

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____ Барановський М. М.
«__» _____ 2020 р.

ДИПЛОМНА РОБОТА
(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)
ВИПУСКНИКА ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ МАГІСТР
ЗА СПЕЦІАЛЬНІСТЮ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»

**Тема: «Удосконалення способів культивування біологічних агентів у
фармацевтичній біотехнології»**

Виконавець: студентка групи ФБ-205 М	Власюк О. В.
Керівник: к.т.н., доцент кафедри біотехнології	Решетняк Л. Р.
Консультант з розділу «Охорона праці»	Павлиш В. Д.
Консультант з розділу «Охорона навколишнього середовища»	Рябчевський О. В.
Нормоконтролер:	Дражнікова А. В.

КИЇВ 2020

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ Барановський М. М.

«__» _____ 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Власюк Ольги Володимирівни

1. Тема дипломної роботи: «Удосконалення способів культивування біологічних агентів у фармацевтичній біотехнології» затверджена наказом ректора від «15» вересня 2020 р. № 1657 /ст.
2. Термін виконання роботи: з 15 вересня по 23 грудня 2020 р.
3. Вихідні дані роботи: склад поживного середовища, біологічний агент, конструкція ферментеру.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ; РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ; РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА; ВИСНОВКИ; СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 7 таблиць, 18 рисунків.

6. Календарний план-графік

№	Завдання	Термін виконання
1	Вибір теми дипломної роботи, узгодження змісту з дипломним керівником.	15.09.2020-20.09.200
2	Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи: «Удосконалення технології виробництва пробіотиків у фармацевтичній промисловості».	21.09.20-30.10.20
3	Складання схеми виконання магістерської дипломної роботи.	01.10.20-12.10.20
4	Ознайомлення з методикою постановки експерименту на базі проходження переддипломної практики.	15.10.20-21.10.20
5	Проведення експерименту на базі проходження переддипломної практики.	22.10.20-12.11.20
6	Аналіз та обробка отриманих даних.	13.11.20-18.11.20
7	Оформлення практичної частини дипломної роботи на основі отриманих результатів.	19.11.20-31.11.20
8	Формулювання висновків та рекомендацій.	01.12.20-03.12.20
9	Перевірка дипломної роботи керівником.	04.12.20-09.12.20
10	Попередній захист дипломної роботи.	10.12.20
11	Захист дипломної роботи.	23.12.20

7. Консультація з окремих розділів

Назва розділу	Консультант (посада, ПІБ)	Дата, підпис	
		Завдання видав	Завдання приняв
Охорона праці	старший викладач Павлиш В. Д.		
Охорона навколишнього середовища	асистент кафедри екології Рябчевський О. В.		

Дата видачі завдання: «15» вересня 2020 р.

Керівник дипломної роботи _____ Решетняк Л. Р.

Завдання прийняла до виконання _____ Власюк О.В.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Удосконалення способів культивування біологічних агентів у фармацевтичній біотехнології»: 94 сторінки, 18 рисунків, 7 таблиць, 50 літературних джерел.

Об'єкт дослідження – процес виробництва пробіотика «Према».

Предмет дослідження – пробіотик «Према».

Мета дипломної роботи – удосконалення способів культивування на прикладі процесу біосинтезу молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Методи дослідження – мікробіологічні, технологічні, аналітичні, статистичні.

Лікарський препарат «Према» проявляє високу активність проти широкого спектра патогенних мікроорганізмів, сприяє відновленню корисного мікробіому кишечника. Описані морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG, що дає можливість віднести їх до роду *Lactobacillus*.

Виявлено, що при проведенні процесу біосинтезу протягом 14 годин з додаванням до середовища віт С, пантотенової кислоти та біотину кількість молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* GG збільшилась у 4 рази. Визначено, що при зміні рН в лужну сторону біомаса мікроорганізмів *L. rhamnosus* GG зменшується у 1,5 рази. Досліджено, що ріст культури молочнокислих бактерій досягає максимуму 37 °С, що корелює з літературними даними. Показано, що при використанні безперервного способу культивування з додаванням віт С, пантотенової кислоти та біотину, досягнуто максимальний вихід продукту.

СПОСОБИ КУЛЬТИВУВАННЯ, ПРОБІОТИКИ, ПРЕМА, *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* GG, ШЛУНКОВО-КИШКОВИЙ ТРАКТ, РЕГУЛЮВАННЯ МІКРОБІОМУ КИШКОВИКА

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ.....	7
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБІВ БІОСИНТЕЗУ МІКРООРГАНІЗМІВ.....	11
1.1. Способи культивування біологічних агентів у фармацевтичній біотехнології.....	11
1.2. Загальна характеристика пробіотиків.....	14
1.3. Характеристика та класифікація молочнокислих бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	19
1.3.1. Систематика бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	19
1.3.2. Морфологічні ознаки мікроорганізмів роду <i>Lactobacillus</i>	21
1.3.3. Культуральні та фізіолого-біохімічні особливості бактерій роду <i>Lactobacillus</i>	23
1.3.4. Властивості та застосування молочнокислих бактерій роду <i>Lactobacillus</i> у промисловості	28
1.4. Висновки до розділу.....	29
РОЗДІЛ 2. ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ.....	30
2.1. Об'єкти досліджень.....	30
2.1.1. Обладнання для культивування мікроорганізмів.....	30
2.1.2. Характеристика лікарського препарату «Према».....	32
2.1.3. Фармацевтичні та терапевтичні властивості бактерій <i>L. rhamnosus</i> GG	36
2.1.4. Поживні середовища та умови культивування бактерій <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	39
2.2. Методи досліджень.....	44
2.2.1. Виділення чистої культури мікрорганізмів <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG з лікарського препарату «Према».....	44

2.2.2. Визначення приналежності виділених бактерій до роду <i>Lactobacillus</i>	48
2.2.3. Способи культивування анаеробних мікрорганізмів.....	52
2.2.4. Визначення критеріїв оцінки біотехнологічного процесу.....	54
2.3. Висновки до розділу.....	56
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	57
3.1. Отримання чистої культури мікрорганізмів <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG з лікарського препарату «Према».....	57
3.1.1. Морфологічні та фізіологічні ознаки мікрорганізму <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG.....	57
3.1.2. Культуральні властивості біологічного агенту.....	58
3.2. Вплив різних умов культивування та зміни поживного середовища на біосинтетичну активність мікрорганізмів.....	60
3.3. Аналіз роботи ферментерів різних марок.....	64
3.4. Висновки до розділу.....	69
РОЗДІЛ 4. ОХОРОНА ПРАЦІ.....	70
4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори в лабораторії контролю якості пробіотика «Према».....	70
4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу НШВФ в лабораторії контролю якості пробіотика «Према».....	72
4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки в лабораторії контролю якості пробіотика «Према».....	75
4.4. Висновки до розділу.....	78
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА.....	79
5.1. Основні джерела забруднення водою фармацевтичним виробництвом...	79
5.2. Утилізація та знешкодження фармацевтичних відходів.....	81
5.3. Оцінка впливу на довкілля удосконалених способів культивування біологічних агентів у порівнянні з традиційними методами.....	87
5.4. Висновки до розділу.....	88
ВИСНОВКИ.....	89

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ, ТЕРМІНІВ

ІЛ – інтерлейкіни

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

РНК – рибонуклеїнова кислота

АТФ - аденозинтрифосфат

ФОС – фруктоолігосахариди

Середовище MRS – середовище DeMan, Rogosa, Sharpe

СКР – синдром роздратованого кишечнику

GRAS-статус – Generally Regarded As Safe

ПК – персональний комп'ютер

НШВФ – небезпечні та шкідливі виробничі фактори

ВСТУП

Актуальність теми. Дослідження, ефективність застосування пробіотиків при різних захворюваннях людей різного віку, ведуться вже багато десятиліть. Пробіотики позитивно впливають на перебіг гострих кишкових інфекцій, вони сприяють зменшенню тривалості хвороби та відновленню слизової оболонки кишечника. Доведено їх позитивний вплив при хворобі мандрівника, лактозній недостатності та діареї, викликаній прийомом антибіотиків.

Доведено ефективність використання пробіотиків при лікуванні атопічного дерматиту. Сьогодні в боротьбі з цією хворобою пробіотики виступають у якості додаткових терапевтичних засобів.

Пробіотики підсилюють травну і моторну функції шлунково-кишкового тракту. Беручи участь в ферментативних процесах розщеплення харчових компонентів, наприклад, бродінні, нормальний мікробіому виконує травну функцію в організмі, що особливо важливо при лактазній недостатності у дітей. В результаті життєдіяльності пробіотичних мікроорганізмів в кишечнику створюються сприятливі умови для всмоктування заліза, кальцію і вітаміну D. Однак, участь кишкового мікробіому в метаболізмі вітамінів не обмежується тільки посиленням їх всмоктування. Пробіотики беруть участь в синтезі вітамінів B₁, B₂, B₃, PP, K і E, а також фолієвої і аскорбінової кислот. Нормальний мікробіому повністю забезпечує потреби людини у вітамінах групи B і H (біотин); вітамін B₁₂ в природі синтезують тільки мікроорганізми. Крім вітамінів, мікроорганізми травного тракту людини синтезують такі біологічно активні сполуки, як гістидин, гістамін, холестерин, серотонін, γ-аміномасляна кислота, аміноглікозиди, деякі токсини, беруть участь в продукції ароматичних з'єднань (індолу і скатолу) і амінокислот (аргініну, триптофану, тирозину). Беручи участь в продукції вуглекислого газу, водню, сірководню, аміаку і метану, мікробіому регулює газовий склад в кишечнику.

Молочнокислі бактерії, в тому числі і представники родів *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, завдяки своїй безпеці для людини і

широку поширеність як в харчовій, так і у фармацевтичній промисловості, давно привертають увагу фахівців генної інженерії. Однак використання молочнокислих бактерій в якості об'єктів для клонування перешкоджає слабка в порівнянні з іншими класичними об'єктами (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*) вивченість їх генетики і відповідних векторів клонування. Сама процедура трансформації до недавнього часу була трудомісткою і малоефективною.

Тому дослідження з метою пошуків шляхів інтенсифікації технології одержання пробіотиків є актуальним.

Мета роботи: удосконалити способи біосинтезу молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Для досягнення поставленої мети необхідно вирішити наступні **завдання:**

1. Провести порівняльну характеристику способів культивування мікроорганізмів.

2. Вивчити морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG.

3. Виявити вплив умов культивування на життєдіяльність молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Об'єкт дослідження: процес виробництва пробіотика «Према».

Предмет дослідження: пробіотик «Према».

Методи дослідження: мікробіологічні, технологічні, аналітичні, статистичні.

РОЗДІЛ 1

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА СПОСОБІВ БІОСИНТЕЗУ МІКРООРГАНІЗМІВ

1.1. Способи культивування біологічних агентів у фармацевтичній біотехнології

В даний час біотехнологія витісняє традиційні технології виробництва ліків, відкриваючи принципово нові можливості. Біотехнологічним способом виробляють генно-інженерні білки (інтерферони, інтерлейкіни, інсулін, вакцини тощо), ферменти, діагностичні засоби (тест-системи на наркотики, лікарські речовини, гормони та ін.), вітаміни, антибіотики, біосумісні матеріали і ін. В загальному обсязі випущених фармацевтичних препаратів частка лікарських засобів, одержуваних методами біотехнології, неухильно зростає. Використання біотехнологій в короткий час у революційний спосіб змінив фармацевтичну промисловість. Перший біотехнологічний препарат був виведений на ринок понад 20 років тому, і терміни дії патентного захисту на багато інших закінчуються, так що до 2010 р вже більше 20 біотехнологічних препаратів із загальним обсягом продажів близько 10 млрд дол. США виявилися без патентного захисту в США. Це призвело до появи на ринку нової ніші, яка була використана генеричними компаніями.

Біотехнологічні процеси, що лежать в основі отримання харчових продуктів за допомогою біологічних агентів – мікроорганізмів, мають багатовікову історію і пов'язані з виготовленням хліба, сиру, пива, алкогольних напоїв та інших продуктів.

Біологічний агент це – бактерія, вірус, найпростіші, паразит або гриб, який може використовуватися для процесів культитивування у промисловості.

У практиці застосування лікарських засобів лікарям доводиться зустрічатися з так званими побічними явищами, які можуть розвиватися поряд з основною дією ліків і обмежувати можливості їх застосування. Побічні реакції особливо часто виникають у випадках застосування ліків, що володіють багатостороннім фармакологічним ефектом (згадаємо той же етиловий спирт), тоді як мета лікування досягається

завдяки використанню лише деяких сторін фармакодинаміки даного лікарського препарату.

Особливої уваги заслуговують в цьому сенсі антибіотики, оскільки вони є препаратами, що застосовуються при лікуванні більшості інфекційних захворювань, а призначення антибіотиків далеко не завжди передуює проведенню необхідних мікробіологічних досліджень. Нерідкі випадки нераціонального застосування антибіотиків широкого спектру дії, порушення пацієнтами схем прийому препаратів, а то і зовсім безконтрольного самолікування. І навіть при правильному використанні антибактеріальна дія антибіотиків поширюється не тільки на патогенну, а й на нормальний мікробіом організму. Під дією антибіотиків гинуть біфідобактерії, лактобацили, симбіотичні штами кишкової палички та інші корисні мікроорганізми. Вивільнені екологічні ніші тут же заселяють умовно-патогенні бактерії і гриби (як правило, резистентні до антибіотиків), які до цього були присутні на шкірі і в нестерильних порожнинах організму в незначній кількості – їх розмноження стримувалося нормальною мікрофлорою. Антибіотикотерапія, наприклад, може сприяти перетворенню мирних сапрофітних дріжджоподібних грибів *Candida albicans* (рис. 1.1), що мешкають на слизових оболонках порожнини рота, трахеї і кишечника, в організм, що бурхливо розмножується та викликають кандидоз.

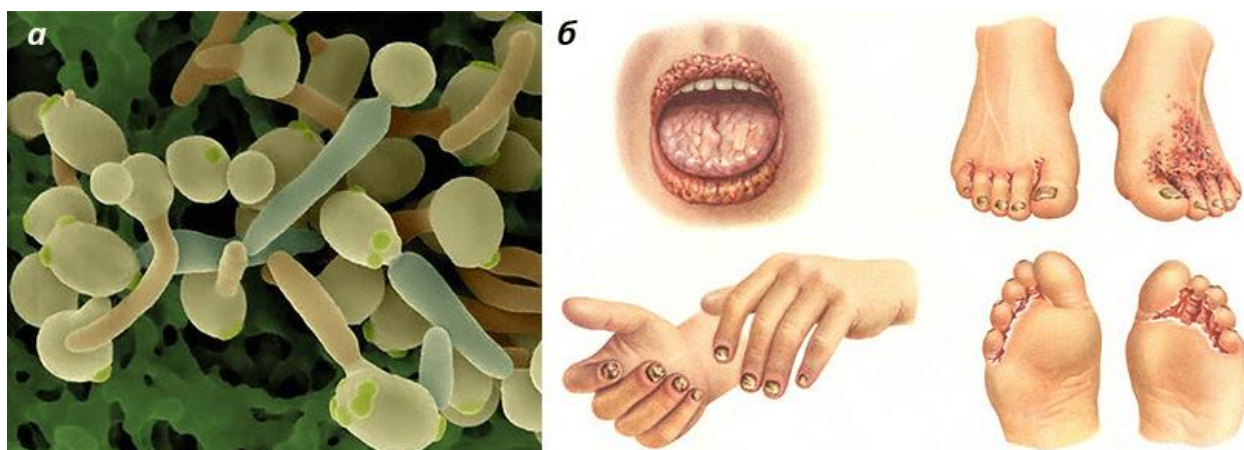


Рис. 1.1. Дріждеподібні гриби *Candida albicans* і наслідки її активного розмноження: а – клітини *Candida albicans* під електронним мікроскопом; б- прояв кандидозу

Одним з можливих рішень проблеми є розробка і широке фармакотерапевтичне використання препаратів на основі живих культур представників нормальної мікрофлори (пробіотиків) для корекції мікробіоценозів людини і для лікування патологічних станів. Застосування бактеріальних препаратів засноване на розумінні ролі нормальної мікрофлори організму в процесах, що забезпечують неспецифічну резистентність до інфекцій, у формуванні імунної відповіді, а також на встановлення антагоністичної ролі нормального мікробіому і його участі в регуляції метаболічних процесів. Саме тому для детального розкриття теми дипломної роботи нами було обрано біологічний агент – *Lactobacillus rhamnosus GG*.

Вибір способу культивування залежить від кінцевої мети культивування (метою є або накопичення біомаси, або отримання певного продукту життєдіяльності – метаболіти) (рис. 1.2). Поверхнєве культивування полягає у вирощуванні аеробних мікроорганізмів на поверхні рідких і сипучих поживних середовищ. При цьому мікроорганізми отримують кисень безпосередньо з повітря. При поверхневому культивуванні на рідких середовищах мікроорганізми ростуть у вигляді плівок. Здійснюється поверхнєве культивування в спеціальних ваннах - кюветах.

Глибинне культивування проводиться на рідких поживних середовищах, в яких мікроорганізми розвиваються всього обсягу живильного середовища. Поєднання поживного середовища і мікроорганізмів, що в ньому ростуть, називають культуральною рідиною. Здійснюється глибинне культивування в спеціальних апаратах – ферментерах, які мають мішалки і системою підведення стерильного повітря для забезпечення зростання аеробних мікроорганізмів. Аерування – продування стерильного повітря через культуральну рідину.

При періодичному культивуванні весь обсяг поживного середовища засівають чистою культурою, яку вирощують в оптимальних умовах певний період часу до накопичення потрібної кількості цільового продукту. Слід зазначити, що так як культивування ведеться на не відновлюваному живильному середовищі (в стаціонарних умовах), то клітини весь час знаходяться в мінливих умовах. Таким чином, періодичну систему можна розглядати як замкнуту систему.

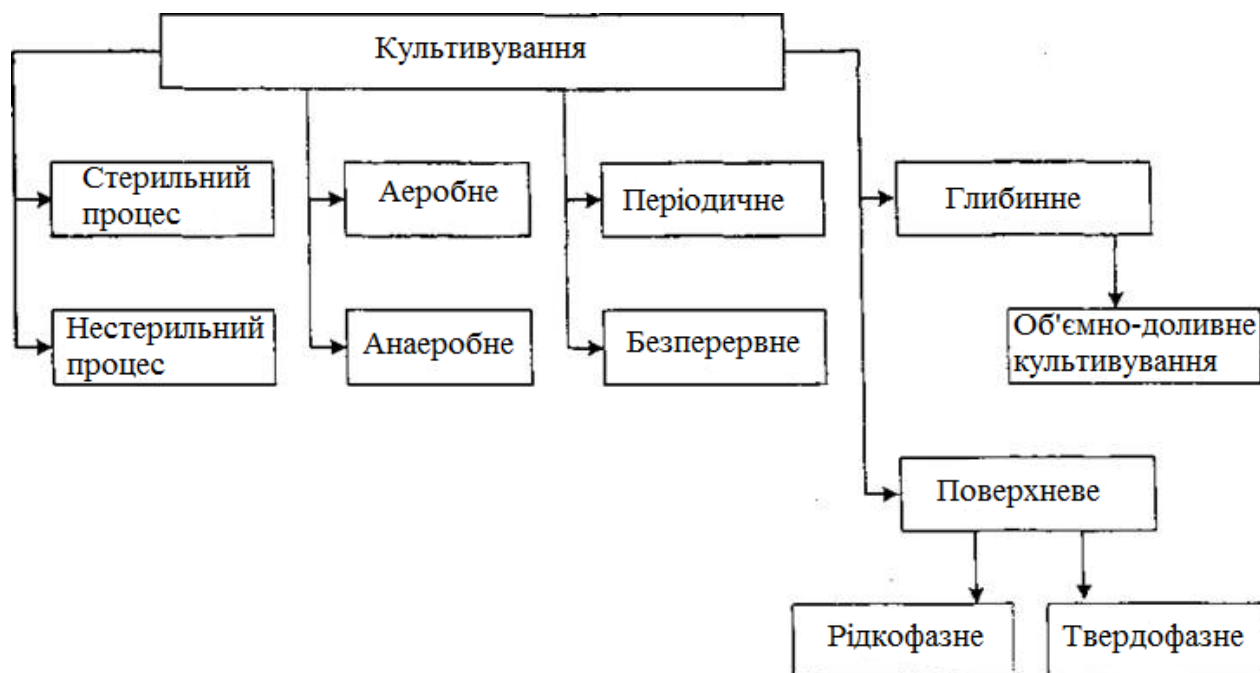


Рис. 1.2. Способи культивування біологічних агентів

При безперервному культивуванні культура знаходиться в спеціальному апараті, куди постійно притікає живильне середовище і з такою ж швидкістю відводиться культуральна рідина. Для мікроорганізму створюються незмінні умови середовища, тому безперервну систему можна розглядати як відкриту систему. Поверхнєве культивування може бути тільки періодичним, в той час як глибинне культивування може здійснюватися і періодичним, і безперервним способом.

Таким чином, для дослідження було обрано анаеробне безперервне глибинне культивування в ферментері, оскільки молочнокислі бактерії є факультативними анаеробами і потребують незмінних умов для росту.

1.2. Загальна характеристика пробіотиків

Ідея бактеріотерапії належить І. І. Мечникову. В наші дні бактерійні препарати найширше застосовуються для лікування кишкових дисбактеріозів [1]. Препарати з живих бактерій – симбіотичного мікробіому кишечника людини застосовуються для нормального біоценозу після тривалого лікування антибіотиками, при кишкових дисфункціях, гастроентеритах, колітах, в тому числі постдифтерійних і виразкових.

Ці препарати особливо важливі в дитячій клініці, оскільки є фізіологічними і абсолютно нешкідливими для організму.

До складу пробіотиків можуть входити дріжджі *Saccharomyces boulardii*, бактерії *Streptococcus thermophilus*, *Escherichia coli* M-17, ентерококи *Enterococcus faecium*, спорові аеробні бацили (*Bacillus subtilis* і *Bacillus cereus*) і ін. Не зменшуючи значення цих груп мікроорганізмів, слід відзначити, що позитивні ефекти нормального мікробіому кишечника і прибутків обумовлені в основному біфідо-і лактобактеріями.

У пробіотикотерапії найчастіше використовуються наступні види *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. delbrueckii subsp. lactis*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. reuteri*, *L. casei* [2].

Більшість з відомих на даний момент пробіотичних штамів мікроорганізмів є частиною нормального мікробіому організму людини або присутні в харчових продуктах, що споживаються вже кількома поколіннями людей у всьому світі. Пробіотик позитивно впливає на макроорганізм через цілий арсенал механізмів, з яких ще не все повністю розшифровані. До числа досить добре вивчених відносять антагоністичну активність відносно патогенних і умовно-патогенних мікроорганізмів [3].

Пригнічення росту небажаних мікробів відбувається, по-перше, завдяки продукуванню сполук з вираженою антагоністичною активністю: лізоциму, бактеріоцинів, органічних кислот (насамперед молочної, а також оцтової, янтарної, мурашиної), перекису водню, речовин з антибіотичною активністю. Наприклад, утворення молочної кислоти призводить до зниження рН кишечника до рН 4.0-5.8 і, як наслідок, стримування росту і розмноження гнільних патогенних мікроорганізмів. По-друге, пробіотики мають адгезивну активність до епітеліальних клітин кишечника і можуть успішно конкурувати з патогенними та умовно патогенними мікробами за місця адгезії на стінці кишківника, і, як наслідок, це призводить до пригнічення росту небажаного мікробіому.

Кишковому мікробіому належить важлива роль в підтримці імунологічної реактивності та толерантності організму. Мікробіом кишечника активує індукцію

імуноглобулінів, γ -інтерферону і деяких інших цитокінів, підвищує фагоцитарну активність макрофагів, нейтрофілів, моноцитів і інших лейкоцитів. Антагоністична активність і взаємодія з імунною системою детермінують найбільш важливу властивість пробіотичних мікроорганізмів [1] – забезпечення колонізаційної резистентності, під якою розуміють захист кишкової стінки від проникнення у внутрішнє середовище організму бактерій, токсинів і токсичних продуктів різного походження. Захисна функція пробіотиків виражається також в їх антимутагенній активності. Цією властивістю пробіотиків пояснюються їх протипухлинні та антиалергенні ефекти. Вони беруть участь в гідролізі канцерогенних продуктів метаболізму білків, ліпідів, вуглеводів, інактивації гістаміну, ксенобіотиків і проканцерогенних речовин, здійснюють декон'югацію жовчних і гідроксилування жирних кислот.

При конструюванні пробіотичних препаратів повинні відбиратися штами мікроорганізмів, що відповідають визначеним вимогам. Вони зводяться до наступного: безпека штамів, призначених для введення їх до складу пробіотиків, наявність антагоністичних властивостей до патогенного та умовно-патогенного мікробіому, стійкість до літичних ферментів слини (лізоцим), травних ферментів (пепсин, ліпаза) і до жовчі; стійкість до дії кислоти шлункового соку; адгезивна активність і колонізаційна резистентність; стійкість до антибіотиків; вища порівняно з коменсальним мікробіомом питома швидкість росту пробіотичних культур, що дозволяє їм швидше освоїти живильний субстрат, а отже, збільшити продуктивність клітин пробіотичних штамів; штам повинен бути технологічним при виробництві (стабільним при культивуванні та інших стадіях технологічного процесу); імуномодуляторна та імуногенна дія пробіотика.

Препарати отримують з виробничих штамів відповідних бактерій, які культивуються в реакторах. Після отримання біомаси відбувається їх ліофільне висушування. Препарат проходять строгий контроль на ефективність і безпечність.

Біфідумбактерин – препарат, що містить живі *Bifidobacterium bifidum* у висушеному вигляді. Біфідумбактерин застосовують при дефіциті біфідобактерій, який спостерігається при хронічних формах дифтерії, колітах, при дисбактеріозах, що

розвиваються як результат тривалої антибіотикотерапії. Препарат рекомендується також для санації реконвалесцентів після дифтерії.

Колібактерин містить живі кишкові палички *Escherichia coli* штаму М-17, антагоністично активні щодо умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів (особливо щодо шигел Флекснера і Зонне). Колібактерин застосовують при хронічних колітах, дисбактеріозах, санації реконвалесцентів, профілактиці дифтерії та інших кишкових захворювань інфекційної природи.

Біфікол є комплексним препаратом, оскільки містить в собі обидва препарати (біфідумбактерин і колібактерин), будучи біологічним комплексом з бактерій анаеробної (*Bifidobacterium. bifidium*, штам 1) і факультативно аеробної (*Escherichia coli*, штам М-17) мікробіому кишечника людини. Біфікол має високу терапевтичну ефективність.

Лактобактерин є живою ліофілізованою культурою молочнокислих бактерій (штамів *Lactobacillus fermenti* і *Lactobacillus plantarum*). Ці бактерії володіють антагоністичними властивостями щодо ряду ентеропатогенних бактерій – ешерихій, шигел, протея, гемолітичних стафілококів і деяких інших мікроорганізмів. Відмітною ознакою лактобактерину є його стійкість до антибіотиків широкого спектру дії, що дає можливість застосовувати лактобактерин паралельно з антибіотикотерапією.

Бактерійні препаратів застосовуються і для лікування інших захворювань. Для терапії фарингітів, хронічних тонзилітів, стоматитів з успіхом застосовується зрошення ротової порожнини і горла суспензією живих молочнокислих бацил штаму 1Б. Цей штам виділений з ротової порожнини здорової людини і володіє підвищеною антагоністичною активністю до стафілококів, псевдомонад, дифтерійних бактерій, сальмонели, шигели та ін.

Генетичний матеріал мікроорганізмів найбільш доступний для впливу на нього різних факторів, що призводять до структурних змін в бактеріальному геномі. Крім мутацій в бактеріальних популяціях активно реалізуються генетичні рекомбінації, оскільки в стані «компетентності» бактеріальна клітина здатна поглинати із зовнішнього середовища чужорідні молекули ДНК, використовуючи потім частину одержаних генів для розширення свого метаболічного потенціалу та придбання нових

корисних властивостей. Переносниками молекул ДНК можуть виступати бактеріофаги, які в результаті трансдукції вбудовують в геном бактерії-господаря нові фрагменти ДНК, а також плазміди, які здійснюють перенесення генетичної рекомбінації.

Великий інтерес для медичної практики представляють дані використання генетично модифікованих мікроорганізмів, перспективних для отримання препаратів пробіотиків, що володіють максимальним спектром заданих корисних властивостей. До таких властивостей відноситься продукування бактеріями антибіотикоподібних і різних цільових протеїнів імунокомпетентних клітин людини, гени в яких клоновані на різних векторах і передані в певний штам-носіє. Мінливість бактерій все частіше використовують з метою конструювання генетичних рекомбінантів, в тому числі і пробіотичних мікроорганізмів з новими корисними властивостями.

Перспективним сучасним напрямком є створення генно-інженерних пробіотиків із застосуванням живих бактеріальних векторів для доставки гетерологічних імуногенних епітопів спільно з доставкою цитокінів, які активізують місцевий імунітет. Нараховуються десятки рекомбінантних штамів мікроорганізмів, що несуть гени, відповідальні за синтез α -, β - і γ -інтерферонів, різних типів інтерлейкінів (IL-1, IL-6, α -1-тимозин, гранулоцит-макрофаг-колонієстимулюючий фактор), факторів некрозу пухлин - α , - β тощо.

Перевагою лікувально-профілактичних препаратів, що створюються на основі бактеріальних векторів доставки, є простота виготовлення, що не вимагає дорогої очищення лікарської субстанції та отримання біомаси, з подальшою її сублімацією, що в свою чергу забезпечує простоту зберігання. Пероральний прийом є найбільш простим і безпечним способом введення таких препаратів.

Багато дослідників відзначають, що ефективність доставки цільового протеїну в організм бактеріальних вектором залежить від багатьох факторів:

- природи бактерії-носія;
- способу введення бактерії-носія;
- ефективності експресії гетерологічних епітопів і цитокінів в імунологічно активною формою.

Однак широке впровадження в медичну практику генно-модифікованих штамів мікроорганізмів обмежена можливим непередбачуваним впливом їх на організм господаря (людини або тварини), а також на екосистеми. Деякі дослідники вважають, що це може бути пов'язане з появою у інтродуцентів нових властивостей, що підсилюють їх конкурентоспроможність, а також порушенням рівноваги екосистем. Крім того, активно обговорюється можливість неконтрольованого перенесення рекомбінантних ДНК новим господарям. У той же час багато дослідників експериментально підтвердили екологічну безпеку рекомбінантних мікроорганізмів як перспективної основи ефективних бактеріотерапевтичних препаратів [1, 4]. До мікроорганізмів, активно досліджуваних на предмет можливості створення рекомбінантних пробіотиків, відносяться бактерії родів *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus*, *Escherichia* і багато інших [1-3].

1.3. Характеристика та класифікація молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus*

1.3.1 Систематика бактерій роду *Lactobacillus*

Рід *Lactobacillus* належить до відділу *Firmicutes*, класу *Bacilli*, ряду *Lactobacillales*, родини *Lactobacillaceae*. Питання номенклатури і таксономії бактерій роду *Lactobacillus* до теперішнього часу остаточно не вирішені і переглядаються. В даний час рід об'єднує понад 100 видів і представляє найбільшу групу в порядку *Lactobacillales* [6]. Ряд видів включає два і більше підвидів.

Домен: *Bacteria*

Відділ: *Firmicutes*

Клас: *Bacilli*

Ряд: *Lactobacillales*

Родина: *Lactobacillaceae*

Рід: *Lactobacillus* [6]

У вітчизняних працях з технічної мікробіології замість родової назви лактобацили (*Lactobacillus*) можна зустріти термін лактобактерії (*Lactobacterium*), вперше використаний Н.А. Красильниковим для позначення бактерій цієї групи в «Визначнику бактерій і актиноміцетів» (1949 р.). Проте, що оскільки бактерії цієї групи спор не утворюють, то правильніше називати їх бактеріями, а не бацилами, але Міжнародним комітетом по номенклатурі бактерій в 1971 році прийнято назву *Lactobacillus*. У медичній літературі іноді використовується термін паличка Дедерлейна (A. Doderlein), яким позначають види лактобацил, які виявлено в піхві і представляють основний компонент його нормальної мікробіому (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. cellobiosum* і ін.). Говорячи про систематичне положення лактобацил, часто використовується термін «молочнокислі бактерії» (МКБ; lactic acid bacteria, LAB). Однак група молочнокислих бактерій не є систематичною і об'єднує представників різних таксономічних груп (табл. 1.1), що відносяться до порядку *Lactobacillales*, на підставі головної ознаки - здатності утворювати молочну кислоту в якості кінцевого метаболіту.

Повний перелік ознак групи молочнокислих бактерій включає [6]:

- 1) грампозитивні;
- 2) не утворюють спор;
- 3) каталазонегативні;
- 4) позбавлені цитохромів;
- 5) аеро- і кислототолерантні;
- 6) вимогливі до джерел живлення;
- 7) утворюють молочну кислоту в якості основного кінцевого продукту вуглеводного метаболізму.

Таблиця 1.1

Склад групи молочнокислих бактерій [6]

№	Рід	Таксономія роду
1	<i>Lactobacillus</i>	Домен <i>Bacteria</i>
2	<i>Pediococcus</i>	Відділ XIII. <i>Firmicutes</i> Клас I. <i>Bacilli</i>

		Порядок II. <i>Lactobacillales</i> Родина I. <i>Lactobacillaceae</i>
3	<i>Aerococcus</i>	Родина II. <i>Aerococcaceae</i>
4	<i>Carnobacterium</i>	Родина III. <i>Carnobacteriaceae</i>
5	<i>Enterococcus</i>	Родина IV. <i>Enterococcaceae</i>
6	<i>Tetragenococcus</i>	
7	<i>Vagococcus</i>	
8	<i>Oenococcus</i>	Родина V. <i>Leuconostocaceae</i>
9	<i>Leuconostoc</i>	
11	<i>Lactococcus</i>	Родина VI. <i>Streptococcaceae</i>
12	<i>Streptococcus</i>	

Бактерії, що відносяться до родів *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* і *Leuconostoc*, формують ядро групи МКБ. Іноді через схожість в метаболізмі вуглеводів і їх ролі в харчовій промисловості в одній групі з МКБ розглядають представників роду *Bifidobacterium* і роду *Sporolactobacillus*.

1.3.2 Морфологічні та фізіологічні ознаки мікроорганізмів роду *Lactobacillus*

Всередині роду *Lactobacillus* зустрічаються бактерії з різною морфологією. Більшість представників роду мають форму прямих паличок із закругленими кінцями, зібраних в ланцюжки різної довжини, або розташовані поодинокі або попарно (рис. 1.3).

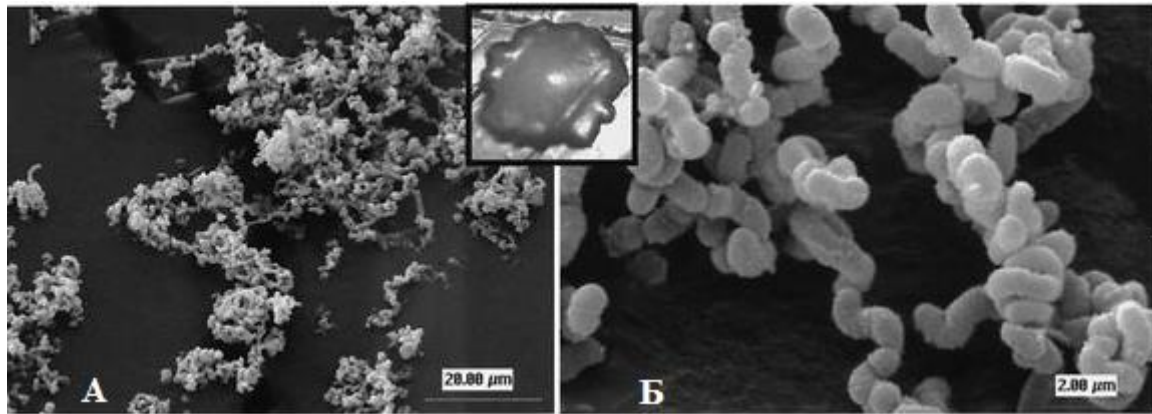


Рис. 1.3. Колонії культури молочнокислих бактерій *L. gasseri* 4B2, *A* – колонії, *Б* – клітини [5]

Серед лактобацил зустрічаються короткі кокоподібної форми, а також довгі, ниткоподібні палички довжиною від 0,7-1,1 до 3,0-8,0 мкм, розташовані поодинокі або зібрані в ланцюжки. Так, вигнута форма клітин властива *L. curvatus*; у *L. coryniformis* клітини мають форму вигнутих грушовидних паличок. Довжина паличок і величина вигину зазвичай залежать від умов росту: складу поживного середовища, температурного режиму, аерації, а також віку культури. У деяких видів (наприклад, *L. fermentum*, *L. brevis*) культура завжди представлена сумішшю коротких і довгих паличок. Лактобацили не утворюють ендоспори.

За Грамом забарвлюються позитивно, стають грамнегативними з віком і при підвищенні кислотності. При фарбуванні за Грамом або метиленовим синім у деяких штамів виявляються біполярні тільця, зернистість або лінійна смугастість цитоплазми. Для деяких видів, наприклад, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* і *L. delbrueckii subsp. lactis*, характерна наявність включень гранул волютину (метахроматина, поліфосфатних гранул). Більшість лактобацил нерухомі. Рухливість спостерігається лише у представників деяких видів (а саме: *L. agilis*, *L. aquaticus*, *L. capillatus*, *L. ghanensis*, *L. mali*, *L. nagelii*, *L. oeni*, *L. ruminis*, *L. satsumensis*, *L. sucicola*, *L. uvarum*, *L. vini* [6]), при цьому вони пересуваються за допомогою перитрихціальних джгутиків. Цікаво відзначити, що переміщатися можуть не тільки окремі клітини, але і ланцюжки з 2-5 клітин. Рухливість в значній мірі залежить від поживного

середовища і віку культури; часто вона виявляється тільки при виділенні лактобацил і втрачається після декількох пересівань.

Багато бактерій роду *Lactobacillus* утворюють екзополісахариди. Так, капсула діаметром 1,5-3 мкм виявлена у бактерій *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, виділених з йогурту і *L. kefiranofaciens*, виділених з кефірного зерна. Завдяки здатності утворювати екзополісахариди *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* застосовуються у виробництві йогурту, вони забезпечують необхідну текстуру цього харчового продукту. В свою чергу, екзополісахариди *L. kefiranofaciens* утворюють матрикс, званий «кефірний зерном», який служить екологічної нішею для мікробного співтовариства дріжджів і лактобацил [7].

1.3.3. Культуральні та фізіолого-біохімічні особливості бактерій роду *Lactobacillus*

На щільних поживних середовищах лактобацили формують колонії сферичні, часто сочевицеподібні, гладкі, непрозорі, іноді блискучі, опуклі, з рівними чіткими контурами (Рис. 1.4). Зазвичай колонії дрібні, але у деяких видів їх розмір може перевищувати 4 мм в діаметрі.

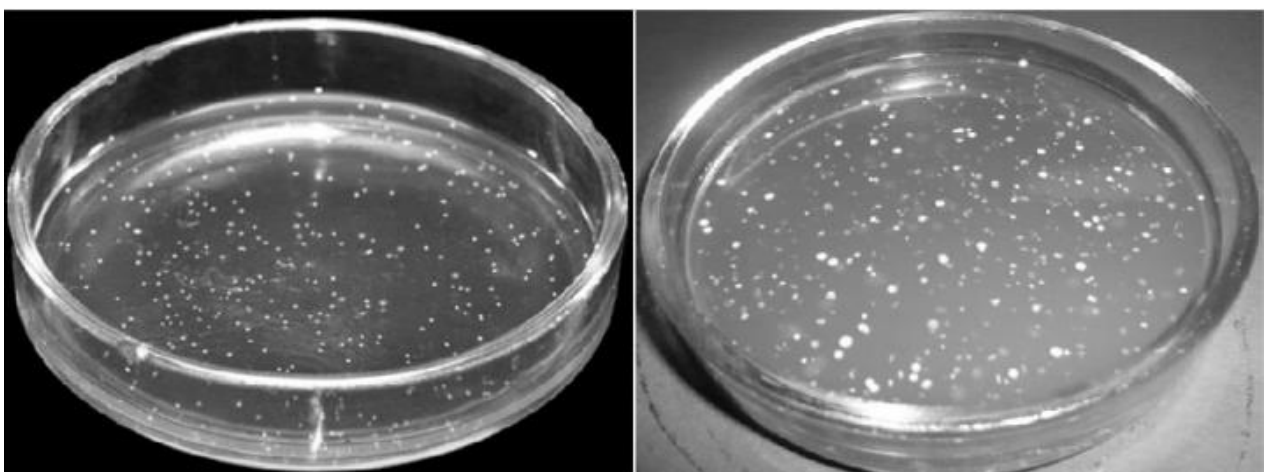


Рис. 1.4. Колонії *L. plantarum* на агаризованому середовищі MRS

Колонії як правило, не пігментовані, білі або злегка кремового кольору, іноді – жовтуваті або червонуваті. Деякі види утворюють шорсткі колонії. На середовищах з

білками або ліпідами зони просвітління навколо колоній зазвичай не утворюються. Тим не менше, більшість лактобацил мають слабку протеолітичну активність (за рахунок зв'язаних з клітинною стінкою протеаз і пептидаз) і слабою ліполітичною активністю (завдяки внутрішньоклітинним ліпазам). Амілолітична активність на щільних середовищах з крохмалем виявляється тільки у деяких видів: *L. amylolyticus*, *L. amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. fermentum*. Окремі види лактобацил (*L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. casei*) здатні утворювати позаклітинні нуклеази при культивуванні на агарі, що містить ДНК або РНК[5].

При глибинному посіві на тверде поживне середовище утворюються щільні колонії у вигляді правильних лінз (сочевицеподібні), трикутної і неправильної форми або ніжні, що нагадують сніжинку або грудочку вати. Якщо в середовище було додана крейда, то навколо колоній внаслідок накопичення молочної кислоти утворюється зона розчинення крейди (рис. 1.5) [7].

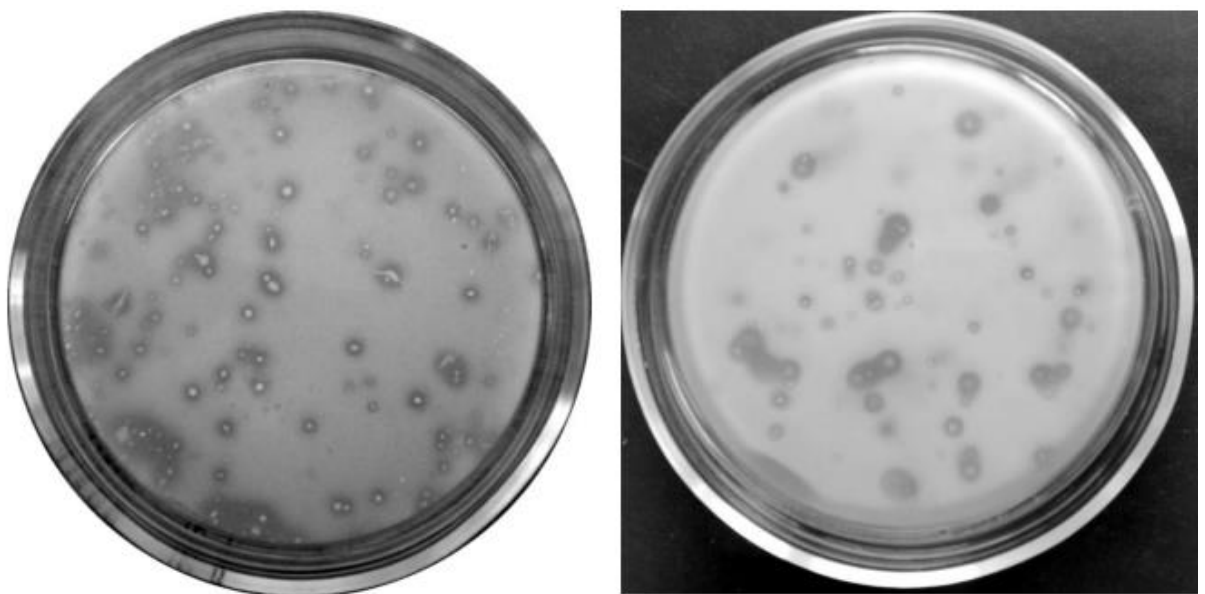


Рис. 1.5. Колонії бактерій роду *Lactobacillus* на капустяному середовищі (навколо колоній видно зони розчинення крейди, що міститься в поживному середовищі внаслідок накопичення молочної кислоти)

Хороший ріст спостерігається в напіврідкому поживному середовищі, що містить 0,15-0,75% агару. Невеликі концентрації агару забезпечують низький окислювально-відновний потенціал середовища і створюють сприятливі

мікроаерофільні умови. За характером росту в напіврідкої середовищі виділяють п'ять варіантів:

- ріст кульками;
- з поздовжньою смугастістю;
- придонний;
- поверхневий;
- рівномірне помутніння середовища.

При розвитку на рідких поживних середовищах лактобацили найчастіше викликають рівномірне помутніння, після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчасті осаду, ніколи не утворюючи плівок на поверхні середовища.

Lactobacillus надзвичайно різноманітні за своїми біохімічними і фізіологічними властивостями. Однак вони всі мають метаболізм бродильного типу, при цьому щонайменше половина вуглецю кінцевих продуктів бродіння припадає на лактат. Залежно від того, які продукти утворюються в результаті бродіння, молочнокислі бактерії прийнято поділяти на 2 групи: гомоферментативні і гетероферментативні [8].

Гомоферментативні види утворюють в результаті бродіння переважно молочну кислоту (85% і більше) і вкрай невелику кількість фумарової та бурштинової летких кислот, етилового спирту і вуглекислого газу. Вони використовують шлях Ембдена-Меєргофа-Парнаса (гліколіз) для утворення 2 молей лактату з кожного моля глюкози. При цьому синтезується 2 молекули АТФ. Оптична активність утвореного лактату відрізняється у різних видів і залежить від стереоспецифічності лактатдегідрогенази (ферменту, що каталізує відновлення пірувату до лактату), а також від того, чи містить клітина лактатрацемазу, що перетворює D-лактат в L-форму.

Гетероферментативні види утворюють з 1 моль глюкози крім 1 моль молочної кислоти, 1 моль етилового спирту (або оцтової кислоти) і 1 моль вуглекислого газу, використовуючи окислювальний пентозофосфатний шлях розщеплення глюкози. Енергетичний вихід становить 1 молекулу АТФ на 1 моль витраченої глюкози, проте деякі гетероферментативні види переводять ацетилфосфат частково або повністю в оцтову кислоту, що супроводжується утворенням ще однієї молекули АТФ.

На ферментативном рівні ключова відмінність між гомо- і гетероферментативних видами полягає в наявності у перших гідролітичних ферментів гліколізу (альдолази), а у других – фосфокетолази. Відповідно, гомоферментативні види не здатні зброджувати пентози.

Однак з цього правила є винятки. У *L. brevis* була виявлена здатність зброджувати фруктозу по гомоферментативного шляху за допомогою індукованої фруктозою альдолази. А у *L. acidophilus* виявлена фосфокетолаза і здатність рости на рибозі. Крім того, тип збродження істотно залежить від субстрату. Факультативно гетероферментативні бактерії *L. plantarum*, *L. casei* зброджують глюкозу по гомоферментативному шляху, а рибозу перетворюють в ацетат і лактат гетероферментативним шляхом. Рибоза індукує у них синтез фосфокетолази [8]. Навіть якщо клітини, які виростили на середовищі з рибозою, відмити, вони будуть зброджувати глюкозу як гетероферментативні бактерії.

Цікаво відзначити, що здатність зброджувати пентози не гарантує ріст на середовищах, що містять ці вуглеводи, оскільки гексози необхідні для конструктивного метаболізму клітини (зокрема, синтезу пептидоглікану).

До затвердження філогенетичного підходу (заснованого на послідовності 16S рРНК) в якості основного в систематиці лактобацил, робилися спроби побудувати систематику на основі типу збродження цукрів. Враховувалася також морфологія клітин, температурний інтервал (ріст при 15 °С і 45°С), харчові потреби. На підставі цих ознак виділяли 3 фізіологічні групи: облігатно гомоферментативні лактобацили (*Thermobacterium*), факультативно гетероферментативні (*Streptobacterium*), облігатно гетероферментативні (*Betabacterium*) [6-8].

Якщо взяти до уваги відому варіабельність фізіологічних і біохімічних властивостей лактобацил, очевидні проблемні моменти цієї систематики. Проте, іноді її використовують і сьогодні.

Майже всі лактобацили – мезофіли. Температурний оптимум розвитку лежить в межах 30-40 °С. Верхньої температурної кордоном (максимумом) для них є 40 °С, проте зустрічаються термофільні види, які добре ростуть і мають активний метаболізм при температурі близько 45 °С. Психрофільні види також зустрічаються.

Температурний діапазон росту 2-53 °С. Лактобактерії – факультативні анаероби, іноді мікроаерофіли. Хоча більшість штамів аеротолерантними, оптимальними для росту є анаеробні і мікроаерофільні умови. Лактобацили зазвичай слабо ростуть на повітрі, краще – при пониженому вмісті кисню. Підвищена концентрація вуглекислого газу ($\approx 5\%$) може стимулювати ріст; в строго аеробних умовах, як правило, ріст сповільнюється. Деякі види є строгими анаеробами.

Лактобацили не містять порфіринів, зокрема, гем, тому вони позбавлені таких гемопротеїнів, як цитохроми і каталаза. Незважаючи на це, для них характерні досить різноманітні механізми захисту від токсичної дії активних форм кисню (АФК):

- фермент супероксиддисмутаза, що каталізує реакцію дисмутації супероксидних радикалів з утворенням перекису водню і кисню;
- високі внутрішньоклітинні концентрації іонів Mn^{2+} , які здатні ефективно усувати супероксидні іони;
- псевдокаталаза (у *L. mali*);
- механізм прискорення гліколітичного розщеплення глюкози в аеробних умовах (в аеробних умовах водень з НАД-Н₂ прямо передається на O₂, звільняючи частину пірувату від його акцепторної функції в молочнокислом бродінні. Піруват окислюється до ацетил-КоА, подальше метаболізування якого до ацетату призводить до синтезу молекули АТФ).

Фізіологічною особливістю лактобацил є їх кислотостійкість. Для росту лактобацил найбільш сприятливі злегка підкислені середовища з початковим рН 5,4-6,4, причому ріст культури сповільнюється при досягненні рН 3,6-4,0 в залежності від виду та штаму. *L. suebicus*, *L. casei* і *L. plantarum* зберігають здатність до росту навіть при рН 2,8. У лужних і нейтральних середовищах ріст лактобацил як правило сповільнюється [9].

Пігменти утворюють дуже рідко, жовтого, оранжевого або червоного відтінку. Ще одна відмінна риса цієї групи мікроорганізмів – це їх спиртостійкість. Вони здатні розвиватися в поживних субстратах при високих концентраціях етилового спирту (18-24% об.). Відновлення нітрату для лактобацил не характерно, крім умов, коли кінцевий рН підтримується 6,0 і/ або гем міститься в середовищі. Желатин не

розріджують. Казеїн не розщеплюється, але більшість штамів утворюють невеликі кількості розчинного азоту. Індол і сірководень не утворюють. Вміст гуаніну і цитозину в ДНК становить 32-55%.

1.3.4. Властивості та застосування молочнокислих бактерій роду *Lactobacillus* у промисловості

Lactobacillus широко поширені в природі. Як правило, вони зустрічаються в умовах надлишку вуглеводів, наприклад, в харчових продуктах (молочних продуктах, ферментованому м'ясі, хлібобулочних виробках) і субстратах рослинного походження. Крім того, вони займають багато ніш всередині і на поверхні тіла людини: в респіраторному, шлунково кишковому і уrogenітальному тракті. Ці бактерії майже ніколи не виявляються в ґрунті або водоймах.

Молоко не містить *Lactobacillus*, коли покидає вим'я, але вони швидко потрапляють в нього з повітря, з інструменту та ін. Стрептококи випереджають лактобацили за швидкістю росту, тому титр лактобацил низький навіть в скислому молоці. Але з часом лактобацили починають переважати через збільшену стійкість до кислого середовища. Лактобацили містяться в різних кисломолочних продуктах (сирі, йогурті, кефірі та ін.). У ці продукти їх зазвичай додають спеціально при виготовленні харчового продукту.

Також вони здатні викликати псування харчових продуктів: *L. buchneri* продукують біогенні аміни, а *L. bifementans* викликають розтріскування едемського сиру. Деякі кисломолочні продукти є прикладами спеціалізованих екологічних ніш окремих видів лактобацил: ці види стабільно виділяються з них протягом сотень років, але практично не виявляються в інших джерелах. Наприклад, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* відноситься до мікробіому йогурту, *L. delbrueckii subsp. indicus* [10] – індійського домашнього йогурту «дахи» (dahi), *L. kefiri*, *L. parakefiri*, *L. kefiranofaciens subsp. kefiranofaciens*, *L. kefiranofaciens subsp. kefirgranum* – кавказького кефіру.

Лікувальний ефект препаратів, які містять лактобацили, обумовлений антагоністичною дією лактобактерій по відношенню до патогенних мікроорганізмів, включаючи стафілококи, ентеропатогенні кишкові палички, протеї, шигели, що визначає корегуючу дію препарату при порушеннях бактеріоценозу. Препарати лактобактерій покращують обмінні процеси, перешкоджають формуванню затяжних форм кишкових захворювань, підвищують неспецифічну резистентність організму.

Lactobacillus reuteri виробляють речовину реутерін, яка пригнічує ріст патогенної флори в кишечнику і не впливає на ріст власної корисної флори [11].

1.4. Висновки до розділу

Для дослідження було обрано анаеробне безперервне глибинне культивування в ферментері, оскільки молочнокислі бактерії *Lactobacillus rhamnosus* GG є факультативними анаеробами і потребують незмінних умов культивування для росту.

Препарати з живих бактерій – симбіотичного мікробіому кишечника людини застосовуються для нормального біоценозу після тривалого лікування антибіотиками, при кишкових дисфункціях, гастроентеритах, колітах, в тому числі постдифтерійних і виразкових. Більшість з відомих на даний момент пробіотичних штамів мікроорганізмів є частиною нормального мікробіому організму людини або присутні в харчових продуктах, що споживаються вже кількома поколіннями людей у всьому світі. Пробіотик позитивно впливає на макроорганізм через цілий арсенал механізмів, з яких ще не все повністю розшифровано. Лікарський препарат «Према» проявляє високу активність проти широкого спектра патогенних мікроорганізмів, сприяє відновленню корисного мікробіому кишечника.

РОЗДІЛ 2

ОБ'ЄКТИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкти досліджень

2.1.1. Обладнання для культивування мікроорганізмів

Під ферментацією розуміють всю сукупність послідовних операцій від внесення в заздалегідь приготовлену і нагріте до необхідної температури середовище посівного матеріалу і до завершення процесу росту клітин або біосинтезу цільового продукту. Після закінчення ферментації утворюється складна суміш, що складається з клітин продуцента, розчину неспожитих поживних компонентів і проблем, що накопичилися в середовищі продуктів біосинтезу. Таку суміш називають культуральною рідиною.

За технологічною оформлення розрізняють наступні мікробіологічні процеси: аеробне і анаеробне культивування; твердофазне, поверхневе і глибинне культивування; періодичне і безперервне культивування. У мікробіологічних виробництвах в залежності від особливостей процесу застосовують різноманітні ферментери, або біореактори.

Апарати для аеробного поверхневої ферментації широко застосовуються для виробництва органічних кислот. Поверхнева рідкофазна ферментація протікає в так званих бродильних вентиляованих камерах, в яких на стелажах розміщені плоскі металеві кювети. У кювети наливають рідке живильне середовище (висота шару становить 80-150 мм), потім з потоком повітря, що подається середовище інокують спорами продуцента. У камері стабілізується вологість, температура і швидкість подачі повітря. Після завершення процесу культуральна рідина зливається з кювет через вмонтовані в днище штуцери і надходить на обробку.

При твердофазній ферментації процес також протікає в вентиляованих камерах, але замість кювет на стелажах розміщують лотки, в які насипають сипучу тверду

середу шаром 10-15 мм. Для кращої аерації середовища подається в камеру повітря проходить через перфоровані днище лотків.

Апарати для аеробного глибинної ферментації найбільш складні як конструкційно, так і з точки зору їх експлуатації. Головне завдання - забезпечення високої інтенсивності масо і енергообміну клітин із середовищем. За структурою потоків біореактори можуть бути апаратами повного перемішування або повного витіснення.

Конструктивні відмінності біореакторів визначаються в основному способами підведення енергії і аерації середовища:

- біореактори з підведенням енергії до газової фази;
- біореактори з підведенням енергії до рідкої фази;
- біореактори з комбінованим підведенням енергії.

Біореактори з підведенням енергії до газової фази. В апаратах цього типу аерація і перемішування культуральної рідини здійснюються стисненим повітрям, який подається в біореактор під певним тиском. До таких біореакторів відносять:

- барботажні біореактори, подача повітря в яких здійснюється через барботажні пристрої, розташовані в нижній частині апарату;
- апарати з дифузором (ерліфтні аератори), що мають внутрішній циліндр-дифузор, який забезпечує перемішування вступників по розподільних трубах в нижню частину апарату субстрату і повітря;
- трубчасті біореактори (газліфтного), що складаються з реактора кожухотрубчатого типу, через який рідина потоком повітря переміщується у верхню частину апарату і, потрапляючи в сепаратор, повертається в реактор, де знову захоплюється повітрям, піддаючись таким чином циркуляції;
- біореактори з форсунковим поширенням повітря, обладнані форсунками для подачі повітря, розташованими в нижній частині апарату, і знаходяться над ними дифузором, який забезпечує внутрішню циркуляцію рідини;
- біореактори колонного типу, що представляють собою циліндричну колону, розділену горизонтальними перегородками (тарілками) на секції; повітря

барботують через шар рідини кожної тарілки, а переміщення рідини через кільцеву щілину забезпечує протитечійне рух рідкої і газової фаз.

Біореактори з підведенням енергії до рідкої фази. До таких апаратів відносять:

- апарат з самовсмоктуючий турбіною, який має циліндричний дифузор і мішалку з порожніми лопатями і валом, при обертанні якої за рахунок створюваного розрідження відбувається самовсмоктування повітря, завдяки чому відбувається підйом рідини в кільцевому зазорі між дифузorzом і стінками апарата з наступним її поверненням в дифузор;

- біореактор з турбоежекторними пристроями - апарат, розділений вертикальними перегородками на секції, в кожній з яких є самовсмоктуюча мешалка турбінного типу (ежектор) і дифузор; для переміщення рідини з секції в секцію в перегородках зроблені вікна.

У біореакторах з комбінованим підведенням енергії здійснено підведення енергії до газової фази для аерації і до рідкої фази для перемішування. Біореактор є циліндричний посудину, забезпечений механічною мішалкою і барботером, який встановлюється, як правило, під нижнім ярусом мішалки.

Використовується також класифікація біореакторів за способом перемішування, відповідно до якої використовуються апарати з механічним, пневматичним і циркуляційним перемішуванням.

2.1.2. Характеристика лікарського препарату «Према»

Діарея, пов'язана з антибіотиками, може бути особливим питанням для тих, хто отримує агресивне лікування антибіотиками від хелікобактерної інфекції. Цей патоген також важко знищити, тому одне потрібне сліпе плацебо-контрольоване дослідження оцінило ефективність двох різних пробіотиків та однієї комбінації пробіотиків для запобігання побічним ефектам, пов'язаним з потрібною терапією проти *Helicobacter pylori*, а також щодо їх здатності покращити загальну швидкість знищення збудника [12]. Загалом 85 хворих на хелікобактер пілорі безсимптомних пацієнтів було випадковим чином розподілено в чотири групи для отримання або

однієї з пробіотичних добавок, або плацебо, як під час лікування, так і протягом семи днів після закінчення лікування потрібною терапією.

Пробіотичний препарат «Према» випускається у формі порошку (саше 2.8 г, по 10 саше в упаковці) та крапель (пляшечка 10 мл з піпеткою) [13]. Одне саше пробіотику містить 1 млрд життєздатних молочнокислих мікрорганізмів *Lactobacillus rhamnosus* GG (мікрокапсульовані). В якості допоміжних речовин застосовують фруктоолігосахариди та мальтодекстрин. У свою чергу, в 10 краплях препарату буде міститися також 1 млрд життєздатних бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG, допоміжні речовини: кукурудзяна олія, двоокис кремнію (E 551). Також випущено пробіотичний препарат «Према для дітей ДУО» в пляшечках по 10 мл з піпеткою. 5 крапель засобу містять: життєздатних бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG (мікрокапсульовані) $0,5 \times 10^9$ КУО/см³ і життєздатних бактерій *Bifidobacterium breve* BR03 $0,5 \times 10^9$ КУО/см³ (всього життєздатних бактерій — $1,0 \times 10^9$ КУО/см³). Допоміжні речовини: кукурудзяна олія, двоокис кремнію (E 551) [13].

У виробництві пробіотику «Према» застосовується технологія мікрокапсульювання. Мікрокапсули – капсули, що складаються з тонкої оболонки з полімерного або іншого матеріалу, кулястої або неправильної форми, розміром від 1 до 2000 мкм, що містить тверді або рідкі активні діючі речовини з додаванням або без додавання допоміжних речовин [14]. Найчастіше застосовують мікрокапсули розміром від 100 до 500 мкм. Термін «мікрокапсульювання» з'явився в технологічній літературі на початку 60-х років. З тих пір відзначається тенденція зростання інтересу до питань отримання мікрокапсул лікарських речовин. Про це свідчать численні публікації з даної проблеми, як у нас, так і за кордоном [15-18].

«Према саше № 10» є симбіотичним препаратом, тобто містить у своєму складі одночасно пробіотик (*Lactobacillus rhamnosus* GG) та пребіотик (харчові і волокна – фруктоолігосахариди [13]. Пребіотики – це неперетравлювані харчові волокна, які вибірково стимулюють ріст корисних бактерій товстої кишки господаря. Пребіотики є складні вуглеводи, які не перетравлюються у верхніх відділах шлунково-кишкового тракту, а розщеплюються в кінцевому відділі «корисними» бактеріями, присутніми в товстій кишці. Отже, вони не є джерелом енергії для клітин кишечника, але є

важливими субстратами для мікроорганізмів мікробіому людини. Пребіотики володіють великим терапевтичним потенціалом при захворюваннях, пов'язаних з дисбактеріозом, таких як інфекційні кишкові захворювання або алергії. Однак, як і у випадку з пробіотиками, необхідна консультація з лікарем для визначення виду пребіотика, дози, способу введення та підтвердження їх ефективності. Найбільш поширеними пребіотиками є фруктани, особливо інулін та фруктоолігосахариди. Деякі продукти харчування особливо багаті на них: банани, цибуля і часник містять олігосахариди; ендивій, цикорій і артишоки містять інулін; сухі боби і цільозернові продукти містять резистентний крохмаль. Фруктоолігосахариди (ФОС) – це суміш олігомерів, до складу яких входять від 1 до 7 залишків D-фруктози і, як правило, кінцевою є D-глюкоза [19]. ФОС – отримують двома способами:

- розчепленням інуліну;
- ферментативним переносом фруктози на сахарозу.

Олігофруктоза, як і інулін, належить до водорозчинних харчових волокон і є пребіотиком, причому більш яскраво вираженими пребіотичними властивостями володіє суміш, цих з'єднань, яку і називають фруктоолігосахаридами. Добова норма пребіотиків для дорослої людини становить 5г/добу, проте верхній допустимий рівень споживання становить 10 г/добу. Фруктоолігосахариди та галактоолігосахариди додаються до дитячих сумішей для покращення травлення у дитини, вміст цих речовин не повинен перевищувати допустимі норми – 0,8 г/100 мл. Також фруктоолігосахариди підвищують вологість і розм'якшують калові маси, що полегшує процеси травлення і випорожнення.

Показаннями для прийому даного препарату є такі хвороби, як:

- анемія;
- аскаридоз;
- atopічний дерматит;
- atopічний дерматит неуточнений;
- вірусна кишкова інфекція;
- гостра респіраторна вірусна інфекція;
- гострий трахеїт;

- дисбактеріоз;
- дискінезія жовчного міхура;
- дискінезія жовчовивідних шляхів;
- запор;
- обструктивний бронхіт;
- отит;
- позагоспітальна (позалікарняна) пневмонія;
- синдром роздратованого кишечника;
- синдром роздратованого кишечника (СРК) з запорами;
- скарлатина;
- сальмонельоз;
- функціональне порушення кишечника неуточнене;
- функціональний розлад шлунка;
- хронічний запор [13].

«Прему» в саше та краплях, а також «Прему ДУО» можна вживати дорослим та дітям від народження і старше за рекомендацією лікаря. Добова норма для дорослої людини становить 1–2 саше під час прийому їжі, розчиняючи вміст саше в 100 мл води кімнатної температури. Курс лікування становить 1 місяць або рекомендацією лікаря.

«Прему саше №10» показано застосовувати вагітним та жінкам, які годують грудьми для лікування закрепів, спазмів кишечника, діареї та дисбактеріозі. Протипоказаннями є підвищена чутливість до окремих компонентів препарату.

Зберігати препарат необхідно у оригінальні упаковці при температурі не вище 25 °С в сухому, захищеному від світла та недоступному для дітей місці. Після відкриття пляшки («Према для дітей» та «Према ДУО») зберігати при температурі не вище 25 °С не більше 1 міс. Під час зберігання допускається наявність осаду, однак це не впливає на активність продукту.

2.1.3. Фармацевтичні та терапевтичні властивості бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG

Встановлено, що пероральний прийом *Lactobacillus rhamnosus* GG протягом 5 днів до 4 тижнів полегшує клінічні симптоми запалення шлунково-кишкового тракту та atopічного дерматиту [20-21]. *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) у добовій дозі 2×10^{10} КУО додавали протягом 4 тижнів до раціону харчування дев'яти дітей (середній вік 21 місяць) з atopічним дерматитом. Зразки крові та фекалій збирали до прийому добавок та на ранній (2 тижні) та пізній стадії (4 та 8 тижнів з початку). Оцінювали концентрацію інтерлейкіну-6 (IL-6), IL-10, IL-12, фактора некрозу пухлини- α (TNF α) та інтерферону- γ (IFN γ) у сироватках крові, а також продукцію IL-2, IL-4, IL-10 та IFN γ у мононуклеарних клітинах периферичної крові, індукованих мітогеном. Секреторні IgA та TNF α також визначали у фекаліях. Концентрація IL-10 у сироватці крові суттєво відрізнялася між попередніми, ранніми та пізніми зразками ($P < 0,001$) через підвищення рівня IL-10 у сироватці крові на пізній фазі перорального прийому *Lactobacillus rhamnosus* GG. Посилення продукції IL-10 у культурах, індукованих мітогеном, передувало зростанню сироватки IL-10. Посилене покоління IL-10 *in vivo* обґрунтовує протизапальні властивості певних штамів пробіотичних бактерій та забезпечує додаткову причину для розгляду таких методів лікування пацієнтів із запаленням кишечника [22].

Відомо, що супернатант відпрацьованої культури пробіотика *Lactobacillus rhamnosus* GG виявляє антибактеріальну активність проти *Salmonella typhimurium* [23]. Однак хімічна ідентичність відповідальних протимікробних сполук залишається невідомою. Було проведено обстеження антимікробних сполук, вироблених *L. rhamnosus* GG. *Lactobacillus rhamnosus* GG утворює низькомолекулярну, термостійку, не білкову бактерицидну речовину, активну при кислому рН проти широкого кола бактерій. Супернатант відпрацьованої культури *L. rhamnosus* GG, вирощений у середовищі MRS, містив п'ять сполук, які могли б відповідати наведеному вище опису, якщо вони присутні у відповідній концентрації. На основі різних експериментальних підходів можна зробити висновок, що за випробуваних умов

росту сильна антимікробна активність *L. rhamnosus* GG проти сальмонели опосередковується молочною кислотою [24].

Найбільш значним пізнім ускладненням після відновлювальної проктоколектомії та анального анастомозу клубової кишки є паучит, який залежно від використовуваних діагностичних критеріїв та часу подальшого спостереження після операції виникає у 20–59% пацієнтів. Більшість випадків паучиту це одиничні напади, які зазвичай виникають, як відповідь на метронідазол або комбіновану терапію антибіотиками. Хороша реакція на антибіотикотерапію, спрямовану проти анаеробних бактерій, свідчить про роль бактеріальної флори у кишківнику. Пробіотики можуть впливати на фізіологію кишечника прямо чи опосередковано за допомогою модуляції ендогенної екосистеми або імунної системи. Попередні випробування пробіотиків, що містять мікроорганізм *Lactobacillus rhamnosus* GG при підтримуючому лікуванні хронічного пухліту обнадійливі [25].

Також в Інституті стоматології Гельсінського університету було проведено дослідження впливу молока, що містить *Lactobacillus rhamnosus* GG, на карієс та ризик карієсу у дітей у порівнянні зі звичайним молоком. Було включено 594 дітей віком 1–6 років із 18 муніципальних центрів денного перебування. Діти отримували молоко під час їжі із закодованих контейнерів 5 днів на тиждень у денних центрах протягом 7 місяців. Здоров'я порожнини рота у дітей реєстрували на початковому та кінцевому етапах, використовуючи критерії ВООЗ. Ризик розвитку карієсу був розрахований на основі клінічних та мікробіологічних даних, що включають рівні стрептококів мутантів із зубних відкладень та слини. Результати показали менший карієс у групі, що споживала молоко з *Lactobacillus rhamnosus* GG та нижчий рівень стрептококів мутантів наприкінці дослідження. Встановлено, що *L. rhamnosus* GG значно знижує ризик розвитку карієсу (OR = 0.56, p = 0.01; контрольований за віком та статтю, OR = 0.51, p = 0.004) [24]. Ефект був особливо чітким у віці від 3 до 4 років. Таким чином, молоко, що містить пробіотичні бактерії *Lactobacillus rhamnosus* GG [25], може мати сприятливий вплив на здоров'я зубів дітей. ВООЗ, Управління з контролю над харчовими продуктами і лікарськими препаратами США (FDA) і Організація по продуктах харчування і сільського господарства ООН (FAO) зробили

висновок висновок, що лактобацили і пробіотики в цілому вважаються безпечними і мають GRAS-статус (Generally Regarded As Safe). Це означає, що вони можуть використовуватися без обмеження в харчовій і фармацевтичній промисловості.

Проте не вщухають суперечки про безпеку пробіотиків, в тому числі і створених на основі бактерій роду *Lactobacillus*. Ризики використання лактобацил як пробіотиків пов'язують насамперед:

- з розвитком інвазивних, в тому числі опортуністичних, інфекцій;
- алергічною реакцією на них з боку макроорганізму;
- передачею генів антибіотикостійкості від пробіотичних бактерій до патогенних бактерій.

Два останніх припущення безпідставні, оскільки відомо, що пробіотики не призводять до появи у патогенних і умовно-патогенних бактерій генів резистентності до антибіотиків і не викликають негативного імунологічного, токсичного і метаболічного ефекту з боку шлунково-кишкового тракту та інших систем органів організму людини. Пробіотики можуть викликати інвазивні інфекції, а в дослідженнях *in vitro* та на тваринах виявлялася їх здатність до транслокації з кишечника.

Показано участь лактобацил у виникненні таких захворювань людини, як карієс, ревматичні ураження судин, септицемія і інфекційний ендокардит. У випадках бактеріємії, викликаній лактобацилами (*Lactobacillemia*), найчастіше виділяються *L. rhamnosus* [26], *L. paracasei* [27], *L. Plantarum* [28], значно рідше: *L. brevis*, *L. delbrueckii* [29], *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. johnsonii*, *L. salivarius*, і, ймовірно, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*. Для лактобацил не описані фактори патогенності. До небажаних властивостей відносять їх здатність викликати агрегацію тромбоцитів людини і зв'язуватися з колагеном, фібриногеном і фібронектином, однак не вдається виявити більш часте виявлення цих ознак у ізолятів від інфікованих пацієнтів.

Пробіотики не можна призначати дітям з синдромом короткої кишки (через ризик розвитку D-лактат-ацидозу), повинні застосовуватися з обережністю особами з порушеннями будови слизового бар'єру ШКТ. Також слід побоюватися пробіотиків особам з центральним венозним катетером, з сильно ослабленим імунітетом, важко

хворим людям в палатах інтенсивної терапії. В цілому, беручи до уваги велику кількість споживачів пробіотиків і лише невелику кількість осіб, у яких виявлено негативний вплив пробіотиків, можна зробити висновок, що пробіотики безпечні для більшості людей.

2.1.4. Поживне середовище та умови культивування бактерій *Lactobacillus rhamnosus GG*

Поживне середовище MRS (табл. 2.1), що було розроблене вченими DeMan, Rogosa, Sharpe призначене для виділення і культивування бактерій роду *Lactobacillus*.

Таблиця 2.1

Склад поживного середовища MRS

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л
Дріжджовий екстракт	4,00
М'ясний екстракт	10,00
Гідролізат казеїну	10,00
Глюкоза	20,00
Цитрат амонію (двовалентний)	2,00
Ацетат натрію	5,00
Твин 80	1,00
K_2HPO_4	2,00
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,20
$MgSO_4 \cdot 4 H_2O$	0,05
Сорбінова кислота	0,40
Цистеїн HCl	0,40

Для отримання твердого поживного середовища додатково додають 20 г агару. Компоненти середовища розчиняють у 1л води, доводять рН до значення 6,2 -6,5, автоклавують при 0,5 атм протягом 20-30 хв [30]. Поживне середовище для культивування бактерій роду *Lactobacillus* з етанолом містить 45 мл знежиреного

молока, 5 мл 5% дріжджевого екстракту, 50 мл 2,5% агару. Всі компоненти середовища стерилізують окремо автоклавуванням при 0,5-1 атм протягом 20-30 хв. В отримані 100 мл середовища додають 4-8% етилового спирту. Зберігають середовище не більше двох діб, оскільки спирт випаровується.

Також лактобактерії культивують на селективному середовищі Рогоса (табл. 2.2), що було розроблене Rogosa, Mitchell та Wisemann.

Таблиця 2.2

Склад поживного середовища Рогоса

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л
Пептон	10,000
Дріжджовий екстракт	10,000
М'ясний екстракт	10,000
Гідролізат казеїну	5,000
Глюкоза	20,000
Ацетат натрію	15,000
Цитрат амонію	2,000
Цитрат натрію	2,800
Твин 80	1,000
K_2HPO_4	6,000
$MgSO_4$	0,575
$MnSO_4$	0,120
$FeSO_4$	0,034

Молочне поживне середовище для культивування лактобактерій містить 100 г сухого знежиреного молока, 1,5 г цитрату натрію, 10 г глюкози, 20 г агару. Сухе знежирене молоко містить жири – 1%, білки – 36%, лактозу – 52%, мінеральні речовини – 6%. Казеїн молока утворює буферну систему, пов'язуючи велику кількість кислих метаболітів в казеїнати. Для запобігання коагуляції казеїну в молочну основу вводять розчин цитрату натрію, який володіє сильними стабілізуючими і буферними

властивостями. Підвищенню ростових властивостей живильного середовища сприяє вміст в середовищі лактози і глюкози [31].

Для отримання твердого поживного середовища додатково додають 15-20 г агару. Компоненти середовища розчиняють у 1 л води, доводять рН до значення 5,5 льодяною оцтовою кислотою, автоклавують при 3/4 атм протягом 20 хв.

Для отримання капустяного відвару 200 г подрібненої свіжої капусти залити 1 л дистильованої води і кип'ятити протягом 30 хв. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, після чого довести обсяг фільтрату водопровідною водою до 1 л. До 1л відвару додадуть усі необхідні компоненти (табл. 2.3) стерилізувати автоклавуванням при 0,5 атм. протягом 20-30 хв [32].

Таблиця 2.3

Склад капустяного середовища

Компонент поживного середовища	Концентрація, г/л
Пептони	10,0
Глюкоза	20,0
CaCO ₃	30,0
Агар	20,0

Молочнокислі бактерії при рості на даному середовищі утворюють навколо колоній зони просвітління, обумовлені перетворенням нерозчинного вуглекислого кальцію в розчинний лактат кальцію.

Для отримання рослинного відвару при приготування середовища Нетрусова необхідно 100 г подрібненої свіжої капусти або моркви залити 1 л дистильованої води і кип'ятити протягом 30 хв. Відвар профільтрувати через ватно-марлевий фільтр, після чого довести обсяг фільтрату водопровідною водою до 1 л.

На 1000 мл рослинного відвару необхідно внести дріжджовий автолізат 10,0 г дріжджового автолізату, 10,0 г пептону, та 20,0 г глюкози. Середовище стерилізують автоклавуванням при 0,5 атм протягом 20-30 хв. У інокулюване субстратом рідке поживне середовище через 18-24 год культивування внести 8-16% етиловий спирт.

Щоб приготувати щільне середовище того ж складу, необхідно додати 2% агару і 4% подрібненого крейди і стерилізувати автоклавуванням при 0,5 атм. протягом 20-30 хв. Спирт не додавати. Молочнокислі бактерії при рості на даному середовищі утворюють навколо колоній зони просвітління, обумовлені перетворенням нерозчинного вуглекислого кальцію в розчинний лактат кальцію [33].

Молоко містить всі поживні речовини, необхідні для розвитку гетеротрофних мікроорганізмів: близько 5% лактози, 5% білків, 1% мінеральних сполук, вітаміни. У молоці без добавок міститься приблизно 0,01% вільних амінокислот, що становить менш, ніж 20% амінокислот, які містяться в середовищах, що забезпечують оптимальний ріст бактерій. Для того, щоб домогтися нормального росту на середовищі з казеїном молока в якості основного джерела азоту, у організмів повинна бути певна здатність до протеолізу. Оскільки жир в молоці може несприятливо впливати на ріст деяких мікроорганізмів, молоко знежирюють. Для цього незбиране молоко центрифугують 15 хв при 700-1500 g, потім кип'ятять і відстоюють в холодильнику протягом 2 діб. Після чого стерилізують в автоклаві за 0,5 атм. 30 хв. Перед стерилізацією кислотність обрату не повинна перевищувати норму, інакше молоко згорнеться. При стерилізації в автоклаві іноді спостерігається побуріння молока внаслідок карамелізації лактози і пептонізації казеїну. При тривалій стерилізації на дно випадає осад казеїну, який може частково пептонізуватися. Перегріте побуріле молоко як середу використовувати не можна. Для росту молочнокислих мікроорганізмів обрат можна розбавити водою у співвідношенні 2:1 [34].

Рідкі поживні середовища готуються в реакторах мішалкою. Залежно від сумісності і розчинності компонентів середовищ можуть бути застосовані окремі реактори та їх системи. Якщо до складу середовища входять нерозчинні компоненти (борошно, крейда тощо), тоді технологія приготування середовища ускладнюється. Проте апаратурна схема зберігається. Реактори вибираються з якірними або іншого виду мішалками для суспензій. Для транспорту таких середовищ застосовуються спеціальні насоси, допускають наявність в середовищі твердих часточок. На сьогодні на виробництві домінує термічний метод стерилізації поживних середовищ. Холодна

стерилізація (фільтрація) використовується для термолабільних компонентів [35-37]. Такі середовища не повинні містити нерозчинних складових. Найбільш часто використовувана принципова схема стерилізації включає нагрів середовища гострою парою (в стерилізаційній колонці) з наступним витриманням при потрібній температурі і охолодження. Для економії теплової енергії лінії стерилізації комплектують з теплообмінник з підігріву поживного середовища до 80-90 °С, що охолоджується стерильною водою, парового інжектора (парової колонки) для підвищення температури стерилізації гострою парою, витримувача, розширювача, в якому відбувається швидке зниження температури середовища до 90-95°C, теплообмінників для конденсації пари із розширювача і кінцевого охолодження (після охолодження в нагрівачі свіжого середовища) поживного середовища до температури ферментації. Використовують також спрощені варіанти цієї схеми, в тому числі витримувачі без розширювачів.

Час стерилізації середовищ (витримку) регулюють шляхом вимірювання довжини труби або кількості пластинчатих теплообмінників, температуру – подачею пари підігрів. Для середовищ, що містять термолабільні компоненти, необхідний час витримки становить інколи 18-20 хвилин при порівняно низькій температурі, що досить важко реалізувати в проточних витримувачах. Контрольно-вимірювальна апаратура лінії стерилізації розташована на окремому пульті управління або на загальному пульті цеху ферментації.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. Виділення чистої культури мікроорганізмів *L. rhamnosus GG* з лікарського препарату «Према»

Морфологію, фізіологію та біохімію мікроорганізмів вивчають, використовуючи чисті культури. Чистою культурою мікроорганізмів називають таку культуру, яка є нащадками однієї клітини. Виділення чистої культури включає три етапи: отримання накопичувальної культури, виділення чистої культури, визначення чистоти виділеної культури.

Накопичувальною вважається така культури, в яких переважають представники однієї групи чи одного виду мікроорганізмів. З метою отримання накопичувальних культур створюють умови, що забезпечують розвиток мікроорганізмів. Після того, як отримана накопичувальна культура, починають виділяти чисту культуру. Вона може бути отримана із окремої колонії чи з одної клітини. Основним методом виділення чистих культур є метод Коха. Метод заснований на отриманні чистої культури із окремої колонії, яку вважають результатом розвитку однієї клітини [38].

Джерелами для виділення лактобацил служать силос і трави, харчові (особливо кисломолочні) продукти, фекалії. Для дослідження ми використовували пробіотик «Према», саме з нього виділяли чисту культуру мікроорганізмів.

Для визначення присутності та обліку кількості лактобацил наважку досліджуваного матеріалу розводять у фізіологічному розчині і висівають в рідкі накопичувальні середовища або ж відразу на тверді середовища. Оскільки в природних субстратах лактобацили не завжди займають переважаюче становище, для їх виділення використовують елективні живильні середовища, що сприяють їх росту і пригнічують ріст супутнього мікробіому. Таким чином, видові ідентифікації лактобацил передусє спочатку отримання накопичувальної культури молочнокислих бактерій, а потім – виділення чистої культури мікроорганізмів на щільних поживних середовищах (рис.2.1).

Спосіб отримання накопичувальної культур – використання елективних (селективних, накопичувальних) поживних середовищ, тобто поживних середовищ, які сприяють росту мікроорганізмів певної групи (в даному випадку – молочнокислих бактерій), а для інших є несприятливими. Це середовища з слабо кислим рН (MRS, Рогоза) або містять етанол [39-41].

Посів на рідкі елективні середовища можна проводити безпосередньо з зразка, що містить лактобацили, або з змиву з нього. Друге частіше використовують при виділенні лактобацил з рослинного матеріалу. Наприклад, при виділенні лактобацил з силосу. Наважку силосу (5 г) поміщають в колбу з 50 мл стерильної водопровідної води і 3 г піску. Колбу поміщають на качалку (180 об/хв) на 10 хв. З отриманої витяжки роблять висів на елективне середовище.

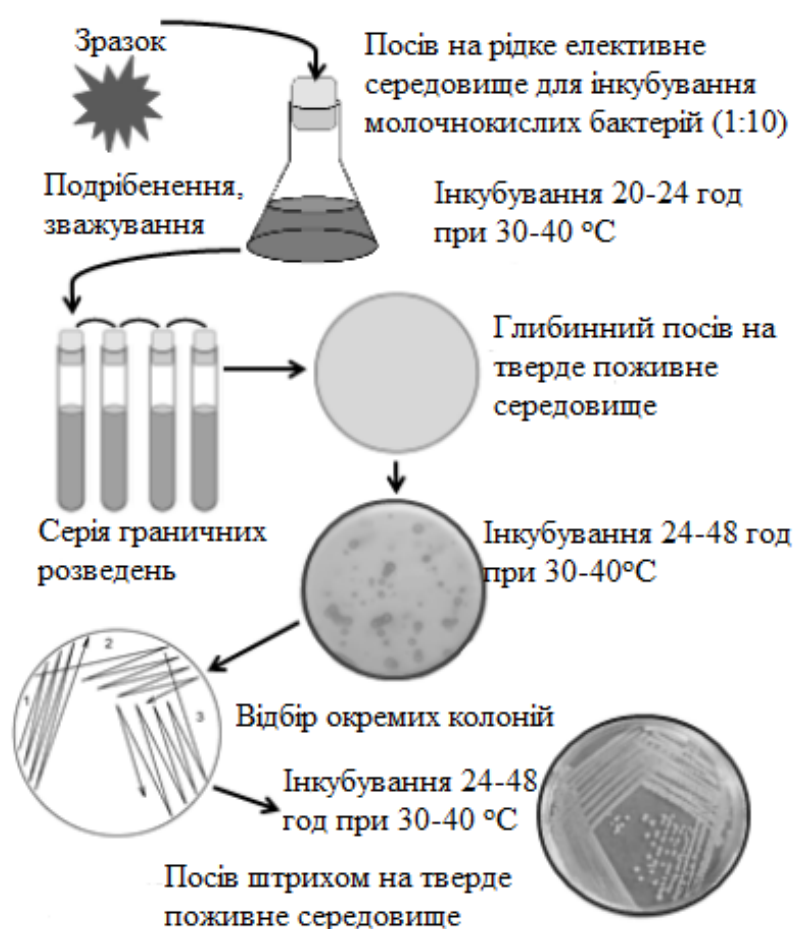


Рис.2.1. Схема виділення чистої культури мікроорганізмів роду *Lactobacillus*

Наприклад, при виділенні чистих культур аеробних мікроорганізмів висів із накопичувальної культури проводять на поверхні щільного середовища. Порядок роботи при цьому наступний. Стерильне поживне середовище, що містить агар чи желатин, розплавляють на киплячій водяній бані і розливають у стерильні чашки Петрі в такій кількості, щоб дно чашки було повністю покрито середовищем. Кришку

одразу закривають і чашку залишають на горизонтальній поверхні до того часу, поки не застигне середовище. Висів на поверхню агаризованих пластинок проводять з накопичувальної культури або з її розведень в стерильній воді. Розведення роблять таким чином, щоб отримати на поверхні середовища ізольовані колонії.

Для посіву трохи відкривають чашку Петрі в зоні полум'я пальника і на поверхню поживного середовища наносять краплю чи петлю накопичувальної культури чи розведення. Нанесену краплю обережно розподіляють скляним стерильним шпателем Дригальського, після чого цим же шпателем протирають Петрі. Зазвичай в перших чашках спостерігають суцільний ріст мікроорганізмів, в той час як в другій та третій чашках утворюються ізольовані одне від одного колонії.

Чашки після посіву поміщають у термостат кришками вниз, щоб конденсаційна вода, що утворюється на чашці Петрі після застигання агару, не завадила отримати ізольовані колонії. Чашки витримують у термостаті 2-7 діб, оскільки швидкість росту різних мікроорганізмів різна. Ізольовані колонії, що виростили, відсівають петлею у пробірки на поверхню скошеного поживного середовища або в рідке середовище.

Висів на щільні середовища з пробірок з розведеннями можна проводити двома способами: поверхневим та глибинним методом. При використанні методу поверхневого посіву (рис.2.2, справа) розплавлене і охолоджене до 45-50 °С щільне поживне середовище розливають в стерильні чашки Петрі в такій кількості, щоб дно чашки було повністю покрито (15-20 мл). Чашку залишити на горизонтальній поверхні до тих пір, поки не застигне середовище. Для посіву відкрити кришку чашки Петрі і на поверхню щільного середовища нанести піпеткою/ дозатором 100 мкл рідкої культури. Швидко розподілити краплю по поверхні середовища за допомогою скляного стерильного шпателя Дригальського (рис. 2.2).

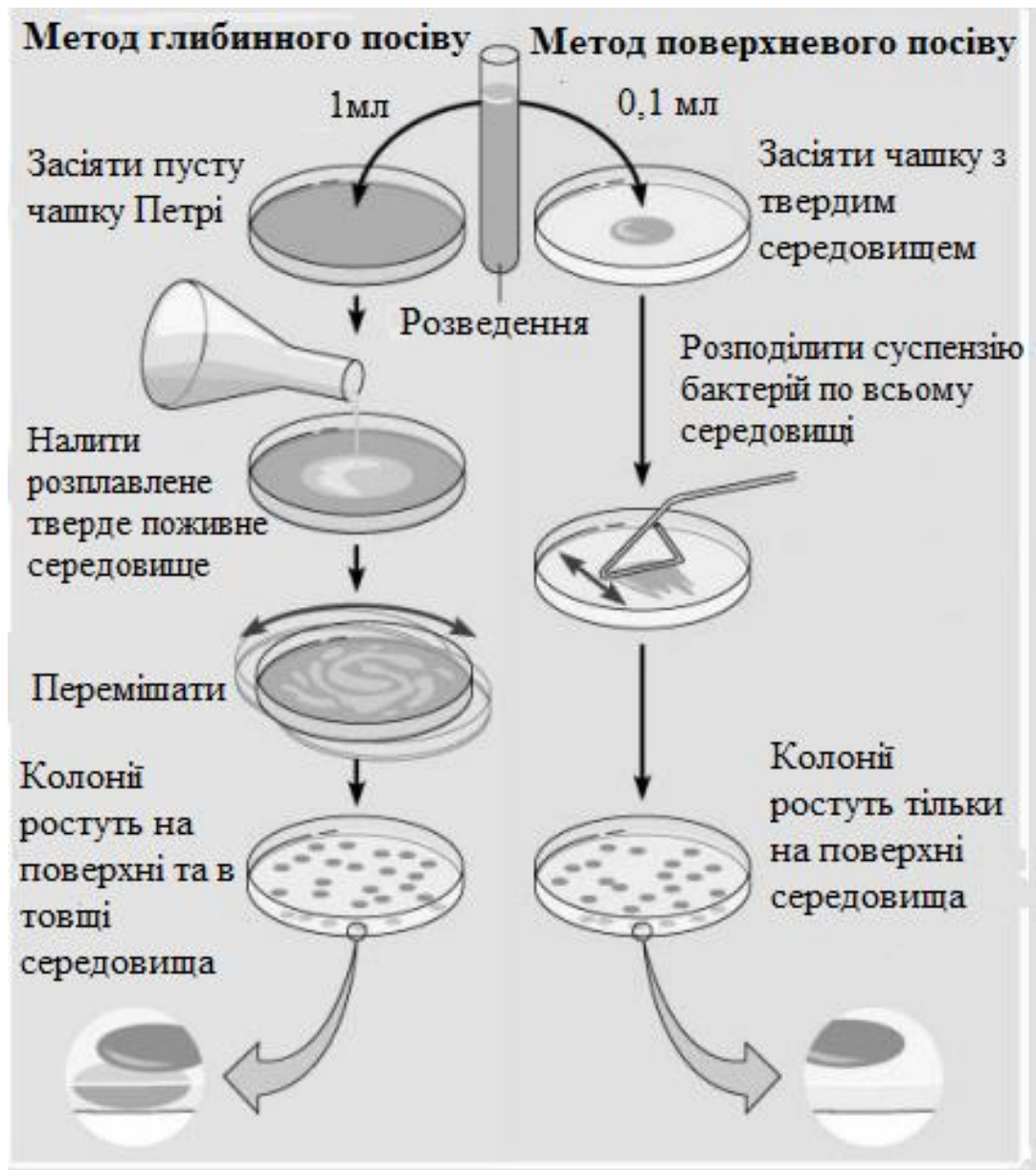


Рис. 2.2. Метод поверхневого та глибинного посіву мікроорганізмів

Ізольовані колонії факультативних анаеробів (лактобактерій) отримують шляхом глибинного посіву (рис. 2.2), цей спосіб кращий в порівнянні з поверхневим методом. Для цього тверде поживне середовище розливають у пробірки по 15-20 мл і стерилізують. Безпосередньо перед посівом пробірки поміщають в киплячу водяну баню, розплавляють, а потім охолоджують до 48-50 °С. В пробірку з охолодженим середовищем вносять 0,5 -1,0 мл розведення накопичувальної культури, перемішують, провертаючи пробірки між лодонями обох рук, а потім вміст пробірки виливають у чашку Петрі. Після того, як агаризоване середовище застигне, чашки Петрі поміщають у термостат. При посіві глибинним способом чисті колонії

опиняються у товщі агару. Такі колонії вирізають стерильним скальпелем або видобувають капілярними трубками або просто петлею і переносять у рідке середовище, сприятливе для даних мікроорганізмів.

Виділення чистої культури з однієї клітини проводять крапельним методом Лінднера, за допомогою мікроманіпулятора та мікроселектора. Виділення чистої культури анаеробних мікроорганізмів проводять також за методом Коха шляхом створення умов, що обмежують доступ кисню до культури.

2.2.2. Визначення приналежності виділених бактерій до роду *Lactobacillus*

Визначення належності виділених бактерій до роду *Lactobacillus* проводять за ГОСТ 10444.11-89 «Продукти харчові. Методи виявлення і підрахунку кількості мезофільних молочнокислих мікроорганізмів»: по відношенню до фарбування за Грамом, рухливості, наявності спороутворення і каталази.

До лактобацили, згідно ГОСТ 10444.11-89, відносяться бактерії:

- грампозитивні;
- неспороутворюючі;
- паличкоподібні (від коротких, коккоподібних до довгих);
- каталазо-негативні.

Окремо відзначають форму, розмір і колір колоній на щільному живильному середовищі.

Чистоту виділених культур визначають візуально, мікроскопуванням і повторним пересівом на поверхню агару в чашки Петрі. При візуальному контролі проглядають ріст по штриху на скошеному агаризованому середовищі. Для подальшої роботи залишають культури, ріст яких однорідний по всьому штриху. Якщо ріст неоднорідний, культуру вважають забрудненою і відкидають.

При мікроскопічному контролі готують препарати живих і фіксованих пофарбованих клітин. Чисті культури мікроорганізмів, як правило, морфологічно однорідні, допустимо лише деякі варіювання розмірів клітин. Забруднені культури відкидають. За Грамом рекомендується фарбувати клітини молодих, краще добових,

культур. На одному предметному склі рекомендується приготувати препарати трьох культур: в центрі – досліджувану культуру, праворуч і ліворуч – відомих грампозитивних (наприклад, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*) і грамнегативних (наприклад, *Escherichia coli*).

Далі наведено методику приготування посівних препаратів [43]:

1. Приготувати фіксований препарат: на знежирене предметне скло нанести краплю досліджуваної культури, розподілити на площі 4см² і висушити на повітрі. Провести фіксацію в полум'я пальника.

2. Пофарбувати протягом 2 хв карболовим генціановий або кристалічним фіолетовим. Барвник змити, що не промиваючи.

3. Нанести на мазок розчин Люголю на 2 хв, після чого розчин Люголю злити.

4. Нанести на мазок 96% -й етиловий спирт на 30-45 сек, швидко промити водою.

5. Пофарбувати мазок водним розчином фуксину протягом 2 хв. Барвник злити, препарат промити водою і висушити.

6. Мікроскопувати з імерсійною системою. Грампозитивні бактерії мають синьо-фіолетовий, грам негативні – рожево-червоний колір.

Проте, найбільш надійним способом перевірки чистоти культури є метод приготування суспензії культур змивом стерильною водопровідною водою. І каплю суспензії змішують з 8-10 мл стерильної води і суспензію мікроорганізмів розсівають на поверхню щільного поживного середовища, так як робили при розсіві накопичувальної культури. Чашки Петрі з заново засіяними середовищами поміщають на 7-10 діб при температурі 30°C в термостат. Культивовані культури зберігають в холодильнику або при кімнатній температурі.

Для ідентифікації мікроорганізмів використовують особливості їх обміну речовин, виявлених по властивості росту на діагностичних середовищах і викликати перетворення речовин, що входять в склад цих середовищ. По-перше, мікроорганізми характеризуються різною властивістю використовувати різноманітні вуглеводи і спирти в якості єдиних джерел вуглецю та енергії. Для ідентифікації більшості

гетеротрофних мікроорганізмів необхідно визначити, яким чином вуглеводи та спирти забезпечують ріст досліджуваних мікроорганізмів і якими змінами середовища супроводжується їх ріст.

Як правило, використовують такі вуглеводи: арабінозу, ксилозу, глюкозу, фруктозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу та спирти – гліцерин і маніт. Ріст на середовищах з цими сполуками може приводити до накопичення органічних кислот, нейтральних продуктів та газів. Утворення кислот реєструють по зміні рН середовища, утворення газу – по появі на поверхні середовища піни.

Середовище готують з водопровідної води з таким складом: 0,5-1,0% пептону, 0,1% K_2HPO_4 , 0,5% NaCl, 0,5-1,0% вуглеводів та спиртів. Щоб визначити зміни рН, до середовища додають індикатор бромкрезолпурпур (2 мл 1,6%-го розчину на 1л середовища). При рН 6,8 індикатор має пурпуровий колір, рН 5,2 – жовтий. Замість бромкрезолпурпуру можна застосовувати бромтимоблау (1 мл 1,6%-го розчину на 1л середовища), який при рН 6,0 жовтого кольору, а при 7,6 – синього кольору. Щоб визначити утворення газу, в середовище опускають поплавки, запаяним кінцем вверху. Разом з тим визначають характер асиміляції вуглеводів та спиртів: аеробне окислення або зброджування.

Для визначення каталазної активності на предметне скло наносять краплю 3%-го перекису водню, в ній суспендують культуру, що тестується. Або можна нанести розчин перекису водню на поверхню живильного середовища в чашці Петрі з колоніями бактерій. Каталаза, що продукується бактеріями, буде розкладати перекис водню на воду і кисень, виділення якого у вигляді бульбашок реєструється.

Якщо бактерії мають каталазну активність, то спостерігається бурхливе газоутворення через 1 -5 хв після внесення бактерій, якщо немає – газ не виділяється. В якості позитивного контролю можна взяти каталазо-позитивні бактерії *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Serratia marcescens*.

Титрована кислотність середовища (наприклад, молока, обрату) або культуральної рідини виражається в градусах Тернера (°Т) або відсотках молочної кислоти. 1 °Т відповідає 1 мл 0,1 Н розчину NaOH, що пішла на нейтралізацію (титрування) 100 мл досліджуваної середовища, розведеного водою (на 10 мл

досліджуваного середовища 20 мл води). Для титрування беруть 10 мл досліджуваного середовища, додають 20 мл дистильованої води, 1-2 краплі фенолфталеїну і титрують 0,1n розчином NaOH при постійному збовтуванні до появи стійкої слабо-рожевого забарвлення.

2.2.3. Способи культивування анаеробних мікрорганізмів

Контакт клітин анаеробів і мікроаерофілів з киснем повітря має бути зведено до мінімуму або навіть повністю виключено. Цього можна домогтися, якщо використовувати такі прийоми.

Вирощування в високому шарі середовища – найбільш простий спосіб обмеження доступу повітря до клітин мікроорганізмів. Рідке середо наливають в ємність для культивування мікроорганізмів високим шаром. Оскільки не можна стерилізувати середовища, якщо вони займають більше половини висоти посудини, частина середовища стерилізують окремо і стерильно доливають її в посудину для культивування відразу після посіву. Безпосередньо перед посівом середовище кип'ятять або прогрівають на киплячій водяній бані 30-40 хв потім швидко охолоджують, щоб в ньому не встиг розчинитися кисень повітря, і вносять на дно посівний матеріал.

Також можна застосовувати метод культивування в в'язких середовищах. Дифузія кисню в рідину зменшується зі збільшенням її в'язкості. В'язкість середовищ можна збільшити додаванням до них 0,2-0,3% агару. Також для створення анаеробних умов після посіву нашаровуються поверх рідкого середовища стерильне вазелінове масло.

Вирощування в товщі живильного середовища використовують для отримання ізольованих колоній при виділенні чистих культур або визначення чисельності анаеробних мікроорганізмів. Посівний матеріал вносять у пробірку, що містить 20-25 мл розплавленого і охолодженої до 45 °C щільного поживного середовища ретельно перемішують і переливають у кришку стерильної чашки Петрі.

Після того, як середовище застигне, щільно притискають кришку до поверхні дна чашки. Зазор між стінками дна і кришки чашки, де середовище стикається з повітрям, заливають стерильним парафіном (рис.2.3).

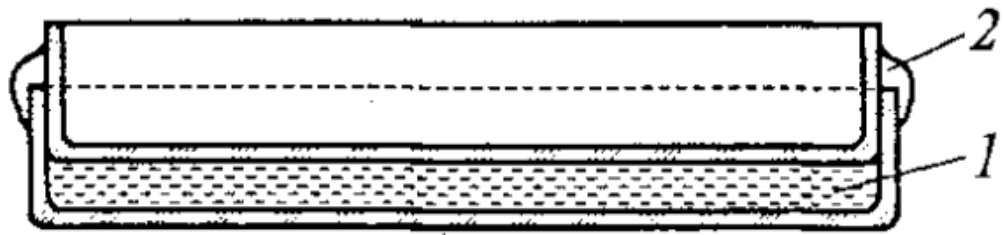


Рис. 2.3 Культивування анаеробних мікроорганізмів в чашці Петрі: 1 – агаризоване середовище, 2 – парафін

2.2.4. Визначення критеріїв оцінки біотехнологічного процесу

Як при підготовці, так і при зберіганні продукту велике санітарно-гігієнічне значення має аналіз мікробіому повітря, оскільки це може бути джерелом контамінації сировини, викликаючи псування вже готової продукції. З санітарно-мікробіологічної точки зору повітря це – середовище, в якому мікроорганізми не здатні розмножуватися. В повітрі немає поживних речовин, недостатньо води, сонячні промені володіють бактерицидною дією. Умовно мікробіом повітря можна розділити на постійну і тимчасову, що є менш стійкою до впливу різних чинників навколишнього середовища. До постійного мікробіому повітря відносяться пігментні коки, спори бактерій, цвілі і актиноміцетів, дріжджоподібні гриби і ін. Показником забруднення повітря є стрептококи, стафілококи, кишкові палички, які можуть тривалий час знаходитися в повітрі в завислому стані і переноситися разом з іншими мікроорганізмами в вигляді аерозолі.

Вживання патогенних мікроорганізмів, що знаходяться в краплях, пилу, залежить від біологічних властивостей збудника, а також температури і вологості повітря. Наприклад, збудники туберкульозу, стафілококкоза, сибірської виразки, добре переносять висихання, тривалий час зберігаються в бактеріальній пилу. Кількісний облік мікробіому повітря відбувається аспіраційним, фільтраційним та седиментаційним методами.

Аспіраційний і фільтраційний методи дозволяють визначити мікробіом, що міститься в відомих об'ємах повітря. При аспіраційному методі визначені об'єми повітря пропускають через спеціальні апарати, принцип дії яких заснований на ударній дії повітряного потоку. Наприклад, аспіратор ПУ-1Б (пробовідбірний пристрій) (рис. 2.4) призначений для автоматичного відбору проб біологічних аерозолів при проведенні санітарного контролю повітря різних приміщень і атмосферного повітря. Аспіратор забезпечує відбір проб аерозолів на щільне живильне середовище імпакційним осадження (обсяги від 50 до 1000 л, чашки Петрі 90 і 100 мм). Відібрані проби аналізуються в лабораторних умовах із застосуванням стандартних методик [44].



Рис. 2.4. Аспіратор ПУ-1Б

Переваги приладу:

- пристрій включено до Держреєстру № 14531-08;
- відповідність значень обсягів відібраної проби вимогам нормативно-методичної документації державного санітарно-епідеміологічного нагляду;
- простота і зручність в експлуатації;
- низький рівень створюваних шумів;
- малі габарити і маса;

- малий час відбору проб великого обсягу;
- стабільність технічних характеристик при тривалому використанні;
- рекомендовано Федеральним Центром ГСЕН до широкого використання;
- може оснащуватися дистанційним управлінням і таймером відкладеного запуску.

Технічні характеристики пробовідбірної пристрою ПУ-1Б:

- об'єм проби, що відбирається автоматично – 100 і 250 л (від 50 до 1000 л);
- діаметр аерозольних часток, що вловлюються з ефективністю 50% - не більше 1,4 мкм;
- діапазон концентрацій мікроорганізмів, що визначаються – $1-25 \times 10^4$ КУО/м³;
- Об'ємні витрати – не більше 300 л/мин;
- Габаритні розміри (Ш×В×Д) – 127×140×164 мм;
- Вага – 2 кг;
- Електроживлення – мережеве 220 В, 50 Гц (або від вбудованого джерела живлення).

В свою чергу, фільтраційний метод заснований на проходженні певних частинок повітря через рідину, в якій залишаються мікроорганізми. До седиментаційного належить чашковий метод, заснований на явищі «мікробного дощу», тобто на постійному осіданні мікроорганізмів повітря.

Аспіраційний та фільтраційний методи враховують всі фази бактеріального аерозолі, що міститься в 1 м³ повітря. Седиментаційний метод реєструє переважно більш великі осідаючі фази бактеріального аерозолі. Кількість мікробіому потрібно визначати за 1 м² поверхні або за площею бактеріальної чашки. В наш час на виробництвах використовують метод Кротова, як один з найбільш сучасних методів дослідження мікробіому повітря.

2.3. Висновки до розділу

Lactobacillus надзвичайно різноманітні за своїми біохімічними і фізіологічними властивостями. Однак вони всі мають метаболізм бродильного типу, при цьому щонайменше половина вуглецю кінцевих продуктів бродіння припадає на лактат. Залежно від того, які продукти утворюються в результаті бродіння, молочнокислі бактерії прийнято поділяти на 2 групи: гомоферментативні і гетероферментативні. За Грамом забарвлюються позитивно, стають грамнегативними з віком і при підвищенні кислотності.

Описані морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій *Lactobacillus rhamnosus GG*, що дає можливість віднести їх до роду *Lactobacillus*.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

3.1. Отримання чистої культури мікроорганізмів *Lactobacillus rhamnosus* GG з лікарського препарату «Према»

3.1.1. Морфологічні та фізіологічні ознаки мікроорганізму *Lactobacillus rhamnosus* GG

Lactobacillus rhamnosus GG (LGG) спочатку був виділений із зразків калу здорової дорослої людини Шервудом Горбахом та Баррі Голдвіном, це і пояснює букви GG. Його було визначено як потенційний пробіотичний штам через його стійкість до дії кислоти та жовчі, хороші характеристики росту та адгезійну здатність до епітеліального шару кишечника [1]. З тих пір це один з найбільш вивчених штамів пробіотиків, що використовується в різних комерційних про біотичних продуктах.

Корисні властивості штаму *Lactobacillus rhamnosus* GG широко вивчалися в клінічних випробуваннях. Певні пробіотики можуть чітко виключати або пригнічувати патогени, або безпосередньо діючи, або впливаючи на коменсальну мікробіоту [2,4]. Другим механізмом є здатність певних пробіотичних штамів посилювати епітеліальну бар'єрну функцію шляхом модуляції сигнальних шляхів, таких як ядерний фактор-кВ (NF-кВ), Akt та мітоген-активована протеїнкіназа (МАРК), які ведуть до наприклад, індукції слизу. Більшість пробіотичних штамів можуть також модулювати імунну реакцію господаря, надаючи специфічні для штаму місцеві та системні ефекти [7]. Вважається, що багато взаємодій між пробіотичними бактеріями та епітеліальними та імунними клітинами кишечника опосередковуються молекулярними структурами, відомими як асоційовані з мікробами молекулярні структури (МАМР), які можна розпізнати за допомогою специфічних рецепторів розпізнавання образів (PRR), таких як Toll-подібні рецептори (TLR) [40]. Незважаючи на те, що багато експериментальних даних *in vitro* та експериментів на моделях

тварин підтверджують ці механізми для пробіотичних штамів загалом та для *Lactobacillus rhamnosus* GG конкретно, більшість опублікованих даних *in vivo* у людей приділяють менше уваги механізмам дії. Тим не менше, ми вважаємо, що для оптимізованого та більш адаптованого застосування пробіотиків необхідно дуже детально зрозуміти механізми взаємодії з господарем. *Lactobacillus rhamnosus* GG є цікавою моделлю пробіотичного штаму, завдяки його широкому застосуванню, доступній послідовності геномів [9] та наявності численних нокаутуючих мутантів, що дозволяють вивчати співвідношення ген-функція [10-15].

Відомо, що нейтралізація рН культурального середовища карбонатом кальцію призводить до значного зниження антагоністичної активності досліджуваних штамів лактобактерій, що вказує на те, що антимікробний ефект їх в основному обумовлений дією молочної кислоти, і лише частково – метаболітами іншої природи. Бактерії роду *Lactobacillus*, ізольовані з плодових тіл гливи звичайної є активними кислотоутворювачами з антагоністичною активністю високого та середнього ступенів щодо умовно патогенних бактерій, бактерій представників мікробіоти гливи, не проявляють антагонізму до молочнокислих бактерій інших видів.

3.1.2. Культуральні властивості біологічного агенту

На щільних поживних середовищах (рис. 3.1) *L. rhamnosus* формують колонії сферичної форми часто сочевицеподібні, гладкі, непрозорі, іноді блискучі, опуклі, з рівними чіткими контурами. Зазвичай колонії дрібні, але у деяких видів їх розмір може перевищувати 4 мм в діаметрі. Колонії як правило, не пігментовані, білі або злегка кремового кольору, іноді - жовтуваті або червонуваті. На середовищах з білками або ліпідами зони просвітління навколо колоній зазвичай не утворюються. Тим не менше, більшість лактобацил мають слабку протеолітичної активністю (за рахунок зв'язаних з клітинною стінкою протеаз і пептидаз) і слабкою ліполітичною активністю (завдяки внутрішньоклітинній ліпазі).

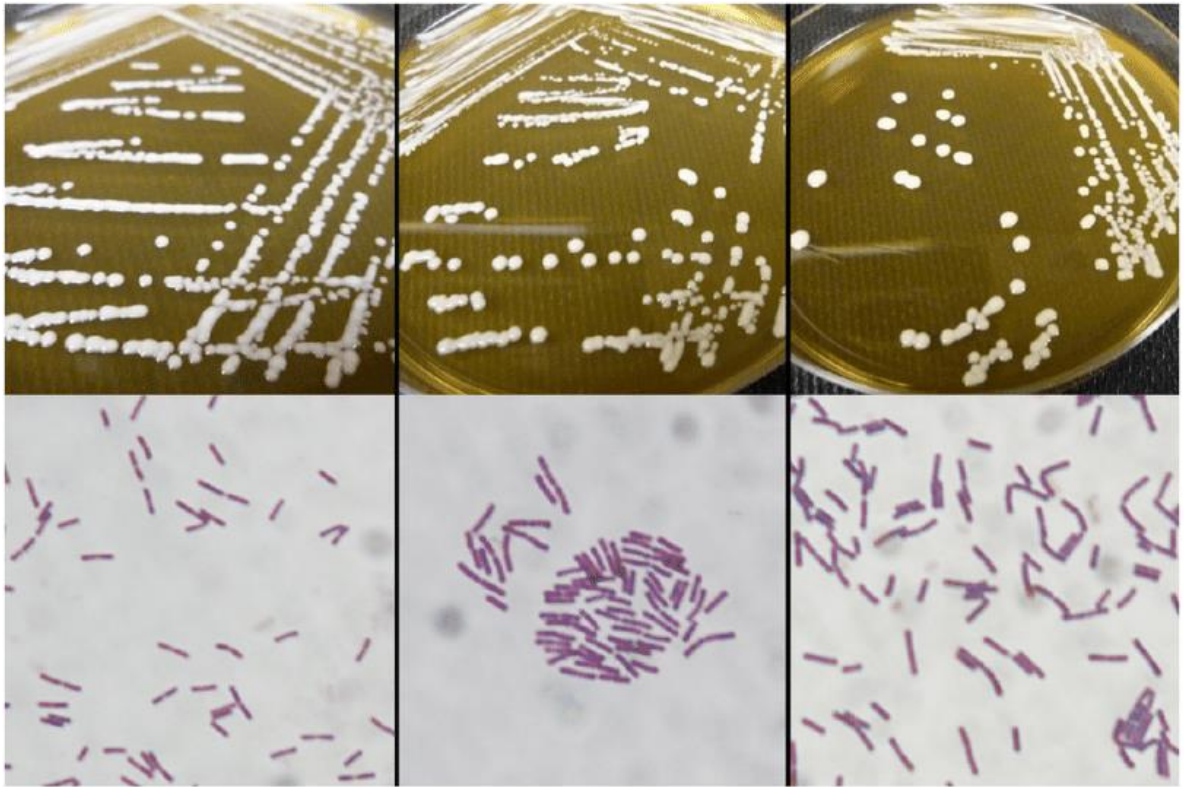


Рис. 3.1. Колонії (А) та клітини (Б) *Lactobacillus rhamnosus* GG ($\times 900$) на твердому поживному середовищі

При глибинному посіві на тверде поживне середовище утворюються щільні колонії у вигляді правильних лінз (сочевицеподібні), трикутної і неправильної форми або ніжні, нагадують сніжинку або грудочку вати. Якщо в середовище була додана крейда, то навколо колоній внаслідок накопичення молочної кислоти утворюється зона розчинення крейди. Хороший ріст спостерігається в напіврідкому поживному середовищі, що містить 0,15-0,75% агару. Невеликі концентрації агару забезпечують низький окислювально-відновний потенціал середовища і створюють сприятливі мікроаерофільні умови. За характером росту в напіврідкому середовищі виділяють п'ять варіантів: у вигляді кульок, з поздовжньою смугастістю, придонний, поверхневий, рівномірне помутніння середовища.

При розвитку на рідких поживних середовищах лактобацили найчастіше викликають рівномірне помутніння, незабаром після припинення росту осідаючи у вигляді рівного гомогенного, рідше пластівчасті осаду, ніколи не утворюючи плівок

на поверхні середовища. При визначенні каталазної активності утворення газу в пробі з перекисом водню не спостерігається, отже лактобацили не мають каталази.

3.2. Вплив різних умов культивування та зміни поживного середовища на біосинтетичну активність мікрорганізмів

Lactobacillus – хемоорганогетеротрофи. Дуже вимогливі до джерел живлення, потребують багатих складних середовищ. З вуглеводів вони переважно зброджують гексози (глюкозу, фруктозу, манозу, галактозу) і дисахариди (лактозу, мальтозу, сахарозу), і тільки гетероферментативні види, наприклад, деякі штами *L. plantarum*, зброджують пентози (рибозу, ксилозу, арабінозу). Лактоза – дисахарид, тому перш ніж вступити на шлях катаболізму, вона повинна бути розщеплена ферментом галактозидазу до глюкози і галактози. галактоза потім фосфорилується з утворенням глюкозо-6-фосфату.

Швидкість росту мікроорганізмів суттєво залежить від рН середовища (таб.3.1). Чим вище значення рН тим менша кількість клітин молочнокислих бактерій виживе.

Таблиця 3.1

Вплив рН поживного середовища на ріст молочнокислих бактерій ($M \pm m$, $n=3$)

Початкове значення рН	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см ³
5,5	22,5 \pm 1,10
6,0	23,2 \pm 1,70
6,5	24,3 \pm 1,30
7,0	13,7 \pm 0,15
7,5	14,4 \pm 1,16
8,5	10,1 \pm 0,50

Значення рН (рис. 3.2) дослідного середовища було від 5,5 до 8,5. В результаті дослідження виявлено, що рН 6,0 -6,5 є найбільш оптимальним, оскільки при цих значеннях рН спостерігалось максимальне накопичення досліджуваних клітин.

Досліджено, що більш лужні значення рН не тільки не стимулювали розвиток мікроорганізмів, а й інгібували ріст.

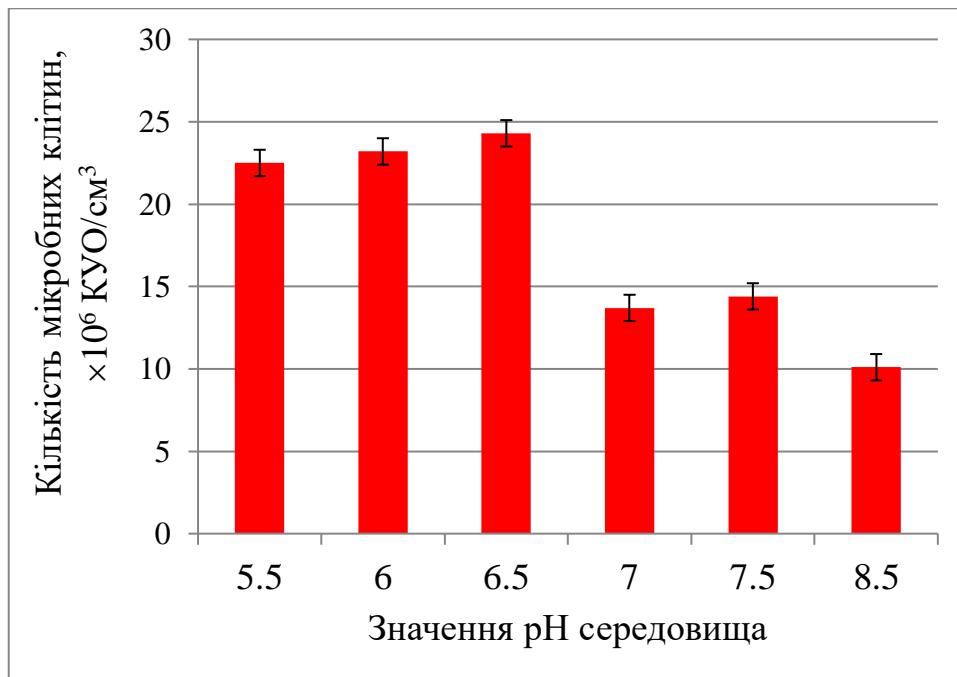


Рис. 3.2. Вплив рН на ріст молочнокислих бактерій

Було досліджено вплив зміни температурних умов на швидкість росту культури молочнокислих мікроорганізмів та визначено, що найменша швидкість росту спостерігається при температурі культивування 40 °С (табл. 3.2). Показано, що ріст культури молочнокислих бактерій досягає максимуму 37 °С, що корелює з літературними даними (рис.3.3).

Таблиця 3.2

Вплив температури на ріст молочнокислих бактерій ($M \pm m$, $n=3$)

Температура, °С	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см ³
-----------------	---------------------------------------------------------------

30	14,5±1,77
37	24,7±0,36
40	2,35±0,92
45	8,05±0,92
50	9,05±0,06

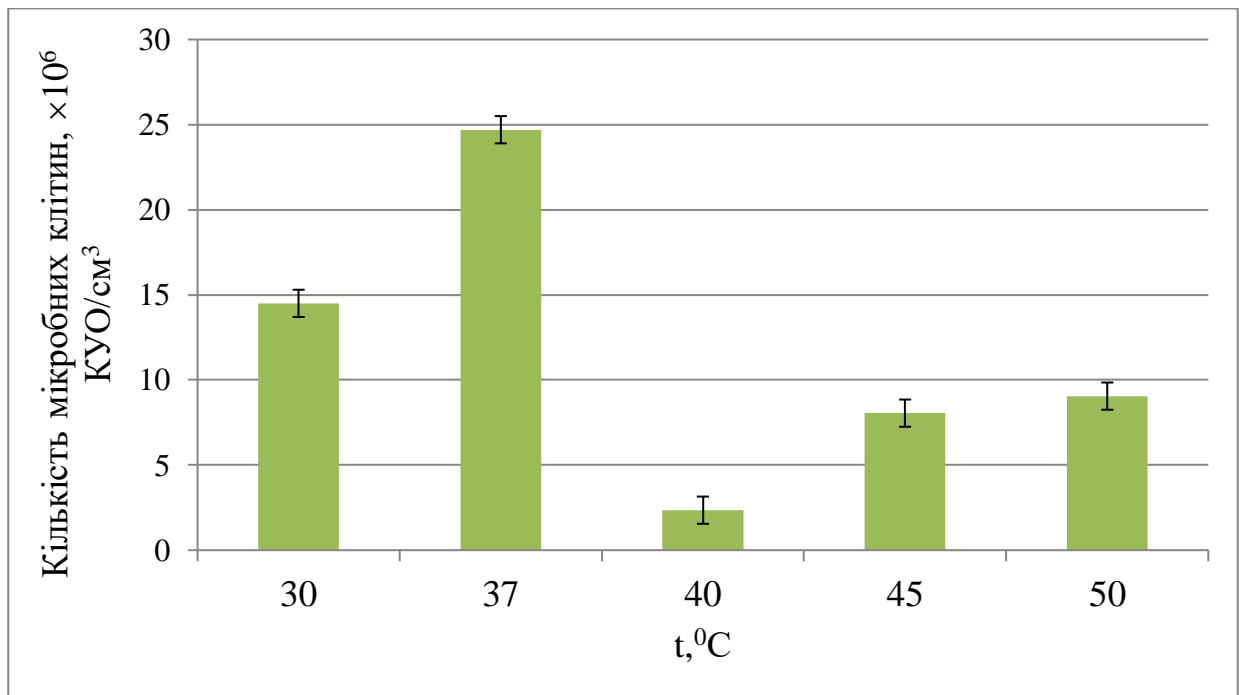


Рис. 3.3. Вплив зміни температурних умов на кількість мікробних клітин *Lactobacillus rhamnosus* GG

На рисунку 3.4 відображено вплив додавання вітаміну С, біотину та пантотенової кислоти на швидкість росту культури молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG. З'ясовано, що вже на 14 годину культивування кількість мікробних клітин становить $9,5 \times 10^6$ КУО/см³, що у 1,5 рази більше в порівнянні з контролем.

Показано, що при використанні безперервного способу культивування з додаванням віт С, пантотенової кислоти та біотину (табл. 3.3), досягнуто максимальний вихід продукту.

Таблиця 3.3

Вплив додавання пантотенової кислоти, вітаміну С та біотину на швидкість росту
молочнокислих бактерій ($M \pm m$, $n=3$)

Час культивування, год	Кількість мікробних клітин, $\times 10^6$ КУО/см ³	
	Контроль	досліджуваний зразок
0	7,3	7,4
4	7,5	7,7
8	8,2	8,3
10	8,5	8,9
12	8,8	9,2
14	8,8	9,5

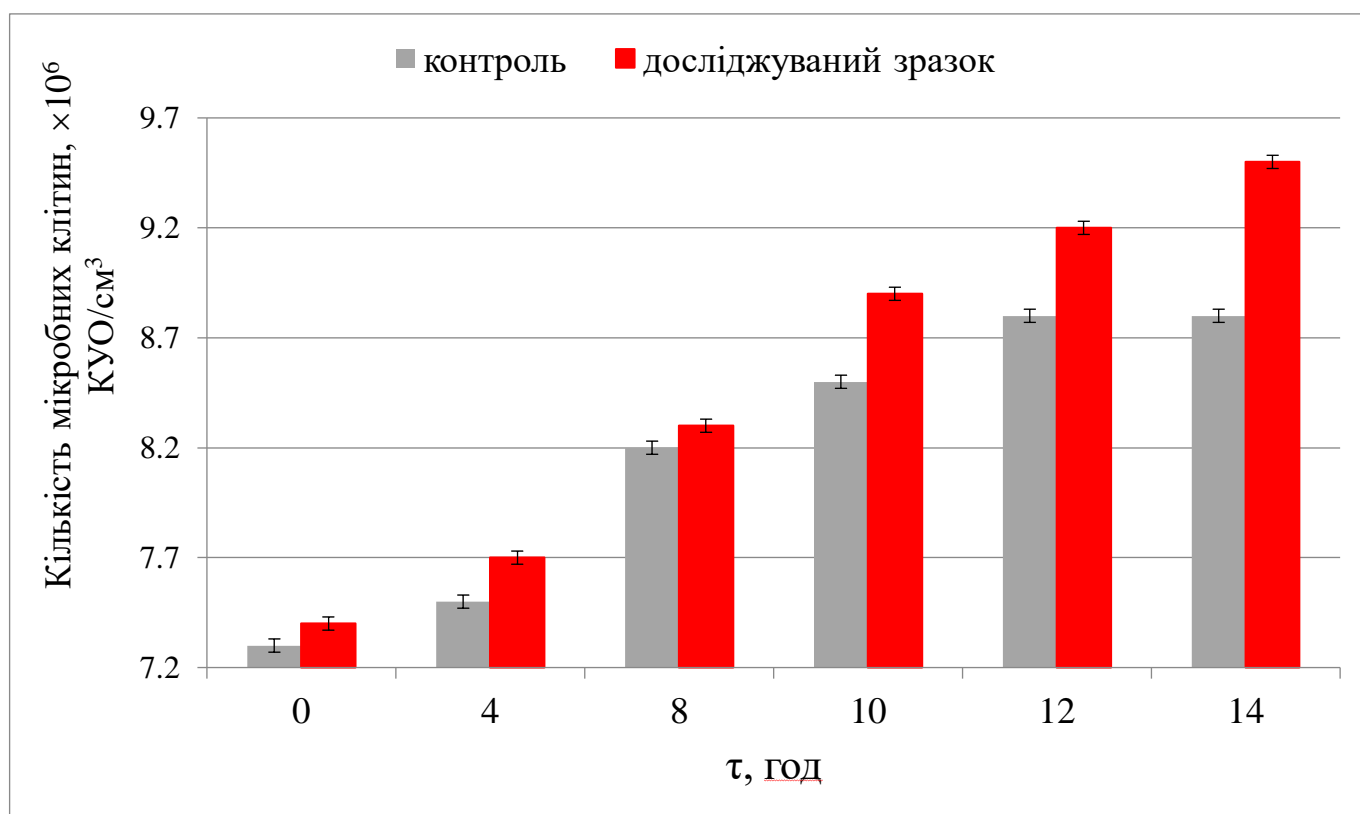


Рис. 3.4. Вплив асоціативної культури (пантотенової кислоти, вітаміну С та біотину) на життєдіяльність молочнокислих бактерій

3.3. Аналіз роботи ферментерів для культивування мікроорганізмів різних марок

Біореактори (ферментери) – це обладнання для вирощування біологічних культур в контрольованих стабільних умовах. В апаратах створюється оптимальне середовище для розмноження клітин і життєдіяльності мікроорганізмів. У пристроях здійснюється подача живильного середовища, насичення її киснем і відведення продуктів метаболізму. Біореактори знайшли широке застосування в науково-дослідних і випробувальних лабораторіях, діагностичних центрах і на виробництві в різних галузях. Апарати використовуються для біологічного синтезу, інкубування біомас, ферментації і проведення інших хімічних реакцій.

Сфера застосування біореакторів:

- біотехнології;
- мікробіологія;
- медицина і ветеринарія;
- фармацевтика;
- нафтова промисловість;
- хімічна промисловість;
- харчове виробництво;
- енергетика.

В установах різного профілю біореактори використовують для аналітичних, дослідницьких, випробувальних, виробничих цілей. У промисловості вони застосовуються в процесі створення вакцин і сироваток, виробництва медичних препаратів, біологічно активних добавок, білків, полісахаридів, сиропів, пестицидів, барвників, нафтопродуктів тощо. Від того, наскільки ферментаційне обладнання адаптовано до процесів біосинтезу, залежить вихід продукту, який багато в чому визначає продуктивність і економічні показники підприємства. У лабораторних умовах ферментери використовуються для виділення клітин з сировини тваринного походження, культивування вірусів, бактерій і дріжджів, контролю якості харчових продуктів.

Відомо, що експлуатація ферментерів пов'язана з багатьма факторами ризику, які можна розділити на дві основні групи. До першої відносяться ризики, пов'язані з необхідністю захисту культивованих мікроорганізмів і клітин від сторонньої мікрофлори. До другої – ризики, пов'язані з управління процесом ферментації. За численність ризиків процеси ферментації відносять до критичних процесів, а ферментери – до критичного обладнання.

Сучасна світова практика передбачає проведення аналізу та управління ризиками, пов'язаними з критичними процесами і критичним обладнанням. Вона знайшла своє відображення і в ініціативі US FDA (United States Food and Drug Administration), яка реалізувалася в ряді недавно опублікованих документів, що відносяться до cGMP (current Good Manufacturing Practice).

Сучасний ринок пропонує широкий асортимент біореакторів для різних цілей. При класифікації враховують призначення обладнання, функціональні можливості і конструктивні особливості апаратів.

За призначенням виділяють біореактори (рис. 3.5):

- лабораторні (для роботи з матеріалом невеликих обсягів);
- напівпромислові або пілотні (для технологічних розробок і дрібносерійного виробництва);
- промислові (для виробництва великих партій різної продукції).

За конструкцією ферментери відрізняються:

- Розташуванням цистерни – вертикальні або горизонтальні.
- Обсягом робочої камери (від 1 до 100 м³).
- Типом пристроями, : механічні, аерліфтний, повітряно-газові.
- Наявністю кисневої аерації: аеробні, анаеробні, комбіновані (апарат вибирають з урахуванням типу біологічного матеріалу, з яким працюють на підприємстві).
- Режимом роботи: безперервний, напівперіодичний і періодичний.
- Діапазоном робочих параметрів: температури, тиску, рівня розчиненого кисню.
- Додатковим функціоналом.

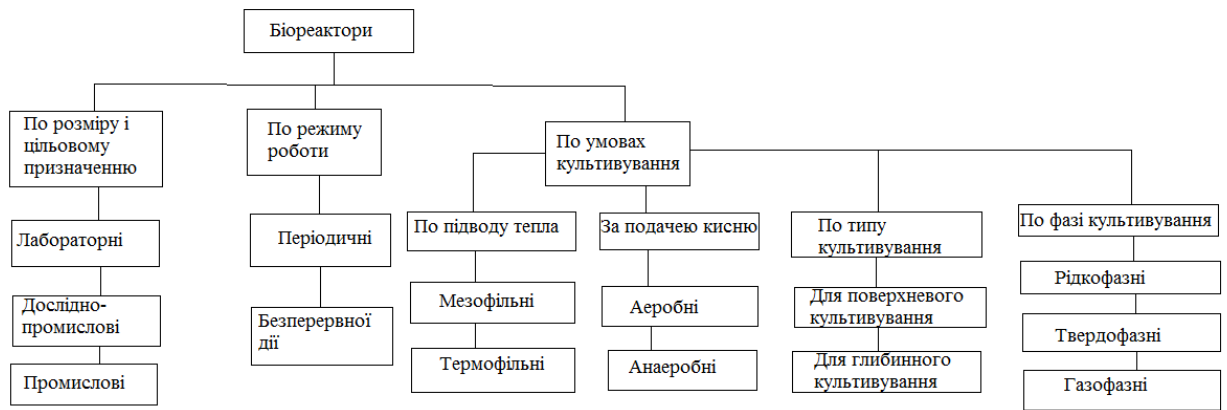


Рис. 3.5. Класифікація ферментерів для культивування мікроорганізмів

У пристрої біореакторів особливе значення мають системи теплообміну (нагрівання та охолодження), тип перемішування і спосіб стерилізації. Залежно від властивостей біологічного матеріалу для підтримки активності клітин і мікроорганізмів використовуються апарати різних модифікацій. Робота сучасних пристроїв повністю автоматизована за рахунок оснащення високотехнологічними системами управління та контролю процесів.

На рис. 3.6 зображено систему BioFlo 610 – компактний і універсальний промисловий ферментер, зі змінними ємностями об'ємом 65 і 125 літрів, стерилізацією на місці (SIP), потужним контролером, зручним сенсорним управлінням з великим монітором. Ферментер побудовано на мобільного вузької рамі, яка проїде практично через будь-які дверні прорізи.

Особливості ферментера BioFlo 610:

- модульний дизайн забезпечує гнучкі можливості додавання і заміни окремих компонентів системи в будь-який час, бічні порти дозволяють проводити швидко установку і кріплення необхідних зондів, є кілька варіантів подачі газу в залежності від потреб процесу;
- для зразків використовуються ємності з полірованої нержавіючої сталі марки 316 L зі співвідношенням розмірів ємностей 3:1 і загальним об'ємом 65 літрів (місткість 16-50 літрів) і 125 літрів (місткість 31-100 літрів);
- ємності обладнані всіма необхідними датчиками: рН, розчиненого кисню, рівня піноутворення, додатковими вхідними портами для установки додаткових

датчиків, пристроями подачі субстрату, піногасниками, газів, відведення метаболітів, асептичного відбору проб, конденсором і оглядовим віконцем з підсвічуванням;

– перемішування за допомогою лопатевої мішалки зі швидкістю 50-700 об/хв для ємностей на 65 літрів і 50-500 об/хв для ємності об'ємом 125 літрів (в стандартній комплектації встановлюється подвійна лопатева мішалка, однак при необхідності можна вибрати мішалку іншого типу в залежності від культури);

– сучасний і потужний контролер, відстеження до 32 параметрів одночасно;

– 15" сенсорний дисплей одночасно показує до 8 параметрів;

– для полегшення роботи можна зберегти/ змінити/ видалити до 10 наборів команд в пам'яті приладу;

– 2 USB для оновлення ПЗ і передачі даних на ПК;

– три перистальтичних насоса, модуль вагового дозування і тензодатчик;

– системи поставляються з автоматичною програмою стерилізації.



Рис. 3.6. Ферментер BioFlo 610, виробник – New Brunswick Scientific (Нью-Джерсі, США)

Зовнішні розміри ферментеру становлять 1220×86×2390 мм, швидкість перемішування – 50-700 об/хв, постійна швидкість насосу – 100 об/хв.

Пілотний біореактор CelliGen Pro (рис. 3.7), 75-650 літрів, призначений для пілотних і виробничих процесів, а також стадій масштабування при великомасштабному виробництві. Відкрита рамна конструкція забезпечує легкий доступ до компонентів – корпусам фільтрів, клапанів, температурному контуру, ліній живлення і стоку конденсату. Центральне розташування входів і виходів для пари, води, повітря зводить до мінімуму час і зусилля, необхідні для підготовки до роботи. Біореактор виробляють з робочими ємностями на 75, 150, 300 і 650 літрів. Повністю модульна система біореактора CelliGen Pro випускається з безліччю компонентів, які можуть бути додані, видалені або змінені в будь-який час відповідно до вимог до процесу.



Рис. 3.7. Ферментер CelliGen Pro, виробник – New Brunswick Scientific (Нью-Джерсі, США)

Особливості роботи ферментеру:

- автоматична програма стерилізації;

- термінал управління з великим, кольоровим інтерфейсом;
- ємності обладнані всіма необхідними датчиками: рН, розчиненого кисню, рівня піноутворення, додатковими вхідними портами для установки додаткових датчиків, пристроями подачі субстрату, піногасників, газів, відведення метаболітів, асептичного відбору проб, конденсором і оглядовим віконцем з підсвічуванням;
- автоматичний контроль і управління за допомогою стандартного промислового (PLC) програмованого контролера, побудованого на основі принципів GaMP;
- 4 вбудованих перистальтичних насоса з фіксованою швидкістю (опція: зовнішній насос зі змінною швидкістю).
- система подачі суміші з 4-х газів (CO₂, O₂, N₂ і повітря);
- перемішування за допомогою верхньоприводної пропелерної мішалки для ємностей 75-300 літрів, і нижньопривідною для ємностей 650 літрів зі змінними насадками;

3.4. Висновки до розділу

Виявлено, що при проведенні процесу біосинтезу протягом 14 годин з додаванням до середовища віт С, пантотенової кислоти та біотину кількість молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* GG збільшилась у 4 рази. Визначено, що при зміні рН в лужну сторону біомаса мікроорганізмів *L. rhamnosus* GG зменшується у 1,5 рази. Досліджено, що ріст культури молочнокислих бактерій досягає максимуму 37 °С, що корелює з літературними даними. Показано, що при використанні безперервного способу культивування з додаванням віт С, пантотенової кислоти та біотину, досягнуто максимальний вихід продукту.

РОЗДІЛ 4 ОХОРОНА ПРАЦІ

4.1. Небезпечні та шкідливі виробничі фактори в лабораторії контролю якості пробіотика «Према»

Вплив небезпечних та шкідливих виробничих факторів було розглянуто в лабораторії контролю якості пробіотика «Према», оскільки саме лабораторія контролю якості є однією з ключових у виробничому процесі. До небезпечних та шкідливих виробничих факторів в лабораторії контролю якості, можна віднести такі фізичні (підвищена яскравість світла, підвищена або знижена температура поверхні обладнання, матеріалів, підвищений рівень ультрафіолетової радіації, підвищений рівень електромагнітних випромінювання), біологічні (патогенні мікроорганізми (бактерії, віруси, спірохети, гриби, найпростіші) та продукти їх життєдіяльності).

Джерелами підвищеної яскравості світла в лабораторії контролю якості пробіотику «Према» є лампи над робочою зоною (боксах). Яскраве світло, а в поєднанні з вогнем (полум'я від пальника або спиртівки), і тепловий вплив здатні викликати захворювання «синдром сухого ока», привести до опіків рогівки, почервоніння і зайвої сльозоточивості. Зазвичай у лабораторіях нерівномірне освітлення, занадто яскрава робоча зона (бокс) та мало освітлені всі інші частини лабораторії. Це призводить до зниження продуктивності праці та збільшення вірогідності помилкових дій, які можуть привести до нещасних випадків, або контамінації готового продукту. Найменша освітленість у виробничих приміщеннях регламентується ДБН В.2.5-28-2006 і визначається характеристикою зорової роботи [4]. Найбільша нормована освітленість складає 5000 лк (розряд перший а), а найменша – 30 лк. Джерелом штучного освітлення можуть виступати лампи розжарювання та газорозрядні лампи [4].

Підвищена або знижена температура поверхні обладнання може призвести до уражень шкіри. Окрім того, значне перегрівання організму супроводжується

порушенням водно-електролітного обміну, циркуляторними розладами, периваскулярним та перицелюлярним набряками, дрібноточковими крововиливами у мозок, що призводить до втрати свідомості з можливими негативними наслідками. Перегрівання організму може привести до так званих теплових поразок, які характеризуються анемічним, серцево-судинним і шлунково-кишковим синдромами. В лабораторії досить багато обладнання, яке під час роботи має властивість нагріватися, підвищуючи цим температуру повітря робочої зони. Серед такого обладнання термостати, сухожарові шафи, автоклави, центрифуги та плити. Необережне поводження з обладнанням може призвести до опіку та травм, тому воно повинно бути захищене для безпеки працівників підприємства.

У виробничих умовах має місце вплив ультрафіолетових променів з довжиною хвилі від 36 до 220 нм. У лабораторії контролю якості пробіотику «Према» основним джерелом ультрафіолетового опромінення є кварцеві лампи, для стерилізації повітря у боксах.

На відміну від теплових променів, основною властивістю яких є розвиток гіперемії в ділянках, які зазнали опромінення, дія на організм ультрафіолетових променів представляється значно складнішим. Ультрафіолетові промені щодо мало проникають через шкіру і їх біологічне дію пов'язано з розвитком багатьох нейрогуморальних процесів, що обумовлюють складний характер впливу їх на організм.

Серед електромагнітних полів, породжених електричними зарядами і їх рухом, прийнято відносити до випромінювання ту частину змінних електромагнітних полів, яка здатна поширюватися. Випромінювання електромагнітного спектра при певних рівнях можуть чинити негативний вплив на організм людини, тварин та інших живих істот, а також несприятливо впливати на роботу електричних приладів. Різні види неіонізуючих випромінювання (електромагнітних полів, ЕМП) надають різну фізіологічну дію. На практиці виділяють діапазони магнітного поля (постійного і квазіпостійного, імпульсного), ВЧ і СВЧ-випромінювання, лазерного випромінювання, електричного і магнітного поля промислової частоти від високовольтного обладнання та ін. Найпотужнішими джерелами електромагнітних

полів є мікрохвильові печі, які використовують ся в лабораторіях для розплавлення поживного середовища. Також небезпечними є сухо жарові шафи, витяжки, холодильники, обігрівачі, комп'ютери, блоки живлення і зарядні пристрої. Що вища потужність приладу, то вищий і рівень ЕМП, які він створює.

У лабораторії контролю якості можливе забруднення повітря робочих приміщень, одягу персоналу, поверхонь і обладнання мікроорганізмами і продуктами їх життєдіяльності. Це відбувається під час контролю відібраних проб, виділення чистої культури, а також із зразків, чашок Петрі і колб, які відправляються на утилізацію.

Повітря робочої зони також забруднюється хімічними речовинами, використовуваними при аналізі, а також виробляються мікроорганізмами. Правила організації роботи в лабораторії, своєчасності з мікроорганізмами повинні відбуватися відповідно ДСП 9.9.5.-080-02.

4.2. Технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів в лабораторії контролю якості пробіотика «Према»

Для зменшення негативної дії підвищеної яскравості світла на організм працівника необхідно рівномірно розподіляти місця та яскравість встановлення ламп у всьому приміщенні лабораторії, щоб не було різких перепадів освітлення. До колективних засобів нормалізації освітлення належать джерела світла, освітлювальні прилади, світлозахисні прилади, світлофільтри. До засобів індивідуального захисту очей належать захисні окуляри [42].

Разом з тим надмірна локальна яскравість може викликати засліплення. Коли в поле зору потрапляє яскраве джерело світла, очей на якийсь час втрачає здатність розрізняти предмети. Осліплення може бути прямим, коли воно викликано знаходження яскравих джерел світла в поле зору, або відбитим, коли світло відбивається від поверхонь з високим коефіцієнтом відображення. Людське око

захищається від поразки занадто яскравим світлом за допомогою кліпання, повороту очей і руху голови при впливі яскравого світла.

При організації раціонального освітлення, виборі джерел світла і світильників враховуються призначення приміщення, його розміри і категорія по вибухо- та пожежонебезпеці, можливі забруднення (пил, газ, пари), характеристика і розряд виконуваної роботи.

У системах виробничого освітлення застосовують люмінесцентні газорозрядні лампи, що мають форму циліндричної скляної трубки. Внутрішня поверхня трубки покрита тонким шаром люмінофора, який перетворює ультрафіолетове випромінювання газового електричного розряду в видиме світло. Люмінесцентні газорозрядні лампи в залежності від застосовуваного в них люмінофора створюють різний спектральний склад світла. Розрізняють декілька типів ламп: денного світла, денного світла з покращеною передачею кольору, холодного білого, теплого білого і білого світла.

Якісні показники освітлення в виробничих приміщеннях багато в чому визначаються правильним вибором світильників, що представляють собою сукупність джерела світла та освітлювальної арматури. Основне призначення світильників полягає в перерозподілі світлового потоку джерел світла в необхідних для освітлення напрямках, механічному кріпленні джерел світла і підводі до них електроенергії, а також захисту ламп, оптичних і електричних елементів від впливу навколишнього середовища.

Засоби захисту від знижених або підвищених температур поверхонь обладнання, матеріалів: огорожувальні пристрої; пристрої автоматичного контролю і сигналізації; термоізолюючі пристрої; пульта дистанційного управління [25].

Одним з найпоширеніших засобів захисту від впливу статичної електрики є зменшення генерації електростатичних зарядів або їх відведення з наелектризованого матеріалу, що досягається шляхом заземлення металевих електропровідних елементів обладнання, збільшення поверхонь і об'ємної провідності діелектриків, установки нейтралізаторів статичної електрики (індукційних, високовольтних, рідких і ін.).

Ефективним засобом захисту є збільшення відносної вологості повітря до 65-75%, коли це можливо за умовами технологічного процесу. Як засоби індивідуального захисту застосовують антистатичне взуття, антистатичний халат, заземлюючі браслети [25].

Основними методами і засобами захисту від УФ-випромінювання є: захисний одяг з довгими рукавами і капюшоном; протисонячні екрани; забарвлення приміщень водними складами (крейдяним і вапняним); окуляри зі склом, що містять оксид свинцю.

Приміщення з ультрафіолетовими бактерицидними лампами можна поділити на дві групи:

А – знезараження відбувається у присутності людей протягом робочого дня;

Б – знезараження повітря здійснюють при відсутності людей [63].

Бактерицидне опромінення в місцях перебування людей та на робочих місцях не повинна перевищувати $0,2 \text{ мкВт/см}^2$ при довжині хвилі опромінення 254 нм. Також слід враховувати, що при збільшенні відносної вологості до 80 % бактерицидна дія падає на 30 % через ефект екранування мікроорганізмів.

Час можливого безпечного перебування людини в приміщенні, в якому працює екранована ультрафіолетова бактерицидна лампа при значенні щільності бактерицидного потоку випромінювання більше $0,2 \text{ мкВт/см}^2$, обчислюється за формулою [63]:

$$t(c) = \frac{6000}{p},$$

де $t(c)$ – час (в секундах) безпечного перебування людини в приміщенні;

6000 – поверхнева доза (мкДж/см^2) бактерицидного опромінення при вимірюванні УФ-опромінення з довжиною хвилі 254 нм, яку безпечно для здоров'я може отримати людина за кожні 8 годин безперервного перебування в приміщенні, в якому працює ультрафіолетова бактерицидна лампа;

p – бактерицидне опромінення (поверхнева щільність бактерицидного потоку випромінювання при вимірюванні УФ-опромінення з довжиною хвилі 254 нм,

мкВт/см²), що виміряна за допомогою ультрафіолетового радіометру в конкретній точці приміщення, для якої розраховується час безпечного перебування людини [63].

В нашому випадку, ми розраховуємо час можливого безпечного перебування з бактерицидною щільністю 0,73 мкВт/см²:

$$6000/0,73 = 8219 \text{ с.}$$

Час перебування працівників у виробничій лабораторії з увімкненою лампою ультрафіолетового випромінювання без шкоди для здоров'я становить 2 год 30 хв.

4.3. Забезпечення пожежної та вибухової безпеки в лабораторії контролю якості пробіотика «Према»

Пожежна безпека об'єкта повинна забезпечуватися системами запобігання пожежі і протипожежного захисту, в тому числі організаційно-технічними заходами. Системи пожежної безпеки повинні характеризуватися рівнем забезпечення пожежної безпеки людей та матеріальних цінностей, а також економічними критеріями ефективності цих систем для матеріальних цінностей, з урахуванням всіх стадій (наукова розробка, проектування, будівництво, експлуатація) життєвого циклу об'єктів і виконувати одну з наступних завдань [54]:

- виключати виникнення пожежі;
- забезпечувати пожежну безпеку людей;
- забезпечувати пожежну безпеку матеріальних цінностей;
- забезпечувати пожежну безпеку людей і матеріальних цінностей одночасно.

Об'єкти повинні мати системи пожежної безпеки, спрямовані на запобігання впливу на людей небезпечних факторів пожежі, в тому числі їх вторинних проявів на необхідного рівні.

Небезпечними факторами, які впливають на людей і матеріальні цінності, є:

- полум'я і іскри;
- підвищена температура навколишнього середовища;

- токсичні продукти горіння і термічного розкладання;
- дим;
- знижена концентрація кисню.
- До вторинних проявів небезпечних факторів пожежі, яке впливає на людей і матеріальні цінності, відносяться:
 - осколки, частини зруйнованих апаратів, агрегатів, установок, конструкцій;
 - радіоактивні та токсичні речовини і матеріали, що вийшли із зруйнованих апаратів і установок;
 - електричний струм, що виник в результаті винесення високої напруги на струмопровідні частини конструкцій, апаратів, агрегатів.
- Для попередження пожежі необхідно дотримуватися наступних заходів захисту;
 - застосуванням негорючих і важко горючих речовин і матеріалів;
 - обмеженням маси і (або) обсягу горючих речовин, матеріалів і найбільш безпечним способом їх розміщення;
 - ізоляцією горючого середовища (застосуванням ізольованих відсіків, камер);
 - підтриманням безпечної концентрації середовища відповідно до норм і правил та іншими нормативно-технічними, нормативними документами та правилами безпеки;
 - достатньою концентрацією флегматизатора в повітрі;
 - підтриманням температури і тиску середовища, при яких поширення полум'я виключається;
 - максимальна механізація і автоматизація технологічних процесів, пов'язаних з обігом горючих речовин;
 - установка пожежонебезпечного устаткування по можливості в ізольованих приміщеннях або на відкритих майданчиках;

– застосуванням пристроїв захисту виробничого обладнання з горючими речовинами від пошкоджень та аварій.

Джерелами пожежі в лабораторії можуть бути хімічні речовини, при не правильному їх зберіганні:

– Легкозайmistі рідини є леткими за своєю природою і виділяють пари при навколишньому або підвищених температурах, які можуть спалахнути в присутності іскор, конфорок, відкритого полум'я або інших гарячих поверхонь (наприклад, ацетон, ефір, метилетилкетон, метилізобутилкетон, спирти, циклогексанон).

– Горючі рідини – це ті, пари яких самозаймаються при нагріванні до температури спалаху (мазут, бензин, гас).

– Легкозайmistі тверді речовини. Metали: натрій, літій, магній, алюміній тощо.

– Неорганічні сполуки: гептасульфід фосфору, сульфід калію, амід літію та декаборан.

– Пірофорні речовини самозаймаються при контакті з повітрям. Такі матеріали зберігаються в герметичних та захищених від повітря повільних контейнерах у прохолодному та сухому середовищі. Жовтий і білий фосфор слід зберігати і розрізати під водою.

– Легкозайmistі гази, такі як водень, ацетилен, пропан, метан тощо при контакті з окислювачем та у присутності джерела займання мимовільно згорають. Резервуари та трубопроводи таких газів слід регулярно перевіряти на предмет витоків, щоб запобігти утворенню вибухонебезпечних сумішей з повітрям.

Обережне поводження з горючими та легкозайmistими матеріалами може запобігти великим лабораторним пожежам, і з цієї причини в лабораторії повинні бути видно знаки безпеки та інструкції.

4.4. Висновки до розділу

Було визначено небезпечні та шкідливі виробничі фактори, технічні та організаційні заходи для зменшення рівня впливу небезпечних та шкідливих виробничих факторів у лабораторії контролю якості пробіотика «Према», а також забезпечення пожежної та вибухової безпеки.

Серед небезпечних та шкідливих факторів лабораторії важливе місце займає підвищений рівень забруднення. Для регулювання якості повітря використовують вентиляційне обладнання.

РОЗДІЛ 5

ОХОРОНА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

5.1. Основні джерела забруднення водою фармацевтичним виробництвом

В Європейському регіоні ВООЗ спостерігається значне зростання споживання лікарських засобів, що застосовуються для боротьби із захворюваннями і для поліпшення стану здоров'я населення. При цьому результати досліджень по всьому світу показують, що половина всіх лікарських препаратів призначається, розподіляється чи реалізується неналежним чином і що половина всіх пацієнтів не приймає препарати відповідно до рекомендацій лікаря. Крім негативного впливу на здоров'я людей і надмірних витрат фінансових ресурсів, застосування – в тому числі неналежне – лікарських засобів може вкрай негативно позначитися на дикій природі і екосистемах, особливо в разі неправильної утилізації невикористаних ліків.

За останні роки особливо зросло споживання визначених груп лікарських препаратів, що свідчить про широкі зміни як в демографічній ситуації, так і в способі життя населення. У деяких країнах набуло поширення використання лікарських препаратів в профілактичних цілях. Так, наприклад, після аналізу на біомаркери – вони застосовуються для оцінки ймовірності розвитку деяких захворювань – нерідко призначають ліки навіть тоді, коли ризики для здоров'я відносно низькі [32].

Наприклад, в Англії тільки за один рік частота призначення лише одного виду статину для зниження рівня холестерину зросла з 12,8 млн до 18,2 млн. Також, за наявними даними, в 29 країнах Європейського регіону рівень споживання антидепресантів в період з 1995 по 2010 р щорічно зростав в середньому на 20%. Крім того, у багатьох країнах регіону зафіксовано значне зростання призначення антибіотиків, протиепілептичних препаратів, антидепресантів, проти діабетичних препаратів і деяких анальгетиків.

Останнім часом антропогенний вплив на навколишнє середовище приймає критичне значення. У неблагополучному природному середовищу проживає в даний

момент близько 40 мільйонів наших громадян. Це ще раз говорить про те, що вітчизняна промисловість заснована не на енерго- і ресурсозберігаючих технологіях виробництва продукції. Така ситуація не стимулює впровадження природоохоронних і ресурсозберігаючих технологій. В кінцевому рахунку цим визначається і рівень конкурентоспроможності в світі.

Фармацевтичне виробництво базується на широкому використанні машин, апаратів, технологічних ліній і застосуванні специфічних способів очищення сировини та утилізації відходів виробництва. [5,10]. Однією з особливостей фармацевтичного виробництва є, з одного боку, необхідність захисту самого лікарського засобу від забруднення (часток пилу, мікробної контамінації тощо, а, з іншого боку, захист персоналу і навколишнього середовища від впливу шкідливих факторів виробництва. Фармацевтична промисловість має свою систему контролю якості лікарських препаратів і охорони навколишнього середовища при їхньому виробництві, що постійно удосконалюється з урахуванням розвитку нових технологій, GMP і вимог, які пред'являються ринком до галузевих нормативних документів.

На рис. 5.1 представлена схема організації виробництва лікарських препаратів і перераховані можливі види відходів та джерел забруднення лікарських препаратів [22].

Мета екологічного маркетингу – забезпечення довгострокового благополуччя підприємства в умовах підвищених вимог до екологізації виробництва лікарських препаратів; задоволення розумних, здорових потреб споживачів відповідно до екологічних запитів; формування екологічно орієнтованої кон'юнктури ринку і забезпечення випуску конкурентоспроможної продукції на внутрішньому і зовнішньому ринках. Важливою складовою в системі екологічного маркетингу є екологічний аудит.

Екологічний аудит – це перевірка підприємства незалежними уповноваженими особами з метою оцінки організації стану природоохоронної діяльності підприємства. Об'єктивна оцінка стану природоохоронної діяльності підприємства можлива тільки за умов упровадження екологічного моніторингу [22].

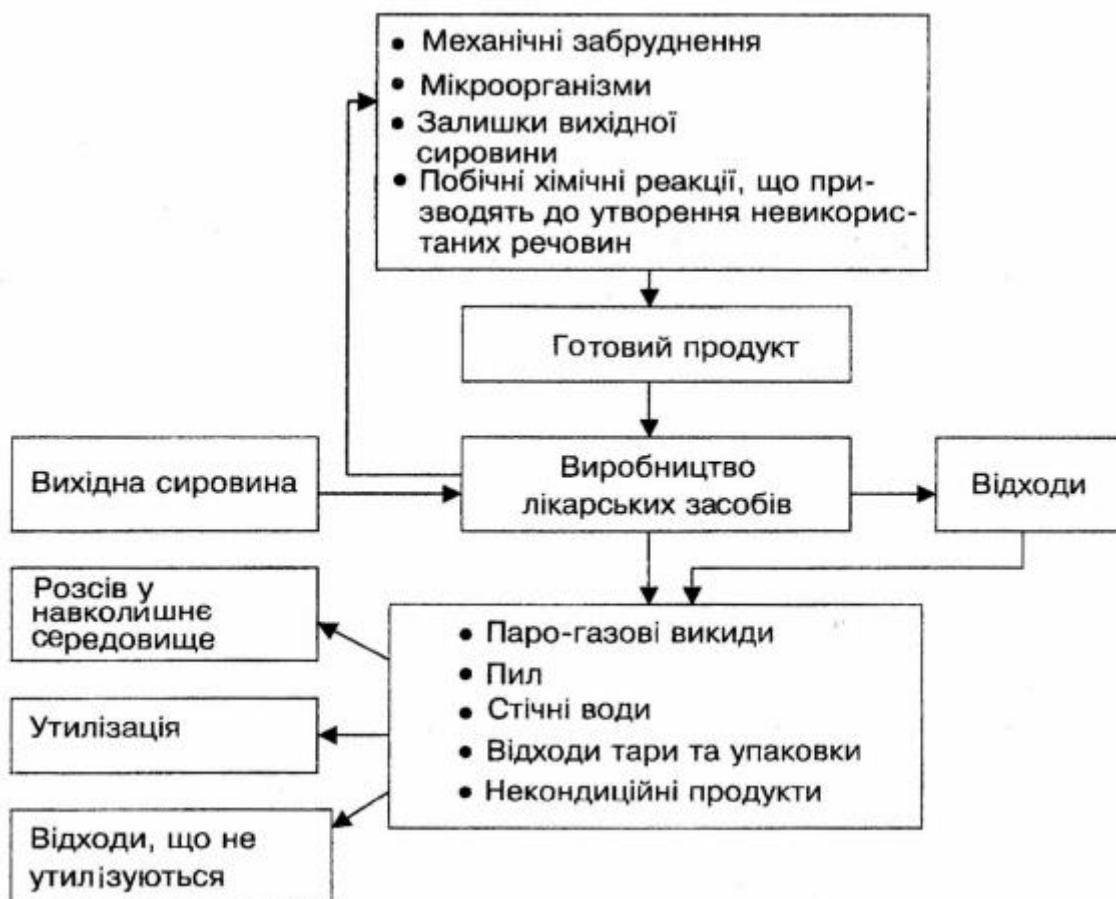


Рис. 5.1. Схема організації виробництва лікарських препаратів, можливі види відходів та джерела забруднення лікарських препаратів

5.2. Утилізація та знешкодження фармацевтичних відходів

Проблема утилізації та знешкодження фармацевтичних відходів, що утворилися у населення, в Україні на даний момент залишається досі нерегульованою. Населення не поінформоване стосовно небезпеки, яку становить неправильне поводження з відходами лікарських засобів, не має інформації стосовно можливих методів знешкодження неякісних і протермінованих ліків у домашніх умовах, не створені умови для прийому фармацевтичних відходів, що утворилися у населення з метою подальшої їх передачі відповідним структурам, що мають ліцензії на здійснення операцій у сфері поводження з небезпечними відходами [5,10].

З огляду на безсумнівну користь фармацевтичних препаратів для сучасної медицини, важливо, щоб стратегії, спрямовані на зниження їх негативного впливу на

екологію, були націлені на попередження або зменшення цього впливу, на пошук можливостей для управління ним, але при цьому щоб не чинили впливу на ефективність і доступність ліків і їх прийнятну вартість. У цьому контексті в Європейському регіоні був запропонований ряд програм реагування на проблему фармацевтичних відходів. Наприклад, «Зелена аптека» займається розробкою менш шкідливих для навколишнього середовища лікарських засобів. Ще одна потенційна стратегія – поліпшення механізмів очищення стічних вод з метою зниження залишкового вмісту лікарських речовин в ґрунтових і поверхневих водах. Проте подібні заходи реагування вельми затратні, складні в застосуванні і самі по собі не усувають першопричину проблеми, не передбачають відгуку на подальше зростання неналежного застосування лікарських препаратів.

Більш превентивний підхід застосовується в Швеції, де політика передбачає градацію лікарських засобів в залежності від їх впливу на екологію. При наявності такої можливості лікарі можуть призначати менш шкідливі препарати з точки зору їх впливу на зовнішнє середовище. Крім того, абсолютно необхідним заходом широко визнається просвіта громадськості з метою переорієнтації соціальних норм і очікувань в сторону більш відповідального підходу до використання лікарських препаратів, і в деяких країнах Європейського регіону вже накопичені дані, що підтверджують ефективність такого підходу. В Європі для школярів проводяться різні освітні заходи, такі як електронний курс e-Bug, які добре зарекомендували себе в деяких країнах, наприклад, у Франції.

Однак в цілому, за деякими оцінками, шаблонний підхід до навчально-просвітницьким програмам надає щодо невеликий вплив на практику споживання та утилізації лікарських засобів. Ймовірно, це наслідок того, що при розробці препаратів не враховуються культурні та соціальні фактори, що впливають на здоров'я, і не беруться до уваги місцеві переконання і погляди, потенційно перешкоджають зміні моделей поведінки. Як зазначає ВООЗ, «Часто у людей знаходяться досить раціональні причини для нераціонального використання лікарських засобів», а тому, щоб ефективно впливати на першопричину неналежного застосування ліків, необхідно домогтися глибокого розуміння цих самих причин. Для цього необхідно

ставити собі не тільки питання, як забезпечити більш продуману утилізацію лікарських препаратів, але в першу чергу чому ті чи інші ліки прописуються окремим групам населення, застосовуються вони для лікування або викидаються [22].

Лікарські засоби та їх активні метаболіти постійно надходять у водне середовище через оброблені та необроблені каналізаційні стоки. Для більшості фармацевтичних препаратів не характерна біокумулятивність, однак, деякі з них є надзвичайно стійкими, а інші, з низькою персистентного, при постійному і тривалому надходженні в навколишнє середовище можуть виробляти ефекти справжніх стійких полютантів, оскільки швидкість їх трансформації і видалення врівноважується швидкістю заміщення, відповідно вони вважаються «псевдо стійкими» органічними забруднювачами навколишнього середовища.

Фармацевтичні відходи, потрапляючи у водойми, серйозно впливають на водні організми. Вони призводять до порушення харчового ланцюга і, як наслідок, до загибелі багатьох популяцій. Дослідження показують, що риби в річках змінюють сексуальну орієнтацію під впливом гормонів і протизаплідних засобів. Також відбувається порушення комунікацій між підводними організмами, які «спілкуються» за допомогою обміну хімічними речовинами (одні організми їх виділяють, інші вловлюють і реагують). Деякі ліки схожі з даними речовинами, що призводить до порушення комунікацій.

При відсутності в Україні цілісної системи управління відходами фармацевтичного виробництва і непридатними лікарськими препаратами, ці ліки, ставши неякісними, виявляються на полігонах для побутових відходів, на смітниках або видаляються в комунальний каналізаційний колектор. Таким чином відбувається свідоме забруднення людиною природного середовища не тільки свого існування, але і всієї біоти, особливо водної, яка дуже чутлива до біологічно активних хімічних забруднювачів. Очисні споруди не розраховані на такий тип забруднювачів, а існуючі технологічні схеми очищення стічних вод не завжди можуть забезпечити достатній рівень видалення цих полютантів і тому потребують модернізації.

Відходи фармацевтичного виробництва утворюються протягом усього життєвого циклу лікарського засобу. Наприклад, на стадії розробки 10 біологічно-

активних речовин використовується до 10000 матеріалів, але найбільша кількість відходів утворюється на стадії виробництва лікарських засобів, тому фармацевтичні підприємства в процесі своєї діяльності в певній мірі забруднюють навколишнє середовище викидами в атмосферу і стічні води.

Для очищення стічних вод застосовуються механічні, фізико-хімічні, електрохімічні, біохімічні та термічні методи. Їх можна поділити на деструктивні і регенеративні. Деструктивні методи засновані на руйнуванні забруднюючих воду речовин шляхом їх окислення або відновлення. Утворені при цьому продукти розпаду видаляються з води або залишаються в ній у формі розчинних мінеральних солей. Регенеративні методи полягають в отриманні або утилізації містяться у воді цінних речовин. Однак регенеративні методи далеко не завжди очищають воду до такого стану, в якому її можна скидати у водойми.

Першою сходинкою очищення стічних вод є механічне очищення проціджування, відстоюванням або фільтруванням. При цьому використовується відповідне обладнання: решітки, пісколовки, відстійники, преаератори, нефтеловушки, гідроциклони і фільтри.

До фізико-хімічних методів очищення належить: флотація; іонний обмін; адсорбція; кристалізація; дистиляція; електродіаліз і ін. Для видалення із стічних вод тонкодисперсних нерозчинних суспензій застосовують флотацію – метод, заснований на різній змочуваності частинок. У резервуар з очищається водою подають знизу повітря, бульбашки якого адсорбуються на поверхні частинок витягується речовини і виносять його на поверхню води.

Для глибокого очищення стічних вод від розчинних органічних сполук (фенолів, пестицидів, ПАВ, барвників та ін.) Застосовують метод адсорбції. Воду, що очищається пропускають через фільтр, завантажений сорбентом, а після його насичення забруднюючими речовинами відокремлюють сорбент від очищеної води відстоюванням або фільтрацією. Як адсорбенти застосовують торф, тирса, золи, шлаки.

Для вилучення із стічних вод металів використовується іонообмінна очистка, що дозволяє не тільки звільнити воду від забруднення токсичними елементами, але і

вловлювати для повторного використання ряд цінних хімічних сполук. Для очищення стічних вод від фенолів, масел, органічних кислот використовується метод екстракції. Якщо стічні води містять ганебні речовини – меркаптани, аміни, сірководень, альдегіди, деякі вуглеводні, вони піддаються дезодорації, тобто усунення неприємного запаху. Дезодорація здійснюється різними методами, серед яких найбільшого поширення набув метод аерації, що полягає в продуванні повітря через стічні води. Хоча очищення із застосуванням цих методів вимагає дорогих реагентів, вона широко використовується через свою ефективності і неможливості провести очищення стоків іншими способами (наприклад, багатоконпонентних стічних вод з малою концентрацією забруднень).

Хімічне очищення застосовують в тих випадках, коли знезараження стоків можливо лише в результаті хімічних реакцій стоків з реагентами і утворенням нових речовин, які легше видалити зі стічних вод. До хімічних методів водо очистки відносять коагуляцію і флокуляцію, нейтралізацію, окислення і відновлення. Всі ці методи вимагають витрати реагентів і тому досить дорого вартісні.

Дуже перспективним окиснювачем для стічних вод є озон. Озонування не тільки очищає стоки від фенолів, нафтопродуктів, сірководню, сполук миш'яку, поверхнево-активних речовин, ціанідів, канцерогенних ароматичних вуглеводнів, пестицидів і багатьох інших токсичних домішок, але водночас знебарвлює і знезаражує воду, усуває запахи і присмаки. При обробці води озоном патогенні мікроорганізми гинуть в кілька тисяч разів швидше, ніж при її хлорування. У стічні води озон подається у вигляді озонкисневої або озоноповітряної суміші, в якій вміст озону зазвичай не перевищує 3%. У тих випадках, коли стічні води містять легко відновлювані речовини, використовуються методи відновної очищення. Ці методи часто застосовуються для видалення з стічних вод сполук хрому, ртуті, миш'яку.

Електрохімічні методи очищення стічних вод дозволяють навіть витягувати з промислових стоків цінні продукти. Процеси анодного окислення розроблені для очищення стічних вод від ціанідів, амінів, спиртів, альдегідів, нітросполук, меркаптанів. В процесі електрохімічного окислення розпадаються або переходять в

більш прості і нетоксичні речовини, які можна видалити зі стічних вод іншими методами. процеси катодного відновлення використовують для видалення зі стічних вод важких і рідкісних металів (свинцю, ртуті, хрому, олова).

Біохімічне очищення стоків заснована на здатності деяких мікроорганізмів руйнувати органічні і неорганічні сполуки, перетворюючи їх в нешкідливі продукти окислення (вода, двоокис вуглецю, нітрат-іони, сульфат-іони).

Термічне очищення стоків полягає в повному окисленні при високій температурі (згорянні) домішок стоків з отриманням нетоксичного твердого залишку. В результаті очищення стічних вод утворюється велика кількість опадів, забруднених токсичними речовинами, схильних до загнивання і заражених патогенними мікроорганізмами. Вони можуть бути неорганічними або органічними: білки (до 80%), жири (до 20%), вуглеводи (до 8%). Способами утилізації органічних осадів стічних вод можуть бути такі, як застосування їх в якості добрив (після нейтралізації токсичних речовин і зниження вмісту металів); термічна обробка для видалення органіки з подальшим використанням золи у виробництві будматеріалів, якщо це екологічно безпечно; поховання на спеціальних майданчиках (спочатку організовується витяг важких металів з відходів).

Процес поводження з відходами (життєвий цикл відходів) включає в себе наступні етапи: освіта, накопичення та тимчасове зберігання, первинна обробка (сортування, дегідратація, нейтралізація, пресування, тарування і ін.), транспортування, вторинна переробка (знешкодження, модифікація, утилізація, використання в якості вторинної сировини), складування, поховання і спалювання.

5.3. Оцінка впливу на довкілля удосконалених способів культивування біологічних агентів у порівнянні з традиційними методами

Накопичення та тимчасове зберігання відходів на виробничій території здійснюється за цеховим принципом чи централізовано. Умови збору та накопичення визначаються класом небезпеки відходів, способом упаковки і відображаються в

Технічному регламенті (проект, паспорт підприємства, ТУ, інструкції) з урахуванням агрегатного стану і надійності тари.

При цьому зберігання твердих промислових відходів I класу дозволяється виключно в герметичних оборотних (змінних) ємностях (контейнери, бочки, цистерни), II - в надійно закритій тарі (поліетиленових мішках, пластикових пакетах); III - в паперових мішках і скринях, бавовняних мішках, текстильних мішках; IV - навалом, насипом, у вигляді гряд.

При тимчасовому зберіганні відходів в нестационарних складах, на відкритих майданчиках без тари (навалом, насипом) або в негерметичній тарі повинні дотримуватися такі умови: тимчасові склади та відкриті майданчики повинні бути розташовані з підвітряного боку по відношенню до житлової забудови; поверхню зберігаються насипом відходів або відкритих прийомників-накопичувачів повинна бути захищена від впливу атмосферних опадів і вітрів (укриття брезентом, обладнання навісом і т.д.); поверхню майданчика повинна мати штучне водонепроникне і хімічно стійке покриття (асфальт, керамзитобетон, полімербетон, керамічна плитка та ін.); по периметру майданчика повинна бути передбачена обвалування і відособлена мережу зливостоків з автономними очисними спорудами; допускається її пристосування до локальних очисних споруд відповідно до технічних умов; надходження забрудненого зливостоки з цього майданчика в загальноміську систему дощової каналізації або скидання в найближчі водойми без очищення не допускається. Транспортування промислових відходів поза підприємства здійснюється усіма видами транспорту - трубопровідним, канатним, автомобільним, залізничним, водним та повітряним. Перевезення відходів від основного підприємства до допоміжних виробництв і на полігони складування здійснюється спеціально обладнаним транспортом основного виробника або спеціалізованих транспортних фірм.

Захоронення відходів повинно відбуватися на спеціально організованих полігонах. Полігони для захоронення відходів є природоохоронними спорудами, призначеними для регулярного централізованого збору, видалення, знешкодження та зберігання не утилізованих відходів. Кількість і потужність полігонів для кожного

регіону обґрунтовуються техніко-економічними розрахунками. Захоронення на полігонах підлягають не утилізуються токсичні відходи I, II і III класів, тобто надзвичайно небезпечні, високо небезпечні і помірно небезпечні.

Не вирішеним залишається питання з простроченими лікарськими засобами у населення, яке не має можливості їх правильно утилізувати. З цієї причини ліки потрапляють до побутових відходів і ґрунту. Рішенням даної проблеми могла б стати встановлення контейнерів для недоброякісних препаратів в спеціальних місцях, таких як поліклініки або аптеки. Подібна практика вже існує в Європі.

5.4. Висновки до розділу

Використання удосконалених технологій виробництва пробіотиків сприяє зменшенню шкідливого впливу відходів фармацевтичного виробництва на навколишнє середовище. Оскільки, суттєво зменшується кількість поживного середовища необхідного для процесу культивування, використовується менше води та енергетичних ресурсів, встановлюються сучасні системи очистки стічних вод, які призведуть не тільки до очищення води, а й дозволять зберегти цінні компоненти, які можна буде в подальшому використовувати у процесах виробництва.

ВИСНОВКИ

1. Проведена порівняльна характеристика способів культивування мікроорганізмів показала, що найбільш перспективним для біосинтезу молочнокислих бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG є безперервний спосіб культивування.

2. Описані морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні властивості бактерій *Lactobacillus rhamnosus* GG, що дає можливість віднести їх до роду *Lactobacillus*.

3. Виявлено, що при проведенні процесу біосинтезу протягом 14 годин з додаванням до середовища комплексу вітамінів (вітаміну С, пантотенової кислоти та біотину) кількість молочнокислих бактерій *L. rhamnosus* GG збільшилась у 4 рази.

4. Визначено, що при зміні рН в лужну сторону біомаса мікроорганізмів *L. rhamnosus* GG зменшується у 1,5 рази. Досліджено, що ріст культури молочнокислих бактерій досягає максимуму при 37 °С, що корелює з літературними даними.

5. Показано, що при використанні безперервного способу культивування з додаванням комплексу вітамінів (вітаміну С, пантотенової кислоти та біотину) біомаса збільшується на 20 %.

СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бережний В. В. Діагностика, сучасна фармакотерапія та профілактика кишкового дисбактеріозу у дітей: Метод. рекомендації / В. В.Бережний, Н. К. Уніч, І. Б. Орлюк. – К., 2000. – 36 с.
2. Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук. – Москва: Издательский центр «Академия», 205. – 608 с.
3. Caplice E. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation / E. Caplice, G. F. Fitzgerald. // Int. J. Food Microbiol. – 1999. – P. 131–149.
4. Gemmell M. The physiological characters and flagellar arrangement of motile homofermentative lactobacilli / M. Gemmell, W. Hodgkiss. // J. gen. Microbiol. – 1964. – P. 519–526.
5. Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2 / [I. Jankovic, I. M. Ventura, V. Meylan and other]. // J. Bacteriol. – 2003. – P. 3288–3296.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology / [P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones та ін.] // The Firmicutes / [P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones and other]. – New York: Springer, 2009. – (2nd ed.). – P. 465–511.
7. Пирог Т. П. Загальна мікробіологія : Підручник / Т. П. Пирог – Київ : НУХТ, 2004. – 471с.
8. Бактерии рода *Lactobacillus*: общая характеристика и методы работы с ними: Учебно-методическое пособие / Д.Р. Яруллина, Р.Ф. Фахруллин. – Казань: Казанский университет, 2014. – 51 с.
9. *Lactobacillus mulieris* sp. nov., a new species of *Lactobacillus delbrueckii* group / [J. Rocha, J. Botelho, M. Ksiezarek etc.]. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – P. 1522–1527.
10. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. indicus subsp. nov., isolated from Indian dairy products / [F. Felis, E. Giovanna, A. Castioni та ін.]. // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – №55. – С. 401–404.

11. *Lactobacillus reuteri* (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study / F.Savino, E. Pelle, R. Oggero, E. Palumeri. // Pediatrics. – 2007. – №119. – С. 124–130.
12. Лазебник Л.Б., Рустамов М.Н. Использование пробиотиков при эрадикации *Helicobacter pylori* // XII съезд Науч. общества гастроэнтерологов России «Классическая и прикладная гастроэнтерология» Тезисы докладов. 1—2 марта 2012 г. М. С. 18—19.
13. Према® для дітей дуо / Према® для дітей / Према® саше [Електронний ресурс] // Компендіум – лікарські препарати – Режим доступу до ресурсу: <https://compendium.com.ua/dec/321252/>.
14. Микрокапсулы: перспективы использования в современной фармацевтической практике / Є. Ф.Степанова, М. Є. Ким, К. Б. Мурзагулова, С. Б. Евсеева. // Современные проблемы науки и образования. – 2014.
15. Петрова А. Е. Изучение параметров микрокапсулирования при получении пролонгированной формы налтрексона / А. Е. . Петрова. // Хим.-фармац. журнал. – 2014. – №31. – С. 50–53.
16. Муравьев И. А. Влияние микрокапсулирования на скорость высвобождения теofilлина из таблеток / И. А. Муравьев, И. Н. Андреева. // Фармация. – 1987. – С. 19–21.
17. Полковникова Ю. А. Выбор вспомогательных веществ для микрокапсулирования афобазола / Ю. А. Полковникова, Є. Ф. Степанова. // 2 междунар. науч.-практ. конф. «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки»: сб. науч. тр.. – 2011. – С. 289–291.
18. Тираспольская С. Г. Разработка технологии и способов анализа микрокапсул фенкарولا / С. Г. Тираспольская. // Разработка, исследование и маркетинг фармацевтической продукции: сб. науч. тр.. – 2005. – С. 290–291.
19. Сабат М. Я. Фруктани: хімічна структура, біологічні властивості та метаболізм кишковою мікрофлорою / М. Я. Сабат, Р. Я. Искра // Біологічні студії / М. Я. Сабат, Р. Я. Искра. – Львів: Львівський національний університет імені Івана Франка, 2013. – (Біологічні студії). – С. 203–214.

20. Белоусова Е. А. Синдром диареи в практике гастроэнтеролога: патофизиология и дифференцированный подход к лечению / Е. А. Белоусова, А. Р. Златкина. // Фарматека. – 2003. – С. 65–71.
21. Албертс Б. Молекулярная биология клетки: В3-х т. 2-е изд. перероб. и доп/ Б. Албертс, Д. Брей, Д. Льюонс, М. Рофф, К. Роберте, Дж. Уотсон - Т. 3. пер. с англ.// М: Мир, 1994. – 504 с.
22. Mirpuri J. *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) regulates IL-10 signaling in the developing murine colon through upregulation of the IL-10R2 receptor subunit / J. Mirpuri. // PLoS One. – 2012. – №7.
23. De Keersmaecker S. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid / S. De Keersmaecker, J. Desair. // FEMS Microbiol Let. – 2006. – №259. – С. 89–96.
24. Hatakka K. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children / K. Hatakka, L. Näse, K. Savilahti. // Caries Res. – 2001. – №35.
25. Fang Y. *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health / Y. Fang, B. Polk. // Funct Food Rev.. – 2012. – №4. – С. 77–84.
26. Pace F. Probiotics in digestive diseases: focus on *Lactobacillus* GG / F. Pace, M. Pace, G. Quartarone. // Minerva Gastroenterol Dietol. – 2015. – №61. – С. 273–292.
27. Koryszewska-Bagińska A. Comparative genomics and functional analysis of a highly adhesive dairy *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* IBB3423 strain / A. Koryszewska-Bagińska, J. Gawor. // Appl Microbiol Biotechnol. – 2019. – №103. – С. 7617–7634.
28. Sudhanshu S. *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods / S. Sudhanshu, C. Ramesh, N. Zdolec. // Biomed Res Int. – 2018. – №1.
29. Combination of Metabolomic and Proteomic Analysis Revealed Different Features among *Lactobacillus delbrueckii* Subspecies *bulgaricus* and *lactis* Strains While

In Vivo Testing in the Model Organism *Caenorhabditis elegans* Highlighted Probiotic Properties / [E. Zanni, E. Schifano, S. Motta та ін.]. // *Front Microbiol.* – 2017. – №8.

30. Комментарии к руководству Европейского союза по надлежащей практике производства лекарственных средств для человека и применения в ветеринарии / под ред. С.Н.Быковского, И.А.Василенко, С.В.Максимова. – М.: Издательство «Перо», 2014. – 488 с

31. Н.Г. Селезнев, В.К.Петров, Р.М.Стрельцова, М.В.Пахомова Биотехнология. Материалы лекций. – Рязань, 2004. – 250 с.

32. Биотехнология: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений/ Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева; под ред. А.В.Катлинского. – 2-е изд., стер. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. – 256 с.

33. Основы фармацевтической биотехнологии: учебное пособие / Т.П.Прищеп, В.С.Чучалин, К.Л.Зайков, Л.К.Михалева, Л.С.Белова.- Ростов н/Д.: Феникс, 2006. – 251 с.

34. Фармацевтическая биотехнология: рук. к практ. занятиям: учеб. пособие/ С.Н. Орехов; под ред. В.А. Быков, А.В. Катлинского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009.- 384 с.

35. Brondani G. E. Chemical sterilization of culture medium: a low cost alternative to in vitro establishment of plants. / G. E. Brondani, T. Bergonci, A. N. Gonçalves. // *Scientia Forestalis.* – 2013. – №41. – P. 257–264.

36. Preparation and Chemistry of the Artificial Algal Culture Medium Aquil / [N. M. Price, G. I. Harrison, J. G. Hering etc]. // *Biological Oceanography.* – 1989. – №6. – P. 443–461.

37. Teixeira S. L. Influence of NaClO on nutrient medium sterilization and on pineapple (*Ananas comosus* cv *Smooth cayenne*) behavior / S. L. Teixeira. // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* – 2006. – №86. – С. 375–378.

38. Бухарин О.В., Черкасов С.В., Сгибнев А.В., Забирова Т.М., Иванов Ю.Б. // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2000. Т. 130. № 7. С. 80–82.

39. Современная микробиология. Прокариоты. Т. 1. / Ред. Й. Ленгелер, Г. Древис, Г. Шлегель. М.: Мир, 2005. 656 с.

40. Пельшенко В.И., Савицкий В.Н., Стецько Н.С., Михайленко В.П. // Гидробиол. журн. 1991. Т. 27. № 6. С. 54–59.
41. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. // Усп. соврем. естествознания. 2006. № 7. С. 29–36.
42. Эмануэль Н.М., Денисов Е.Т., Майзус З.К. Цепные реакции окисления углеводов в жидкой фазе. М.: Наука, 1965. С. 370
43. Грама метод// Гоголь сДебит. – М. : Советская энциклопедия, 1972. . – (Большая советская энциклопедия: [в 30 т.] / гл. ред. А. М. Прохоров; 1969-1978, т.7).
44. Аспиратор ПУ-1Б [Электронный ресурс] // Лабораторное оборудование – Режим доступа до ресурсу: <http://proflab.com.ua/produkt/product-details/317-aspirator-pu-1b.html>
45. Основи охорони праці: підручник / О. І. Запорожець, О. С. Протоєрейський, Г. М. Франчук, І. М. Боровик. – К.: Центр учбової літератури, 2009. – 264 с.
46. Основи охорони праці / [Ткачук К. Н., Халімовський М. О., Запарний В. В. та ін.]; під ред. Ткачука К.Н. та Халімовського М.О. – [2-ге вид., допов. та перероб.] – К.: Основа, 2006. – 448 с.
47. Жуковина О. В. Оцінка еколого-економічної діяльності фармацевтичних підприємств / О. В. Жуковина, О. В. Посилкіна, В. М. Тіманюк. // Вісник фармації. – 2003. – №4. – С. 83–86.
48. Сагайдак-Нікітюк Р. В. Класифікація відходів фармацевтичної галузі / Р. В. Сагайдак-Нікітюк. // Проблеми військової охорони здоров'я. – 2013. – С. 296–303.
49. Самойленко Н. М. Вплив фармацевтичних препаратів та їх похідних на навколишнє середовище похідних / Н. М. Самойленко, І. А. Єрмакович. // Вода і екологія. – 2014. – №2. – С. 78–87.
50. Проблеми утилізації відходів фармацевтичної галузі (огляд) / О. Р.Попович, Н. Ю. Вронська, Ю. Й. Ятчишин, М. С. Мальований. // Chemistry, Technology and Application of Substances. – 2020. – С. 175–183.