobacterium adolescentis* 26 до еритроцитів крові великої рогатої худоби становив 5.

5. Резистентність до антибіотиків. Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 стійкий до левоміцетину, неоміцину, лінкоміцину, ципрофлоксацину, цефалексину чутливий до цефтриаксону, гентаміцину, тетрацикліну, стрептоміцину, амоксициліну, фурадоніну, азитроміцину. Стійкий до дії жовчі.

6. Патогенні властивості. Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 непатогенний для тварин, зокрема для білих мишей, морських свинок при внутрішньочеревному введенні 1 млрд.м.кл. та при згодовуванні вагітним щурам, не викликає будь-яких ознак захворювання при введенні через рот новонародженим телятам у дозі 10-15 млрд.м.кл.

15 7. Стабільність основних властивостей. У штаму *Bifidobacterium adolescentis* 26 не змінювались протягом 6-ти місяців зберігання у знежиреному молоці за температури +2 - + 4 °С культуральні, морфологічні, тинкторіальні, ферментативні, антагоністичні, адгезивні властивості, чутливість до антибіотиків, резистентність до жовчі. При періодичних пересівах на щільне живильне середовище ознаки дисоціації не виявлялись.

20 Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 ізолювано з фекалій клінічно здорового теляти, що належало до групи тварин, тривалий час благополучної відносно шлунково-кишкових захворювань.

Із фекалій (ректальні проби) готували 10-кратні розведення на стерильному 0,85 % NaCl. Суспензії перед висівом на живильні середовища ретельно перемішували. Живильні середовища (МРС, ГМ) розплавляли у водяній бані витримували упродовж (25±5) хв. (для вивільнення кисню), охолоджували до 47±1 °С, додавали суміш антибіотиків ННПЛ (розчин налідиксової кислоти, неоміцину, паромоміцину, літію хлористого) із розрахунку 0,1 см³ на 10 см³ середовища. Далі у пробірки з розплавленим поживним середовищем вносили по 1 см³ відібраних розведень ректального матеріалу. Після ретельного перемішування вміст пробірок охолоджували до кімнатної температури, після застигання середовища вносили розплавлений голодний агар з розрахунку, щоб висота його була не меншою за 20 мм. Паралельно здійснювали посів на ті ж щільні середовища у бактеріологічних чашках, інкубація проходила при 37 °С в анаеробних умовах (бактеріологічні чашки поміщали в анаеростат та за допомогою вакуумного насоса видаляли повітря).

35 Врахування результатів посіву здійснювали через 48 та 72 год. Типові для біфідобактерій колонії пересівали на аналогічне середовище та досліджували культуральні, морфологічні, тинкторіальні і ферментативні властивості ізолятів. В результаті ізолят № 26 (виділений з розведення 1:1000) був ідентифікований як *Bifidobacterium adolescentis*.

40 Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 для виготовлення пробіотиків зберігають на живильних середовищах (МРС, ГМ) за температури +2 - +4 °С. Пересів здійснюють на ті ж середовища через 35-40 діб. Збереження штаму до року здійснюють у ліофілізованому стані за використання під час ліофілізації захисного середовища (цукроза - 35,0, желатин - 4,0, вода - 61,0, рН 6,8).

45 Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 призначений для виготовлення пробіотиків, які застосовуються для терапії та профілактики дисбіотичних кишкових захворювань у тварин.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

50 Штам *Bifidobacterium adolescentis* 26 для виготовлення пробіотиків первісно депонований та зберігається у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології ім. Д. Заболотного НАН України, за реєстраційним № IMB В 7485: родина *Bifidobacteriaceae*, рід *Bifidobacterium*, вид *Bifidobacterium adolescentis*.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601