



УКРАЇНА

(19) UA (11) 2492 (13) U

(51) 7 C12N1/20, A61K35/74

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) ШТАМ БАКТЕРІЙ *ESCHERICHIA COLI* NM-2 ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ БАКТЕРІЙНИХ ПРЕПАРАТІВ

1

(21) 2003087259

(22) 01.08.2003

(24) 17.05.2004

(46) 17.05.2004, Бюл. № 5, 2004 р.

(72) Ралко Надія Михайлівна, Бубало Тетяна Олександрівна, Рубан Надія Михайлівна, Бубало Во-

2

лодимир Олександрович, Бубало Олександр Фе-
дорович

(73) Ралко Надія Михайлівна (UA)

(57) Штам *Escherichia coli* для виготовлення бакте-
рійних препаратів, депонований у Депозитарії Ін-
ституту мікробіології і вірусології НАН України під
номером IMB B-7049.

Корисна модель належить до мікробіології, конкретніше до штамів мікроорганізмів, утримування або консервування мікроорганізмів і може бути використаний для виробництва антагоністичних бактерійних препаратів, біологічно активних добавок, призначених для лікування дисбактеріозів та відновлення нормальної мікрофлори.

Дисбактеріози обумовлені порушеннями якісного і кількісного складу мікрофлори людського організму. Причинами виникнення дисбактеріозів можуть бути: тривале застосування антибіотиків й антисептиків; зниження місцевого і загального імунітету, викликаного радіотерапією, гормонотерапією; застосування імунодепресантів, інфекційні захворювання; неповноцінне і нерациональне харчування; несприятливі соціально-економічні та екологічні умови тощо. Для проведення активної профілактики та ефективної корекції порушеної мікробіологічної рівноваги одним з найбільш ефективних засобів корекції є пробіотики. Серед пробіотиків важливими є непатогенні живі бактерії виду *Escherichia coli*, а також бактерійні концентрати та більш складні композиції.

Відомий штам бактерій *Escherichia coli* M17, що є головним компонентом лікувального препарату "Колібактерин сухий" (див. інструкцію для медичного застосування препарату Колібактерин сухий (*Colibacterium siccum*), затверджену Головним державним санітарним лікарем України 7 лютого 2001р.). Колібактерин сухий призначають для лікування дорослих і дітей, починаючи з 6-місячного віку, а також при затяжному і хронічному перебігу дизентерії, післядизентерійному коліті, доплікованні реконвалесцентів після гострих кишечних інфекцій, при тривалій кишкової дисфункції невизначеної етіології, при неспецифічних і спе-

цифічних хронічних колітах і ентероколітах, при наявності дисфункцій і дисбактеріозу.

Проте, в описі до патенту Російської Федерації №2065875, МПК⁶ C12N1/20, A61K35/74, 1996 рік, стверджується, що штам *Escherichia coli* M17 протягом 50-ти років використовується для виробництва колібактерину.

Автори цього патенту вважають, що цей штам історично застарів, не адаптований до сучасних умов навколишнього середовища, має недостатню стійкість до дії фізико-хімічних факторів.

Відомі штами бактерій *Escherichia coli* 57 і *Escherichia coli* 103, що депоновані у Всеросійській колекції мікроорганізмів і мають реєстраційні номери ВКПМ В-7386 і ВКПМ В-7388 (патент Російської Федерації №2140450, МПК⁶ C12N1/20, C12P13/06, 1999 рік). Ці штами не мають істотних розходжень у культурально-морфологічних і фізіолого-біохімічних ознаках, одержані шляхом відбору мутантів, здатних до продукції L-лейцину, використовуючи як батьківський штам бактерії роду *Escherichia*, стійкі до лейцину.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є те, що штами з реєстраційними номерами ВКПМ В-7386 і ВКПМ В-7388 призначені для мікробіологічного виробництва L-лейцину і не можуть бути використані як пробіотики.

За прототип вибрано штам бактерій *Escherichia coli* ЛЗГМ N 18 депонований 8 червня 1992 року у Всесоюзній колекції промислових мікроорганізмів інституту "ВНИИ генетика" під №В-6240 (патент Російської Федерації №2065875, МПК⁶ C12N1/20, A61K35/74//C12N1/20, C12R1 19), 1996 рік). Штам *Escherichia coli* ЛЗГМ N 18 має усі властивості, характерні для сімейства

(13) U

(11) 2492

(19) UA

Enterobacteriaceae, роду *Escherichia* і є типовим представником виду *Escherichia coli* commune. Штам ЛЗГМ N 18 був виділений при плановому поглибленому медичному обстеженні здорової людини в бак лабораторії СЕС м. Пермі Російської Федерації. Це обумовлює властиву цьому штаму природну приживлюваність в організмі людини. Вихідний матеріал (випорожнення людини) розводили в пробірці фізіологічним розчином приблизно в 10 разів. Після відстоювання брали бактеріологічною петлею з поверхні краплю рідини і робили посів штрихом на 2 чашки Петрі з диференційно-діагностичним середовищем Ендо для одержання ізольованих колоній. Після доби росту при +37°C вибирали характерну за зовнішнім виглядом колонію (темно-червоний з металевим блиском) і використовували її для одержання чистої культури висівом на скошений м'ясо-пептонний агар. Потім визначили видову приналежність виділеного штаму за системою Тімаца. Виділений штам мав такі ознаки.

Культурально-морфологічні ознаки. Під мікроскопом - це короткі з округлими кінцями рухливі палички з розмірами 0,5×1,5μ, розташованими в мазку у вигляді окремих клітин або невеликих скупчень. Грамнегативні, спор не утворюють, капсули не мають. На повноцінному агаровому середовищі через 18-20 годин росту при температурі +37°C утворюють гладкі, круглі з рівними краями колонії діаметром 2,0-2,5мм. У рідкому повному середовищі (м'ясо-пептонний бульйон, казеїновий гідролізат) викликають рівномірне помутніння.

Біологічні ознаки. Штам не утилізує цитрат і малонат натрію, не утворює ацетон на середовищі Кларка, розкладає лактозу при +42°C, не продукує оксидазу. В органічному середовищі продукує індол, не утворює сірководень, не розкладає сечовину, не продукує фенілаланіндезаміназу. Штам не володіє желатиназною активністю, не ферментує лізин, розщеплює глюкозу, лактозу, маніт, сахарозу до кислоти і газу. Таким чином, штам ЛЗГМ N 18 є видотиповим за своїми біохімічними властивостями. Повна відповідність ознакам, що необхідні для кишкової палички, дала підставу для розгорнутої перевірки виділеного штаму за всіма характеристиками, необхідними для якісного виробничого штаму, а саме вивчення динаміки розвитку на рідкому і щільному живильному середовищах, антагоністична активність відносно супутньої умовно патогенної мікрофлори, наявність певного рівня стійкості до основних антибіотиків, чутливість до колицинів, стійкість до дії фізико-хімічних факторів (УФ опромінення, активний хлор), нешкідливість, тобто відсутність токсичності й антигенних показників, властивих умовно патогенним мікроорганізмам.

За твердженням авторів штам *Escherichia coli* ЛЗГМ-18 має високі репродуктивні властивості, високу антагоністичну активність у відношенні хвороботворних шигел Флекснера і Зонне, підвищену стійкість до 9 типів колицинів, абсолютно нечутливий до п'яти і має підвищену резистентність до інших антибіотиків, має підвищену стійкість до дії активного хлору й УФ опромінення.

Причинами, що перешкоджають одержанню потрібного технічного результату є істотна геогра-

фічна віддаленість від України місця створення прототипу і, відповідно, проблематичність ефективного використання штаму *Escherichia coli* ЛЗГМ-18 в Україні.

В основу корисної моделі поставлено задачу віднайти такий штам виду *Escherichia coli*, який здатний бути ефективним пробіотиком для регіонів України при лікуванні дисбактеріозів і хвороб, обумовлених порушеннями нормального балансу мікрофлори організму.

Поставлена задача вирішує штам *Escherichia coli* НМ-2 для виготовлення бактерійних препаратів.

Штам *Escherichia coli* НМ-2 ідентифіковано і вивчено авторами в лабораторії науково-методичного центру «Біокорекція» м.Київ, узвіз Протасів Яр. Штам *Escherichia coli* НМ-2 депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером ІМВ В-7049. Дата надходження 27 червня 2002 року. Штам ізолювано авторами із мікрофлори травного тракту людини.

Культурально-морфологічні та фізіолого-біохімічні особливості штаму. Грамнегативні рухливі палички розмірами 1,0-1,5х2,0-6,0мкм (живі клітини, Ендо, МПБ) або 0,6-0,8х1,0-1,2мкм, рідше 1,5мкм (фіксовані клітини, МПА) з грануляцією при фарбуванні по Граму, розміщуються по одному, парами, спор не утворюють. Факультативний анаероб. Колонії добре ростуть на простих живильних середовищах з пептоном та м'ясною водою. При вирощуванні на поверхні агаризованого середовища Ендо утворюють типові випуклі червоні гладенькі блискучі колонії 3-5мм у діаметрі з характерним металічним блиском. На МПА виростають білуваті круглі блискучі колонії з рівними краями діаметром 1,0-3,0мм. Колонії легко суспендуються у фізіологічному розчині. У бульйоні утворюють однорідну каламуть. Желатину не розріджують, містять каталазу. Утворюють індол, не продукують сірководень, не розщеплюють сечовину, оксидазонегативні. Молоко сквашують через 24 години росту, накопичуючи кислотність 60-80 градусів Тернера. Позитивна реакція з метиловим червоним. Оптимальний ріст при 37-38°C. Оптимальні для росту значення pH 7,0-7,6, граничні значення pH 4-9,0. Зброджують глюкозу з утворенням газу. Зброджують вуглеводи і спирти: глюкозу, лактозу, маніт, сорбіт, рамнозу. Не зброджують целобіозу.

Галузь використання штаму: харчова промисловість та медицина.

Продукти, що синтезує штам. Штам продукує молочну кислоту та колицини, які лізують патогенні бактерії, особливо лактозонегативні та гемолітичні *E. coli*.

Антагоністична активність. Зони пригнічення росту при визначенні методом дисків з культурою кишкової палички на газоні тест-культур складають 6-8мм.

Специфічна активність. Рівень адгезії (гістадгезії) клітин кишкових мікробів, зокрема *Escherichia coli* НМ-2, характеризує їх колонізаційну активність. Рівень адгезії визначали на свинчових кишечниках мишей за методом В.П. Жалко-Титаренко, В.М. Бондаренко, А.В. Григор'єва, Л.Г.

Купчинського. Метод складається з 9 окремих стадій:

готування мікробної суспензії;
передопераційної підготовки тварини;
евтаназія;
препарування кишечника, його канюлізація;
введення мікробної суспензії;
витримання при зниженій температурі;
відмивання;
триптична дезінтеграція;
посів.

Результати розраховували за формулою В.П.

Жалко-Титаренко:

$$C_{\max} = \frac{m \cdot V}{l \cdot a} m \cdot V$$

де: C_{\max} - рівень гістадгезії в кількостях КУО на мм^2 поверхні слизової,

m - концентрація мікробів в дезінтеграті,

V - об'єм дезінтеграту,

l - довжина екстірпованого відрізка кишки,

a - ширина екстірпованого відрізка кишки.

Гістадгезійна активність штаму залежить від концентрації *Escherichia coli* HM-2 в порожнині кишки - K , за співвідношенням:

$$C_{\max} = u \cdot K$$

де: u - коефіцієнт гістадгезії, що обчислюється за результатами дослідів за формулою:

$$u = \frac{C_{\max}}{K}$$

Специфічна, колонізаційна (гістадгезійна) активність штаму наведена в таблиці 1.

Таблиця 1

Гістадгезійна активність штаму *Escherichia coli* HM-2

Концентрація бактерій штаму в млн/мл	Рівень гістадгезії в КУО на кв.см слизової	Середнє значення коефіцієнту гістадгезії U
0,1	750±360	0,36±0,17
1,0	1530±765	
10,0	30400±1520	
100,0	67900±3380	

Для визначення конкурентноздатності штаму за сайти адгезії в кишечнику обчислено показник конкуренції порівняно з вірулентними шигелами Флекснера, що мають $U=0,03$. Показник конкуренції:

$$\frac{U(\text{штаму})}{U(\text{шигел})} = \frac{0,36}{0,03} = 12$$

Це означає, що за адгезивними властивостями штам *Escherichia coli* HM-2 перевищує збудника дизентерії у 12 разів.

Спосіб, умови та склад середовища для культивування штаму.

Штам культивують при 37°C протягом 24-48 годин на поверхні агаризованих середовищ або в рідких середовищах. Використовують середовища Ендо, МПА і МПБ, стерильне знежирене молоко, відновлене 10% знежирене молоко. Культуру пересівають раз на місяць.

Спосіб, умови та склад середовища для довгострокового зберігання штаму. Культуру вирощують при оптимальних умовах на МПА, МПБ. Зберігають при кімнатній або +4°C протягом 6 місяців у пробірках з корковими або гумовими пробками. Клітини можна сублімаційне висушувати після заморожування до -35°C і зберігати протягом 3-5 років. Для ліофілізації культуру вирощують протягом 24 годин на агаризованому середовищі і клітини суспендують у захисному середовищі. Захисне середовище:

сахароза 10%,
желатина 1%,
вода дистильована до 100%,
рН 7,0-7,2.

Культура добре зберігається протягом 1-2 років в МПБ з 10% гліцерину при -80°C.

Відомості про патогенність. Щоб підтвердити відсутність патогенної дії *Escherichia coli* HM-2 на

теплокровні лабораторні тварини для досліджень брали максимальні дози клітин. Визначали вірулентність суспензії активних клітин, а також інвазивність штаму шляхом дослідження взаємодії між макроорганізмом і мікроорганізмом. Перевірку патогенних властивостей штаму виконано з використанням безпородних білих мишей вагою 20±2г шляхом введення суспензій клітин перорально через зонд та внутрішньочеревинно в ін'єкціях. Нагляд за тваринами, які були протягом 15 діб адаптовані до умов утримання, проводили щоденно протягом 15-20 днів після ін'єкцій.

Для визначення вірулентності брали суспензії активних клітин, отриманих при культивуванні штаму в аеробних умовах протягом 24 годин на агаризованому живильному середовищі (МПА) при температурі 37±1°C. Суспензію готували на стерильному фізіологічному розчині, концентрацію клітин визначали за допомогою оптичного стандарту мутності та контролювали титруванням. Суспензію клітин вводили перорально через зонд та внутрішньочеревинно в ін'єкціях.

Інвазивність штаму визначали з урахуванням можливих природних шляхів надходження мікроорганізмів в макроорганізм, а саме по спроможності клітин проникати всередину тканин органів тварин після зараження *per os*. Мишам вводили одноразово активну культуру бактерій в максимальних дозах, які не призводять до загибелі тварин. Через 15-20 діб після зараження проводили мікроскопічні дослідження пофарбованих препаратів матеріалу та висіви на живильний агар (МПА, агар Ендо) зразків тканин внутрішніх органів тварин. У період спостереження після перорального введення суспензії живих клітин бактерій усі тварини були активними, добре поїдали корм, фізіологічні відправлення у них не порушувались, поведінкові

реакції були звичайними, змін з боку хутряного покриву не помічено. Клінічних ознак токсикозу не відмічено. Була відсутня достовірна різниця в масі тіла та температурі дослідних і контрольних тварин, а також в загальному стані та поведінці.

Внутрішньочеревинне введення концентрованої суспензії клітин в дозах $0,5 \cdot 10^9$, $1 \cdot 10^9$ та $5 \cdot 10^9$ клітин на мишу призводило до захворювання та падежу відповідно 20, 70 і 100% тварин на наступний день після ін'єкції. Результати досліджень наведено у таблиці. За результатами дослідження гострої токсичності було визначено для культури *Escherichia coli* HM-2 $LD_{50\text{в/ч}} = 0,77 \cdot 10^9$ клітин/мишу. Безспорові мікроорганізми вважаються не вірулентними, якщо $LD_{50\text{в/ч}}$ більше 10^6 клітин/мишу (Методические указания по гигиенической оценке микробных средств защиты растений от насекомых и болезней на основе неспорообразующих микроорганизмов. Киев, 1982. Методические указания по экспериментальному обоснованию ПДК микроорганизмов-продуцентов и содержащих их готовых форм препаратов в объектах производственной и окружающей среды М., 1991).

Мікробіологічні дослідження внутрішніх органів дослідних тварин через 19 діб після внутрішньочеревинного введення суспензії живих клітин культури показали, що даний штам не інвазивний, не дисемінує і не розмножується в організмі тепло-

кровних при пероральному введенні культури. Результати дослідження наведено у таблиці 2.

Отримані результати свідчать про авірулентність *Escherichia coli* HM-2 для досліджених теплокровних тварин ($LD_{50\text{в/ч}} = 0,77 \cdot 10^9$ клітин/мишу, $LD_{50\text{per os}} > 3 \cdot 10^9$ клітин/мишу).

Всі миші, що залишилися живими після закінчення терміну спостережень, і контрольні в тому числі, були абиті, проведено їх розтин і дослідження внутрішніх органів. Відсутність інфекційної патології і ознак ураження дослідних тварин було підтверджено при макроскопічному вивченні внутрішніх органів. Результати розтину показали:

серце звичайної форми і розміру;

легені в об'ємі не збільшені, долі легко відокремлюються одне від одного, поверхні гладенькі, спайок не відмічено;

шлунок, петлі тонкого і товстого кишечника зовні є звичайними, на розрізі малюнок слизової незмінний;

печінка темно-червоного кольору, нормальної консистенції, середнього кровонаповнення, не збільшена, поверхня гладенька;

нирки звичайних розмірів і форми, поверхні гладенькі;

селезінка не збільшена, консистенція туга, на розрізі пульпа помірно повнокровна і темного кольору.

Таблиця 2

Результати дослідження вірулентності штаму *Escherichia coli* HM-2*

Дослід: Матеріал для введення	Кількість мишей, штук	Доза		Шлях введення	Курс введення, діб	Кількість мишей		
		мл	млрд. клітин			Захворіло, штук	Загибло, штук	Вижило, штук
Суспензія активних 24-годинних клітин	10	0,5	0,5	в/ч	1	2	2	6
"	10	0,5	1,0	в/ч	1	7	7	3
"	10	0,5	5,0	в/ч	1	10	10	0
"	10	0,5	0,5	per os	3	0	0	10
"	10	0,5	1,0	per os	3	0	0	10
Контроль:								
Фізіологічний розчин	10	0,5	0	в/ч	1	0	0	10
"	10	0,5	0	per os	3	0	0	10

* Примітка: в/ч - внутрішньочеревинні ін'єкції, per os - введення в шлунок з допомогою зонда.

Отже, культура *Escherichia coli* HM-2 належить до групи авірулентних мікроорганізмів, не здатних до інвазії у внутрішні органи. Штам непатогенний.

Генетичні особливості штаму (ауксотрофність, резистентність до антибіотиків, фагів тощо): Штам не піддавався впливу мутагенних факторів. Резистентний до ампіциліну, офлоксацину, доксицикліну.

Далі наведено приклади використання штаму, що заявляється.

Приклад 1.

Виготовлення бактерійного препарату. Для накопичення біомаси мікроорганізмів виготовляли середовище культивування, основою якого є від-

новлене знежирене молоко, білки якого гідролізовані протосубтиліном, з додаванням лактози, лимоннокислого натрію, сірчанокислого заліза та стимуляторів росту. У підготовлене поживне середовище вносили посівний матеріал. Для виготовлення посівного матеріалу (інокуляту) бактерій *Escherichia coli* HM-2, 5% добової культури, що була вирощена у середовищі Ендо, додавали у виготовлене середовище культивування для накопичення біомаси. Культивування здійснювали протягом 36 годин при температурі $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Накопичену біомасу мікроорганізмів відокремлювали від культурального середовища на центрифугі. Одержану біомасу мікроорганізмів суспендували у сте-

рильному водному розчині захисного середовища, що містить 5% сухого знежиреного молока, 8% сахарози, 4,5% натрію лимоннокислого. Одержану таким чином суспензію заморожували в морозильній шафі при температурі мінус $(35 \pm 5)^\circ\text{C}$ і висушували в сублімаційній сушарці. Одержаний бактерійний препарат містив $5 \cdot 10^8$ КУО/г непатогенних бактерій *Escherichia coli* HM-2.

Приклад 2.

Виготовлення двохкомпонентного бактерійного препарату. Одержану за прикладом 1 біомасу непатогенних бактерій *Escherichia coli* HM-2 змішували у співвідношенні 4:1 з біомасою штаму непатогенних бактерій *Enterococcus faecium* HM-5, що був депонований у Депозитарії Інституту мікробіології і вірусології НАН України під номером IMB B-7029 26 червня 2002 року. Одержану суміш мікроорганізмів суспендували у стерильному водному розчині захисного середовища, що містить 5% сухого знежиреного молока, 8% сахарози, 4,5% натрію лимоннокислого. Одержану таким чином суспензію заморожували в морозильній шафі при

температурі мінус $(35 \pm 5)^\circ\text{C}$ і висушували в сублімаційній сушарці.

Приклад 3. Виготовлення біологічно активної добавки. Ліофілізовану суміш непатогенних бактерій *Escherichia coli* HM-2 та *Enterococcus faecium* HM-5, що була одержана за прикладом 2 змішували із стеаратом кальцію, цукром молочним і порошком листя та стебел *Silybum marianum* у такому співвідношенні, % мас.:

ліофілізована суміш мікроорганізмів <i>Escherichia coli</i> HM-2 і <i>Enterococcus faecium</i> HM-5	10,0,
стеарат кальцію	1,0,
цукор молочний	20,0,
порошок листя та стебел <i>Silybum marianum</i>	69,0.

Виготовлена біологічно активна добавка - сірувато-зелений порошок, з характерним приємним смаком і запахом. За мікробіологічними показниками біологічно активна добавка відповідає таким вимогам: загальна кількість життєздатних мікроорганізмів становить $1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$ КУО/г.

