УДК 579.61

ВИКОРИСТАННЯ СТИМУЛЯТОРІВ РОСТУ МІКРООРГАНІЗМІВ ДЛЯ НАКОПИЧЕННЯ БІОМАСИ

Батрак О.А., Чупринова С.І., Завада Н. П., Рябова І.С.
ДУ "Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова", м. Харків

Останній час характеризується швидким розвитком біотехнології, яка все більше використовує досягнення та методи як традиційної промислової мікробіології так і генної інженерії.

Надпорогове прискорення синтезу біотехнологічних білкових і небілкових продуктів та прискорення часу появи перших колоній мікроорганізмів приводить до пошуку нових методів вирощування мікроорганізмів та оптимізації складу мікробіологічних середовищ. Перше дозволяє значно збільшити вихід основного продукту та інтенсифікувати процеси виробництва, значно здешевити кінцевий продукт, а друге – наблизити мікробіологічну діагностику до сучасних молекулярно- біологічних методів як за точністю, так і за спектром використання.[1-5].

Основною причиною виходу високовартісних кінцевих продуктів є вельми повільне нарощування маси мікроорганізмів – продуцентів біотехнологічного продукту та повільний синтез останнього. Для біотехнологічних ліків білкової природи частка основного продукту ледве становить 0,5 – 0,7 % від загальної кількості білку [6]. Відповідно актуальними є засоби збільшення швидкості приросту маси мікроорганізмів та збільшення відсотку виходу кінцевого продукту. Збільшення навантаження живильного середовища додатковими компонентами має фізіологічні обмеження: адже безперервна подача живильних речовин не здатна збільшити відсоток синтезованого біотехнологічного продукту. Тому пошук нових речовин, які впливають на зростання ростових якостей мікроорганізмів, не втрачає своєї актуальності.

Одним з перспективних засобів підвищення як відсотка виходу біотехнологічних білкових продуктів так і нарощування мікробної маси поза рамками фізіологічної норми (>10 разів) є використання активаторів алостеричних ферментів класу фосфокіназ, індукторів синтезу циклічних мононуклеотидів та комбінацій стимуляторів росту (енхансерів) різних за походженням [7].

Активатор аденозиндеамінази класу хіназолінів здатен у 10 разів збільшити рівень цАМФ у клітині, а спільно з активатором фосфокінази шляхом фосфорилювання ферментів збільшити їх активність до 100 разів. ДНК-гідраза та ДНК-полімераза приймають участь у поділенні клітини і є однією з мішеней для фосфорилювання. Таким чином, є теоретична можливість прискорити в 10-100 разів як швидкість напрацювання мікробної маси, так і швидкість синтезу мікроорганізмами білкових продуктів біотехнології.

Метою нашої роботи було вивчення впливу стимуляторів росту мікроорганізмів (енхансерів) на появу перших колоній та на збільшення біомаси мікробних клітин.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження були тест-штами мікроорганізмів: Staphylococcus aureus ATCC 25923, Staphylococcus aureus ATCC 6538, Escherichia coli ATCC 25922, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853, Bacillus subtilis ATCC 6633, Candida albicans ATCC 885/653.

Культури вирощували на поживному середовищі м'ясо-пептоний агар (МПА) в який додавали стимулятори росту в концентрації від 0,1 до 0,01 мг/мл. У якості енхансерів використовували: №1 – похідні ізохіноліна, №2 – похідні імідазолу, №3 – комбінація №1+№2. Концентрація енхансерів складала 0,1 мг/мл, 0,01мг/мл, 0,001мг/мл.

Розсівали тест-штами за методом Гольда, культивували протягом 18-24 год., при 37^0С, дріжджеподібні гриби роду Candida – на агарі Сабуро, 72 год при 25^0С.

Вирощені мікробні культури змивали фізіологічним розчином, а потім за оптичним стандартом каламутності встановлювали кількість мікробних клітин. В якості контролю використовували стандартне середовище – поживний агар (МПА), який готували у відповідності з вимогами виробника.

Визначали кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) по кількості вирощених мікробних клітин на стандартному середовищі і з додаванням до МПА стимуляторів росту мікроорганізмів (енхансерів).

Отримані результати обробляли статистично.

Результати і обговорення

У результаті досліджень було встановлено, що внесення до МПА похідних ізохіноліна та імідазола, значно збільшувало колонієутворення мікроорганізмів за 24 год. у порівнянні з контрольними штамами на МПА.

Результати досліджень впливу концентрацій енхансерів різних груп на колонієутворення стандартних штамів представлені в таблиці 1.

Дані, що наведені в таблиці 1 свідчать про збільшення кількості колоній за десятинним логарифмом ступені росту на середовищі, де були додані енхансери. Кількість колоній Staphylococcus aureus з додаванням похідних ізохіноліну в концентрації 0,01-0,1мг/мл становить в середньому 5,3±0,1, тоді як з додаванням похідних імідазолу 0,1-0,01мг/мл – 6,6±0,4 в порівнянні з середовищем, де енхансери не додавали, кількість колоній становила 4,6±0,2. Кількість колоній Escherichia coli з додаванням похідних ізохіноліну становить в середньому 6,3±0,2, а з додаванням похідних імідазолу – 6,5±0,4 в порівнянні з контрольними посівами на МПА без енхансерів – 5,7±0,2. Кількість колоній Pseudomonas aeruginosa та Bacillus subtilis, з додаванням похідних ізохіноліну становять в середньому 6,7±0,4 і 5,4±0,2, а з похідними імідазолу 6,7±0,4 і 5,5±0,2 відповідно. Контрольні посіви становлять 5,5±0,2 і 4,8±0,3 відповідно. Кількість квирощених колоній Candida albicans з додаванням похідних ізохіноліну становлять 5,5±0,1, а з похі-

дними імідазолу - 6,3±0,1 що на порядок вище, ніж відповідні контрольні (4,5±0,2).

Таблиця 1. Вплив концентрацій енхансерів різних груп на зростання колоній стандартних штамів мікроорганізмів

Мікроорганізми	Кількість вирощених колоній за десятковим логарифмом (lg) з додаванням енхансерів						Контрольний посів на МПА
	Похідні ізохіноліна, концентрація,мг/мл			Похідні імідазола, концентрація,мг/мл			
	0,1	0,01	0,001	0,1	0,01	0,001	
Staphylococcus aureus ATCC 25923	5,5±0,4	5,3±0,1	5,2±0,2	6,6±0,4	6,7±0,5	6,8±0,4	4,6±0,2
Staphylococcus aureus ATCC 6538	5,6±0,3	5,3±0,2	5,2±0,2	6,8±0,5	6,7±0,4	6,7±0,3	4,8±0,3
Escherichia coli ATCC 25922	6,4±0,3	6,3±0,2	6,2±0,2	6,5±0,4	6,4±0,3	6,5±0,2	5,7±0,2
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	6,7±0,4	6,7±0,3	6,6±0,2	6,8±0,3	6,7±0,4	6,5±0,4	5,5±0,2
Bacillus subtilis ATCC 6633	5,6±0,1	5,4±0,2	5,4±0,3	5,5±0,2	5,6±0,3	5,5±0,2	4,8±0,3
Candida albicans ATCC 885/653	5,7±0,1	5,5±0,1	5,3±0,2	6,4±0,3	6,3±0,1	6,4±0,4	4,5±0,2

Примітка:n=5

Результати досліджень впливу концентрацій енхансерів різних комбінацій на КУО стандартних штамів мікроорганізмів представлені в таблиці 2.

Таблиця 2. Вплив концентрацій енхансерів різних комбінацій на зростання стандартних штамів мікроорганізмів

Мікроорганізми	Кількість вирощених колоній мікроорганізмів за десятковим логарифмом (lg) з додаванням енхансерів				Контроль МПА
	1- похідні изохіноліна (мг/мл), 2- похідні імідазола (мг/мл)				
	0,1+0,1	0,1+0,01	0,01+0,1	0,01+0,01	
Staphylococcus aureus ATCC 25923	6,7±0,1	6,4±0,4	6,5±0,5	6,3±0,4	4,6±0,2
Staphylococcus aureus ATCC 6538	6,5±0,5	6,3±0,3	6,4±0,6	6,3±0,4	4,8±0,3
Escherichia coli ATCC 25922	6,7±0,3	6,5±0,4	5,7±0,5	5,8±0,7	5,7±0,2
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853	6,5±0,5	6,4±0,5	6,4±0,5	6,2±0,4	5,5±0,2
Bacillus subtilis ATCC 6633	6,7±0,6	6,8±0,6	6,5±0,5	6,3±0,4	4,8±0,3
Candida albicans ATCC 885/653	5,7±0,5	5,8±0,4	5,7±0,5	5,5±0,4	4,5±0,2

Примітка:n=5

Із даних, наведених в таблиці 2 видно, що зростання колоній Staphylococcus aureus з додаванням похідних ізохіноліну та імідазолу в концентрації 0,1+0,1 мг/мл становить 6,5±0,5 – 6,7±0,1, в концентрації 0,1+0,01 мг/мл 6,3±0,3 – 6,4±0,4.

Зростання колоній S. aureus з додаванням похідних ізохіноліну та імідазолу до поживного середовища в концентрації 0,01 – 0,01 мг/мл становлять 6,3±0,4 в порівнянні з контрольними посівами на МПА – 4,6±0,2

Ступінь колонієутворення Escherichia coli, Bacillus subtilis, Candida albicans з додаванням комбінацій енхансерів зростає із збільшенням концентрації енхансерів. На стандартному МПА значно нижче їх швидкість зростання.

При порівнянні отриманих даних (табл.1,2) можна зробити висновок, що комбінована дія енхансерів значно збільшує швидкість зростання посівів стандартних штамів мікроорганізмів.

Висновки

В перспективі використання неметоболітних енхансерів може значно змінити картину не тільки медичної біотехнології, а й промислової – прискорити час отримання відновленого палива – етанолу, біомаси дріжджів, синтезу фармацевтичних препаратів – бета-циклодекстрину, інтерферону, інтерлейкіну та інших.

Література
1. Патент № 2006112368 Россия, МКИ C12N1/20 Способ применения стимулятора роста микроорганизмов в биологической промышленности /Веревкина М.Н., Заерко В.И., Сурмило А.П. (Россия),- № 2006112368/13, Заявл. 13.04 2006, Опубл. 27.10.2007
2. Нуратинов Р.А. Вопросы экологии микобактерий и родственных им микроорганизмов.//Ветеринария. – 1999. - № 9, С.27-29.
3. Патент № 22833347 Россия, МКИ C12N1/38 Способ получения эмбрионального стимулятора роста микроорганизмов/Тимченко Л.Д., Ржепаковский И.В., Тюменцева И.С., Афанасьєв Е.Н., Вакулин В.Н., Косик Н.В. (Россия),- № 2004115830/13, Заявл.24.05.2004, Опубл. 1.01.2006
4. Патент № 2005108115 Россия, МКИ C12N1/20 Способ получения питательной среды для культивирования Yersinia enterocolitica/ Плешакова В.И., Нелепова М.Ю., Трапезников С.В., Конев А.В. (Россия), - №2005108115/13, Заявл.22.03.2005, Опубл. 10.10.2006
5. Патент № 2227158 Россия, МКИ C12N1/00 Способ получения стимулятора роста микроорганизмов из кормовых дрожжей /Омарова Э.Б., Меджидов М.М., Султанов З.З.(Россия),- №2002119940/13, Заявл.22.07.2002, Опубл.20.04.2004
6. Осолодченко Т.П., Кучма И.Ю., Порт Е.В., Новиков С.В.,Холодная Т.В. Сравнительная характеристика степени адгезии штаммов Pseudomonas aeruginosa и антибиотико-резистентности за последние 60 лет // Роботи співробітників музею патогенних для людини мікроорганізмів, вип.3 «Методи одержання чистих культур мікроорганізмів і їх довгострокового зберігання в колекціях», Київ, «Знання», 2005, С.41-45
7. Мартинов А.В., Черних В.П. Хімічна модифікація високомолекулярних лікарських засобів – продуктів біотехнології як інструмент тонкого впливу на їх фармакологічні властивості// Клінічна Фармація. – 2002. – Т.6, №3. – С.3-8

УДК 579.61

Використання стимуляторів росту мікроорганізмів для накоптчення біомаси

Батрак О.А., Чупринова С.І., Завада Н.П., Рябова І.С.

Вивчено вплив стимуляторів росту мікроорганізмів (енхансерів) на появу перших колоній та на збільшення біомаси мікробних клітин. Досліджено, що ростові якості мікроорганізмів значно збільшуються на поживних середовищах з додаванням енхансерів ніж на стандартному МПА. Концентрація енхансерів не значно впливає на швидкість колонієутворення за визначений інтервал часу.

Ключові слова: мікроорганізми, поживне середовище, енхансери.

УДК 579.61

Использование стимуляторов роста микроорганизмов для накопления биомассы

Батрак Е.А., Чупринова С.И., Завада Н.П., Рябова И.С.

Изучено влияние стимуляторов роста микроорганизмов (энхансеров) на появление первых колони и на увеличение биомассы микробных клеток. Исследовано, что ростовые качества микроорганизмов значительно увеличиваются на питательных средах с добавлением энхансеров по сравнению со стандартным МПА. Концентрация энхансеров незначительно влияет на скорость колониеобразования за определенный интервал времени.

Ключевые слова: микроорганизмы, питательная среда, энхансеры

UDK 579.61

Use of growth factors of microorganisms for escalating a biomass

Batrak E. A., Chuprinova S.I., Zavada N. P., Rjabova I.S.,

Influence of growth factors of microorganisms (enhancers) on occurrence of the first colonies and on increase in a biomass of microbic cells is studied. It is investigated,that increase qualities of microorganisms considerably increase on nutrient mediums with addition enhancers in comparison with standards medium. Concentration enhancers slightly Influences speed of increase in a form make colony of microorganisms for the certain interval of time.

Key words: microorganisms, medium, enhancers