

ОСОБЛИВОСТІ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ КУЛЬТИВУВАННЯ ВИРОБНИЧОГО ШТАМУ *E. COLI* 055 ПРИ ВПОРЯДКУВАННІ ЕТАПІВ ЗАГАЛЬНОГО ТЕХНОЛОГІЧНОГО ЛАНЦЮГА ЗБЕРІГАННЯ В КОЛЕКЦІЯХ

О. І. Гордієнко, канд. с.-г. наук

Державний науково контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

*Автором проведено моніторинг щодо використання процедури культивування у технологічному ланцюзі зберігання мікроорганізмів у колекції НЦШМ ДНКІБШМ. Уся процедура досліджена на прикладі виробничого штаму *E. coli* 055. Визначені етапи та специфіка проведення процедури культивування на кожному з них. Досліджено процедури культивування мікроорганізму на кожному з етапів технологічного ланцюга. Контролювання видових ознак здійснювали перевіряючи культурально-морфологічні, біохімічні властивості, а також за визначенням кількості життєздатних клітин після проведення кожного етапу. Обрано підхід щодо оптимізації використання та приготування поживних середовищ на кожному з етапів технології зберігання виробничого штаму у колекції.*

Ключові слова: ТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОЦЕС, ЕТАП, КУЛЬТИВУВАННЯ, ШТАМ, ОПТИМІЗАЦІЯ, СТАНДАРТИЗАЦІЯ.

Моніторинг процесів лабораторних досліджень, які проводяться із колекційними штамми при їх зберіганні, є необхідною процедурою для визначення послідовності, характерності оптимізації та стандартизації етапів у загальній технології зберігання [1, 2].

Кожний етап технології зберігання виробничого штаму у колекції базується на проведенні процесу культивування мікроорганізму.

Проведення скринінгу щодо визначення завдань процесу культивування та показників результатів на кожному етапі, є початком оптимізації технології зберігання штамів у колекції. Попереднє визначення функцій процесу культивування для кожного етапу (ідентифікація, відновлення, накопичення та консервування) за найбільш характерними та сталими показниками обумовлює вибір технології виготовлення відповідного поживного середовища культивування. Також ця процедура є передумовою при поводженні із штамом у колекції щодо подальшої стандартизації лабораторних досліджень на кожному етапі окремо та технології тривалого зберігання загалом.

Стандартизація лабораторних досліджень і випробувань, як процесів при поводженні із колекційним штамом передбачає систематизацію і узагальнення отриманих фактичних показників у взаємозв'язку з теоретичними напрацюваннями. Одним з об'єктів стандартизації є процес (культивування) тому його слід розглядати, як один із методів знаходження оптимального рішення однотипових технологічних процедур для кожного окремого етапу технологічного ланцюга зберігання штамів [3–5].

У НЦШМ ДНКІБШМ існує технологія зберігання виробничих штамів у колекції, які в подальшому використовують при виробництві ВПІ. Вона передбачає здійснення низки послідовних етапів, що базуються на процесі культивування, його проведення відрізняється у відповідності до функцій кожного етапу, але ж є сталим при проведенні одного й того ж етапу у часі при тривалому зберіганні. Кожен етап має бути досконало вивчений, проаналізований, контрольований, оптимізований та в подальшому стандартизований за умов створення системи якості.

Мета роботи. Впорядкування технології зберігання колекційних штамів в НЦШМ за послідовністю етапів та оптимізацією процесу культивування на кожному з них на прикладі виробничого штаму *E. coli* 055, що зберігається у колекції НЦШМ ДНКІБШМ.

Матеріали і методи. Нами було проведено моніторинг щодо визначення послідовності технологічних етапів, в яких передбачається процес культивування виробничого штаму *E. coli* 055. Виокремлені функціональні, технологічні особливості процесу культивування на кожному етапі та визначені пріоритетні показники ефективності для кожного з етапів (диференціація, відновлення, накопичення, консервування) у технології зберігання штамів.

За результатами проведеного моніторингу процедури лабораторних досліджень, де головним процесом є культивування нами було впорядковано за функціональними особливостями етапи технології зберігання виробничого штаму *E. coli* 055.

1 етап – ідентифікація (диференціація);

2 етап – відновлення;

3 етап – накопичення біомаси;

4 етап – консервування.

Кожний етап у технології зберігання виробничого штаму у колекції, що базується на процесі культивування, має свої функціональні завдання. Результати ефективності проведення кожного етапу обумовлені визначеними функціями кожного з них (ідентифікація, відновлення, накопичення біомаси, консервування) та обраними пріоритетними показниками. На кожному етапі за його функціональною призначеністю визначаються пріоритетні показники якості проведення процесу культивування із загально визначених, а саме: видова приналежність; відновлення фізіологічного стану клітин; характер накопичення біомаси; культурально-морфологічні ознаки; біохімічні властивості та кількість живих клітин за показником колонієутворюючих одиниць (КУО).

На першому етапі пріоритетним показником його проведення була ідентифікація штаму, на другому – відновлення фізіологічного стану клітин, на третьому – накопичення біомаси та на четвертому – консервування через ліофільне висушування.

При проведенні досліджень були використані методи: мікроскопіювання, біохімічна якісна кольорова реакція з цукрами Гіса, визначення концентрації клітин за підрахунком кількості живих клітин методом десятикратного розведення.

Дослід проводили з виробничим колекційним штамом *E. coli* 055 методом посіву на тверді та рідкі поживні середовища.

За паспортними характеристиками культура характеризується такими показниками:

– за культурально-морфологічними ознаками колоній на диференційному середовищі

Ендо – це гладкі 2-3 мм в діаметрі, з металевим блиском колонії;

– за морфологією клітин – це палички 25-30 мкм з заокругленими кінцями;

– за біохімічними властивостями – *E. coli* 055 ферментує глюкозу, маніт, лактозу, негативна реакція на ферментацію маніта, утворює індол, не асимілює середовища Кліглера та Олькеницького;

– за швидкістю накопичення біомаси – 1000000 клітин за добу.

Для оптимального впорядкування поводження із виробничим штамом були визначені особливості культивування *E. coli* 055 на кожному окремому етапі у загальному технологічному ланцюгу зберігання виробничого штаму. Нами були підібрані поживні середовища для забезпечення ефективного проведення кожного етапу за його функціональними характеристиками, а саме: на етапі 1 – підтвердити (визначити) видову приналежність; на етапі 2 – відновити фізіологічний стан клітин; на етапі 3 – підвищити ростові властивості культури для ефективного накопичення біомаси та на етапі 4 – підготувати культуру бактеріальних клітин для консервування через ліофільне зневоднення.

Нами були виготовлені поживні середовища для процесу культивування на кожному етапі технологічного ланцюгу зберігання виробничого штаму *E. coli 055* в колекції НЦШМ ДНКІБШМ, та захисне середовище Файбіча.

На етапі «ідентифікація» посів культури проводили на поживне середовище Endo агар. Культивування на етапі «відновлення» проводили на поживному середовищі ЗПВ (забуферена пептонна вода). Процес культивування на етапі «накопичення» проводили на поживному рідкому середовищі ТСБ (триптон соєвий бульон). Етап «консервування» проводили з використанням захисного середовища Файбіча (сахарозо-желатинова суміш). Всі поживні середовища готували за комерційною технологією, що наведена у рецепті фірми постачальника (HIMEDIA).

Видову приналежність штаму *E. coli 055* визначали за культурально-морфологічними ознаками росту колоній після висіву культури «штрихом» на агаризовані поживні середовища. Методом мікроскопіювання визначали морфологію клітин при збільшенні 1,25×100 під імерсією. А біохімічні властивості культури визначали методом ферментолізу 12 цукрів Гіса (якісна кольорова реакція). Кількість живих клітин визначали загально прийнятим методом 10-кратних розведень та підрахунком колоній (КУО) культивованих на чашках Петрі з Endo агаром. Ефективність процесу культивування кожного етапу перевіряли за визначеними пріоритетними показниками якості його функції у загальному ланцюзі зберігання штаму у колекції.

Результати й обговорення. Результати проведених досліджень наведені у таблиці. Порівнюючи результати досліджень за обраними функціональними показниками якості кожного етапу нами було визначено, що оптимальним поживним середовищем культивування на етапі «ідентифікація (1)» ліофільно висушеного виробничого штаму *E. coli 055* є середовище Ендо агар. Пріоритетним показником цього етапу було визначення видової приналежності за морфологічними ознаками росту колоній. При культивуванні культури на цьому середовищі спостерігали ріст колоній S-форми з характерним металевим блиском та діаметром 1-3 мм. Але за морфологічними ознаками клітин спостерігали відхилення, а саме палички були достатньо видовжені 30-50 мкм, за біохімічними властивостями також спостерігали відхилення від норми – ферментоліз цукрів Гіса уповільнений зміна кольору наступала на третю добу, кількість життєздатних клітин за показником КУО становила 530000 кл./мл за добу.

Таблиця

Результати процесу культивування виробничого штаму *E. coli 055* на етапах технологічного ланцюга зберігання у колекції НЦШМ ДНКІБШМ

№ п/п	Етапи	Середовища	Культурально-морфологічні ознаки колоній та клітин	Біохімічні властивості	Показник КУО (кл./мл)
1	Диференційний (1)	Ендо	S-форма, діаметр 1-3мм, металевий блиск. Видовжені палички 30-50 мкм (видовжені)	Ферментоліз цукрів – характерний, але уповільнений (3 доби)	530000
2	Відновлення (2)	ЗПВ	S-форма, діаметр 2-3 мм (діаметр норма), металевий блиск. Палички 25-30 мкм (норма)	Ферментоліз цукрів характерний (24 год)	850000
3	Накопичення (3)	ТСБ	S-форма, діаметр 2-3 мм(норма), металевий блиск. Палички 25-30 мкм (норма)	Ферментоліз цукрів Гіса характерний (24 год)	10000000
4	Консервування (4)	МПБ	S-форма, діаметр 2-3 мм (норма), металевий блиск. Палички 30-50 мкм (видовжені)	Ферментоліз цукрів Гіса характерний, але уповільнений (48-72 год)	820000

На етапі «відновлення (2)» пріоритетним показником процедури культивування було нормалізувати морфологію клітин та відновити біохімічні властивості. Оптимальним поживним середовищем процесу культивування *E. coli* 055 на цьому етапі була обрана забуферена пептонна вода (ЗПВ), завдяки використанню якої було відновлено фізіологічний стан клітин. Так морфологія клітин мала відповідну форму – палички розміром 25-30 мкм із закругленими кінцями. Також були нормалізовані біохімічні властивості, а саме швидкість ферментолізу цукрів Гіса спостерігали на 24 годину культивування. Показник КУО збільшився і становив 850000 кл./мл за добу.

На етапі 3 «накопичення біомаси» нами було проведено культивування *E. coli* 055 на поживному середовищі збагачення триптон-соевому бульйоні (ТСБ). За пріоритетним показником якості проведення етапу було обрано підрахунок КУО. Нами було визначено, що накопичення біомаси збільшилось до 10000000 кл./мл за добу. За показниками культурально-морфологічних та біохімічних властивостей також було встановлено відповідність до паспортної норми.

На етапі 4 «консервування» методом ліофільного висушування отримують сублімовану культуру *E. coli* 055. Ліофільне висушування проводили з додаванням захисного середовища Файбіча до добової культури *E. coli* 055 прокультивованої (після етапу збагачення 3) на МПБ з концентрацією живих клітин 1000000 кл./мл. Після ліофільного висушування за для визначення впливу його на фізіологічний стан та життєздатність клітин були проведені дослідження щодо перевірки характерних культурально-морфологічних, біохімічних та фізіологічних властивостей (за методикою етапів культивування 1 та 2). Було встановлено, що показник КУО становив 820000 кл./мл (82% життєздатних клітин). Ферментоліз цукрів уповільнився (48-72 години), культурально-морфологічні властивості колоній відповідали нормі, а клітини були змінені, за розміром та формою (видовжені палички). З такими характеристиками культура виробничого штаму *E. coli* 055 було закладено на зберігання.

ВИСНОВКИ

1. У результаті проведених досліджень щодо технологічного ланцюгу зберігання виробничого штаму *E. coli* 055 у колекції НЦШМ ДНКІБШМ було визначено та узагальнено необхідну і сталу послідовність етапів, де визначальною процедурою на кожному з них є культивування.

2. Визначено функції кожного з етапів у загальному технологічному ланцюзі щодо зберігання виробничого штаму у колекції.

3. Досліджено специфіку проведення процедури культивування на кожному з етапів окремо завдяки оптимальному підходу щодо технології виготовлення, підбору, та використання поживного середовища на кожному етапі технологічного ланцюга зберігання виробничого штаму у колекції.

4. Наведені результати досліджень впорядковують послідовність етапів, визначають функціональні особливості процесу культивування на кожному з них при поводженні із виробничим штамом *E. coli* 055 у загальному технологічному ланцюгу зберігання у колекції НЦШМ ДНКІБШМ.

Перспективи досліджень. Отриманні результати досліджень можуть слугувати, як один з підходів щодо стандартизації технології зберігання виробничих штамів та забезпечення стабільності їх властивостей.

FEATURES OF CULTIVATION OF PRODUCTION STRAIN E. COLI 055 STAGES IN THE OVERALL PROCESS OF STORAGE IN COLLECTIONS

O. I. Gordienko

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms,
30, Donetska str., Kyiv, 03151, Ukraine

S U M M A R Y

As a result of research on the process of production storage E. coli 055 in a collection NCM SSCIBS were identified and summarized the necessary and constant sequence of stages where the procedure is crucial cultivation. The functions of each stage in the overall technology chain for storage in the production strain collection. Each stage in the process of biotechnological production strains deposited in the collection based on the process – cultivation. Results culturing at each stage due to certain features of each and optimization of manufacturing technology and the related media. Each stage is determined and recorded physiological state of cells benchmarks, namely cultural-morphological characteristics, biochemical properties and determining the number of living cells counting colony forming units (CFU).

Keywords: TECHNOLOGICAL PROCESS STAGE, CULTIVATION, PRODUCTION STRAIN, THE NUTRITIONAL ENVIRONMENT, OPTIMIZATION, STANDARDIZATION.

ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА E. COLI 055 НА ЭТАПАХ ОБЩЕГО ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ХРАНЕНИЯ В КОЛЛЕКЦИЯХ

O. I. Gordienko

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов
микроорганизмов»,
ул. Донецкая, 30, г. Киев, 03151, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Проведен мониторинг использования процедуры культивирования в технологической цепи хранения микроорганизмов в коллекции НЦШМ ГНКИБШМ. Вся процедура апробирована на примере производственного штамма E. coli 055. Определены этапы и специфичность проведения процедуры культивирования на каждом из них. Исследовано процедуры на каждом из этапов технологической цепи. Контроль видовой принадлежности осуществляли проверкой культурально-морфологических, биохимических свойств, а также за счет подсчета количества жизнеспособных клеток после проведения каждого из этапов. Выбран подход относительно оптимизации использования и приготовления питательных сред на каждом этапе технологии сохранения производственного штамма.

Ключевые слова: ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС, ЭТАП, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ, ШТАММ, ОПТИМИЗАЦИЯ, СТАНДАРТИЗАЦИЯ.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Раскин Б. М. Проблема питательных сред на современном этапе / Б. М. Раскин, Г. П. Каменина // Микробиология. – 1988. – № 6. – С. 10–16.

2. Березненко М. П. Сертифікація систем якості та продукції в легкій промисловості / М. П. Березненко. – Київ : Лотос, 1991 – 232 с.

3. Исикава К. Японские методы управления качеством / К. Исикава. – Москва: Экономика, 1988. – С. 29–54.

4. Леонов И. Г. Управление качеством продукции / И. Г. Леонов, О. В. Аристов – Москва : Изд-во стандартов, 1990. – 159 с.

5. Сертификация продукции и услуг. – Москва : Изд-во стандартов, 1992. – С. 11–46.

Рецензент – О. О. Напненко, к. вет. н., с. н. с., завідувач Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ.

УДК 619:618.19-002:615:637.12.07:632.2

ПРОБЛЕМИ І РОЗРОБКА НОВОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ КОРІВ, ХВОРИХ НА МАСТИТ

*І. М. Кушнір, д-р вет. наук, с. н. с.,
С. Д. Мурська, канд. вет. наук*

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів
та кормових добавок
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

*У статті наведені результати бактеріологічних досліджень секрету молочної залози корів у господарствах різних форм власності Львівської області. Доведено, що молоко від корів, хворих на мастит, майже в усіх випадках містило значну кількість умовно-патогенних мікроорганізмів. Причому, домінуючу роль у спектрі цих мікроорганізмів відігравали: стрептококи і стафілококи, найчастіше виділялись культури *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*. Хвороби молочної залози корів завдають значних економічних збитків господарствам різної форми власності, які полягають у не доодержуванні молока, зниженні його якості та вибраковці корів, в першу чергу високопродуктивних. Крім того, вживання молока від хворих корів на мастит загрожує здоров'ю людей, що є неприпустимим.*

Створення нових й удосконалення існуючих протимаститних засобів здійснюється, як правило, шляхом розробки багатокомпонентних препаратів, до складу яких входять декілька активно діючих речовин із різних класів хімічних сполук, які повинні доповнювати одна одну в спектрі протимікробної активності. Саме тому, виправданою є розробка нових протимаститних засобів, які б гарантували високу ефективність їх застосування.

Ключові слова: МАСТИТИ, МОЛОЧНА ЗАЛОЗА, МІКРООРГАНІЗМИ, МІКРОФЛОРА, КУЛЬТУРА, ЗБУДНИК, БАКТЕРІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ.

Мастит (Mastitis) – запалення молочної залози, що розвивається внаслідок дії механічних, термічних, хімічних та біологічних факторів і характеризується патологічними змінами у тканинах і секреті молочної залози. Мастити можуть виникати під впливом різних факторів, дія яких зазвичай проявляється в поєднанні з численними, що повертають до захворювання, умовами. Відповідно до етіології, всі мастити можна розділити на дві основні групи: інфекційні, що виникають в результаті впливу мікроорганізмів на молочну залозу,