

УДК 579.69:594

**ВИВЧЕННЯ РОСТОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ
ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ІЗ ЗЕРНОВОЇ
БАРДИ ВІДНОСНО ТЕСТ-ШТАМІВ
МІКРООРГАНІЗМІВ**

**Осолоченко Т.П., Волянська Н.П.,
Батрак О.А., Завада Н.П., Порт О.В.,
Рябова І.С., Штикер Л.Г., Пономаренко С.В.**

**ДУ “Інститут мікробіології і імунології ім. І.І.
Мечникова
АМН України”, м. Харків**

Суттєвими умовами для накопичення біомаси мікроорганізмів та підтримки активності штамів є оптимізація культивування відповідно до споживання поживних речовин середовищ. В більшості випадків традиційні середовища отримують із м'ясної і рибної сировини, де умовами переробки корисних речовин є гідроліз, який триває до 14 діб [1,2].

В останній час дослідників привертає увагу використання білків рослинного походження, джерелом якого є недорога сировина. Принаймі вона дозволяє знизити ризик випадкового введення тваринних та людських патогенів. Таку сировину отримують із сої, інших бобових культур та відходів зерна при виробництві спирта. Досвід використання рослинних гідролізаців в поживних середовищах відомий, але не знайшов широкого застосування в практиці. В зарубіжних фірмах при виробництві поживних середовищ використовують білкові гідролізати отримані із сої, але інша рослинна сировина не привернула до себе уваги [3,4].

Виходячи з цього, розробка поживного середовища із відходів спиртового виробництва для накопичення біомаси мікроорганізмів та прискорення колонієутворення, на наш погляд вельми раціональна. Зернова барда є відходом спиртового виробництва та містить незамінні амінокислоти (лізін, метіонін), які природно не синтезуються в організмі тварин і людей. В барді білки складають 26,3 %, вуглеводи – 16,5 %, ліпіди – 6,0 %, мінеральні солі – 2,4 %, (0,5 – 1,0) %, в меншій долі присутні вітаміни групи В. За звичай зернову барду переробляють в суху та використовують в якості компоненту кормовому раціоні для сільськогосподарських тварин [5].

Впровадження гідролізаців із зернової барди в мікробіологічне виробництво передбачає широке вивчення цієї сировини, що стосується її ростових властивостей до різних груп мікроорганізмів, можливість застосування цих середовищ при мікробіологічному оцінюванні санітарного стану приміщень, для визначення ефективності дезінфекційних та лікувальних засобів, при тестуванні імунобіологічних препаратів на контамінацію [6].

Удосконалення технологічних процесів рослинних гідролізаців та виробництво на їх основі поживних середовищ для наукової і практичної бактеріології є актуальним завданням та перспективним напрямком.

Метою наших досліджень було оцінити середовища, виготовлені на основі гідролізаців із зернової барди за ростовими властивостями по відношенню до різних груп мікроорганізмів.

Матеріали та методи

Об'єктами дослідження були слідуєчі штами мікроорганізмів, одержані із музею живих культур ДУ “ІМІ ім. Мечникова АМН України” та рекомендовані для перевірки якості поживних середовищ і визначення вгтимікробної активності: *Staphylococcus aureus* 25923 ATCC, *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC *Escherichia coli* 25922 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ATCC, *Pseudomonas aeruginosa* 27857 ATCC, *Bacillus subtilis* 6633 ATCC, *Candida albicans* 885/653 ATCC

Всі штами зберігались в напіврідкому середовищі. Життєздатність клітин підтримували методом пересівів на тверде поживне середовище. Культуральні та морфологічні властивості мікроорганізмів підтверджували шляхом посіву на селективні середовища та мікроскопією клітин. Стандартні середовища готували відповідно до вимог виробника. В якості стандартного середовища був обраний МПА [7].

Вихідною сировиною для приготування поживного середовища була зернова барда – відхід спиртового виробництва, одержана з Харківського дріжджового заводу. З метою одержання живильної основи середовища для проведення гідролізу використовували 3,0 %-ний та 5,0 %-ний розчин соляної кислоти, 0,2 %-ний розчин оцтової кислоти, активоване вугілля. Суміш відстоювали протягом 2 діб, фільтрували, потім автоклаували при тиску 1,5 атм на протязі 2 годин, проводили зміну кислоти та процес повторювали. Просвітлений гідроліз зернової барди фільтрували через склотканинний або ватно-марлевий фільтр та визначали вміст амінного азоту

Скомпановане живильне середовище містять в якості основи солянокислий гідролізац зернової барди, вмістом амінного азоту – 140 мг %, вміст агар-агару – 2,0 %, натрію хлориду – 7,5 г/л, рН – 7,3. Суміш остаточно автоклаували 20 хв. при тиску 1 атм.

Перевірку ростових якостей основи проводили за методикою [8]. На виготовлені середовища здійснювали висів мікробних культур (з маточної культури, що відповідала 1,0 одиниці каламутності за McFarland, робили послідовні розведення: 10^{-6} , 10^{-7} мікробних клітин в 0,1 мл стерильному фізіологічному розчину). Кількість мікробних клітин додатково

означували за оптичним стандартом каламутності. В роботу брали стандартні штами мікроорганізмів, що рекомендовані для контролю якості поживних середовищ. Наявність росту при висіву 10^{-6} - 10^{-7} мікробних клітин рахували за показник задовільної ростової якості середовища відносно конкретного тест-штаму. Оцінювали типовість росту мікроорганізмів на розроблених середовищах за культурально-морфологічними ознаками візуально та за даними мікроскопії мазків пофарбованих за Грамом [9].

Таблиця 1 Кількість амінного азоту в зерновій барді, гідролізованій різними дозами HCl

Концентрація соляної кислоти, %	Аміний азот, мг % (M±m) p<0,05	Концентрація водневих іонів (pH) (M±m) p<0,05
3,0	245,3 ± 15,3	7,2±0,2
5,0	271,5 ± 22,3	7,0±0,2

Наведені данні свідчать, що гідроліз зернової барди 3,0 %-ною та 5,0 % -ною HCl забезпечує достатній рівень амінного азоту. Кислотний гідроліз зернової барди призводив до появи незначного осаду, що обумовлено необхідністю фільтрації. В подальшому було сконструйоване поживне середовище слідуочим чином: соляну кислоту нейтралізували до pH 7,0 – 7,2, потім розбавляли дистильованою водою до вмісту амінного азоту 120 – 140 мг %. За рахунок нейтралізації надлишку кислоти утворювався NaCl, концентрація якого становила в середовищах (0,5 – 0,8) %. В середовища вносили 2,0 % агару та стерилізували. Після стерилізація додатково контролювали вміст амінного азоту та pH середовища.

Результати та обговорення

В результаті досліджень було виготовлено декілька серій гідролізатів із зернової барди. Рівень амінного азоту та концентрацію водневих іонів в гідролізаті зернової барди від концентрації соляної кислоти ілюструють данні табл. 1.

Одержане середовище використано для культивування різних груп мікроорганізмів, як музейних штамів, так і клінічних ізолятів мікробів. Паралельно проводили їх висів на м'ясо-пептоний агар. Порівняння одержаних результатів надало можливість оцінити продуктивність досліджуваних живильних середовищ для мікроорганізмів (табл.2). Наведені в таблиці дані свідчать, що продуктивність розробленого середовища із зернової барди з достатнім ступенем вірогідності (p<0,05) висока в порівнянні з прототипом – поживним агаром. Середовище із зернової барди за своїми ростовими властивостями для культивування мікроорганізмів, не відрізняється від стандартного середовища.

Таблиця 2- Порівняльна характеристика кількості мікроорганізмів, що вирости на дослідному та стандартному середовищі

Вид мікроорганізму	№ штаму	Розве дення	Кількість колоній (M+m) p<0,05	
			ПА	Гідролізат зернової барди
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923 ATCC	10^{-6}	65,4±0,9	58,5±0,6
		10^{-7}	6,4±0,5	5,8±0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538 ATCC	10^{-6}	63,2±0,8	57,3±0,7
		10^{-7}	6,3±0,7	5,7±0,3
<i>Escherichia coli</i>	25922 ATCC	10^{-6}	69,9±0,6	58,4±0,5
		10^{-7}	6,8±0,4	5,8±0,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027 ATCC	10^{-6}	71,6±0,7	67,5±0,8
		10^{-7}	7,1±0,3	5,7±0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27857 ATCC	10^{-6}	72,2±0,9	66,3±0,6
		10^{-7}	7,2±0,5	6,6±0,4
<i>Bacillus subtilis</i>	6633 ATCC	10^{-6}	74,4±0,8	69,8±0,7
		10^{-7}	7,4±0,4	6,9±0,4
<i>Candida albicans</i>	885/653 ATCC	10^{-6}	75,4±0,9	67,5±0,8
		10^{-7}	7,4±0,7	6,7±0,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	27	10^{-6}	57,2±0,5	51,4±0,5

		10^{-7}	5,7±0,3	5,1±0,3
<i>Escherichia coli</i>	18	10^{-6}	63,4±0,7	59,8±0,7
		10^{-7}	6,3±0,3	5,9±0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53	10^{-6}	67,1±0,6	58,5±0,4
		10^{-7}	6,7±0,3	5,8±0,2

Примітка : означення наявності росту та кількісна оцінка масиву мікроорганізмів проведена 24 години культивування для (бактерій) та через 48 годин (для грибів)

Культурально морфологічні ознаки були типовими, а окремі біологічні властивості, залишалися стабільними. Середовище із кислотного гідролізату зернової барди раціонально використовувати для культивування для *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*. Протеїні культури виявляють ріст лише при високих посівних дозах, що дещо обмежує непридатність дослідженого середовища для їх накопичення. Мікроскопічне дослідження підтвердило морфологію використаних тест-мікробів в процесі культивування на запропонованому середовищі.

Враховуючи, що на сконструйованому живильному середовищі достатньо продуктивно вегетують взяті до досліду різні тест-культури грам-позитивних та грам-негативних мікробів, нами виконано порівняльне дослідження з метою виявлення дозозалежності мікробної навантаження на живильне середовище від рівня амінного азоту. Для цього приготовано ряд поживних середовищ з різним вмістом амінного азоту, в межах (100,0 – 180,0) мг %. На чашки Петрі висіяно штами *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 в діапазоні посівної дози 10^{-6} мікробних клітин (табл.3).

Таблиця 3 Активність росту тест-штамів на середовищі із зернової барди при різних значеннях амінного азоту

Амінний азот, мг %	Ступень росту мікробів (КУО/мл) при засіві 10^{-6} (M+m) p<0,05		
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027
90,0	49,4±0,8	51,2±0,5	45,6±0,7
100,0	53,3±0,5	53,5±0,7	53,6±0,8
120,0	65,7±0,8	59,8±0,4	59,9±0,9
140,0	69,9±0,7	66,5±0,7	66,6±0,7
150,0	65,5±0,8	58,8±0,6	61,3±0,3
170,0	57,1±0,4	53,1±0,4	55,9±0,5
190,0	52,3±0,6	50,2±0,3	52,3±0,5

Примітка: облік результатів проведено через 24 год.

На основі результатів досліду показано, що вміст оптимальної кількості амінного азоту для росту тест-штамів, які використовують в якості контрольних для перевірки ростових властивостей середовищ, є (120,0 – 140,0) мг %.

Екстрополуючи дані, можна сформульовано висновок, що отримані в результаті досліджень поживні середовища із гідролізатів зернової барди забезпечують необхідні ростові властивості та культуральні-морфологічні ознаки тест-штамів.

Перелік посилань

1. Иванкин, А.Н. Биологически активные вещества из животной ткани и микроорганизмов. Методы получения и структурно-функциональные взаимосвязи [Текст]: автореф.

дис...д-ра хим.наук 14.00.03 /АН Россия - М., 1998. - 39 с.
2. Орел, Л.И. Обзор патентных документов по применению питательных сред для выращивания бактерий [Текст]: /Л. И. Орел, Л. Д. Дубанская //ЖМЭИ. – 1993. - №12. – С.22-26.
3. Адлова, Г.П. Разработка стимуляторов роста бактерий из растений [Текст] / Г.П. Адлова, С.В. Денисова, А.К. Имиджев и др. //ЖМЭИ. – 1998. - №1. – С.13-17.
4. Блинкова, П.П. Микробиологические питательные среды и перспективы их разработки [Текст]: /П.П. Блинкова, М.Ю. Зотина, М.В. Щербатых, З.И. Ершова // ЖМЭИ 1995.- № 5.- С.25-32.
5. Воронина, Т.Ю. Получение гидролизатов из дефектного зерна злаков [Текст]: /Т.Ю. Воронина, Т.В. Рязанова, С.М. Воронин// Химия растительного мира.-1998.- № 2.- С.15-17.

6. Baronets, N.G. Vitamin K as stimulation of microbial growth. [Text]/ Baronets N.G// Zh Microbiol Epidemiol Immunobiol.-2003.-V.4.- P.104-105.
7. Інформаційний лист МОЗ України № 05.4.1/1670 «Бактеріологічний контроль поживних середовищ», Київ, 2000 р.
8. Меджидов, М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. [Текст]:/М.М. Меджидов М.: Медицина.- 250 экз.- 2003.- 316 с.
9. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования [Текст]: // Под ред. М.О.Биргера, 3-е изд.- М.: Медицина, 1982.- 464 с.

УДК 579.69:594

ВИВЧЕННЯ РОСТОВИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ІЗ ЗЕРНОВОЇ БАРДИ ВІДНОСНО ТЕСТ-ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

Осолодченко Т.П., Волянська Н.П., Батрак О.А., Завада Н.П., О.В. Порт, І.С. Рябова, Л.Г. Штикер, Пономаренко С.В.

В роботі наведені результати дослідження поживних середовищ виготовлених на основі зернової барди. Шляхом засіву невеликої кількості тест-штамів мікроорганізмів визначали ростові властивості розроблених середовище. Встановлено, що типові культурально-морфологічні ознаки штамів зберігаються, а поживне середовище із зернової барди придатне для культивування різних видів мікробів.

Ключові слова: поживні середовища, гідролізати, мікроорганізми.

УДК 579.69:594

ИЗУЧЕНИЕ РОСТОВЫХ СВОЙСТВ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ИЗ ЗЕРНОВОЙ БАРДЫ В ОТНОШЕНИИ ТЕСТ-ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ

Осолодченко Т.П., Волянская Н.П., Батрак Е.А., Завада Н.П., Порт Е.В., Рябова И.С., Штикер Л.Г., Пономаренко С.В.

В работе представлены результаты исследований питательных сред, полученных на основе зерновой барды. Путем посева небольшого количества тест-штаммов микроорганизмов определяли ростовые свойства сред. Было установлено, что культурально-морфологические признаки штаммов сохраняются, а питательные среды из зерновой барды пригодны для культивирования различных видов микробов.

Ключевые слова: питательные среды, гидролизаты, микроорганизмы.

УДК 579.69:594

GROWS PROPERTIES OF NUTRIENT MEDIA OF GRAIN BARDA IN RESPECT OF TEST-MICROORGANISMS

Osolodchenko T.P., Volyanska N.P., Batrak E.A., Zavada N.P., Port E.V., Ryabova I.S., Shtiker L.G.,

The work represents the research results of nutrient media from the grain barda. The inoculation of media by small amounts of microorganisms grows properties of nutrient. The establishment preservation of typical culture and morphological properties, nutrient media of grain barda for culture

Key words: nutrient media, hydrolyzates, microorganisms