

УДК 579.69: 594 (262.5)

К. Ю. КОЛЕСНИКОВА, аспірант

В. Г. СКРИПНИК, доктор ветеринарних наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, (м. Київ)

ВПЛИВ НАПІВРІДКИХ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ З МОРСЬКИХ ГІДРОБІОНТІВ НА ДОВГОТРИВАЛЕ ЗБЕРЕЖЕННЯ ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ПРОМИСЛОВИХ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ

*У роботі представлені результати випробування напіврідких живильних середовищ, виготовлених на основі гідролізатів морських гідро біонтів для довготривалого зберігання промислових штамів мікроорганізмів. Встановлено, що ці середовища можуть бути придатні для довготривалого зберігання промислових штамів мікроорганізмів таких як *Salmonella dublin* 373, *Str.fecalis* 356,189, «Соколово» та *Er.rhusiopathiae* BP-2 із збереженням їх основних біологічних властивостей.*

Ключові слова: живильні середовища, морські гідробіонти, гідролізати, мікроорганізми

У наш час однією з гострих проблем становлення та розвитку біологічної промисловості в Україні є винайдення не дорогих та якісних живильних середовищ для культивування в промислових умовах широкого спектру мікроорганізмів при виробництві профілактичних, діагностичних та лікувальних засобів

Дослідники вважають, що отримати стандартизовані середовища можна використовуючи для їх приготування не тільки екстракти а й гідролізати, тому що глибину гідролізу, а в решті і його склад простіше стандартизувати. [1]

Існуюча практика використання м'ясних переварів за Хоттінгером для накопичення бактеріальної маси виявилася ефективною, але у зв'язку з великим дефіцитом та високою вартістю цього продукту, а також нераціональністю використання м'яса не за прямим призначенням, м'ясо не є оптимальним продуктом для виготовлення бактеріологічних середовищ.

Крім того м'ясні середовища не можуть забезпечити потреби цілого ряду мікроорганізмів, що викликає необхідність додаткового внесення в поживні середовища таких інгредієнтів як пептон, печінкові та дріжджові екстракти тощо[2]

Окрім цього, м'ясні середовища не стандартні, не стійкі при зберіганні, не транспортабельні.

Між тим чисельні спроби замінити м'ясо іншими білковими продуктами – казеїном, кров'ю та кров'яними згустками, м'ясо-кістковим, рибним та китовим борошном, соєю та горохом – виявилися безуспішними [3].

Так питання розробки технології отримання, стандартизації, оцінки якості живильних середовищ з природної сировини мають певні не вирішені труднощі. Це зумовлено, перш за все зниженням якості самої сировини, в тому числі м'яса та рослинних об'єктів, в зв'язку зі складною екологічною обстановкою та антропогенним впливом на навколишнє середовище. У такій сировині частіше за все містяться антибіотики, хімікати, нітрати, токсичні продукти, що негативно впливають на культивування та кінцевий вихід біомаси мікроорганізмів та знижує результативність діагностичних досліджень. [4,5,6]

Морські гідробіонти це джерело нових біологічно активних речовин. Дослідження біохімічного складу гідробіонтів та їхньої харчової цінності довели, що м'ясо безхребетних характеризується високим вмістом незамінних амінокислот, мікроелементів і вітамінів, у тому числі і В₁₂. [7, 8, 9]. За поживною цінністю продукти з мідій знаходяться на одному рівні з яйцем, молоком і м'ясом наземних тварин, а за засвоюваністю значно перевершують його. У м'ясі безхребетних відкрито понад 38 мікроелементів. [10,11]

Відомості про реальні результати використання морських гідробіонтів для культивування мікроорганізмів – одиничні, а саме використання пептону “Каспій”, ГРБ середовищ для культивування широкого спектру мікроорганізмів, азотвмісною основою яких є ферментативний гідролізат рибного борошна; культивування ряду умовно-патогенних мікроорганізмів роду *Listeria*, та *Yersinia* азотвмісною основою яких є відвар молока лососевих риб тощо.

У зв'язку із вищезазначеним, пошук нових, екологічно чистих та економічно виправданих джерел сировини, а також шляхів підвищення їхньої біологічної повноцінності з метою розробки високоякісних поживних середовищ для культивування та довготривалого зберігання мікроорганізмів в промислових умовах, є актуальним та своєчасним завданням.

Метою наших досліджень було порівняти рівень збереження життєздатності штамів мікроорганізмів *Salmonella dublin 373*, *Str.fecalis 356,189*, «Соколово» та *Er.rhusiopathiae BP-2* на напіврідких агарах з морських гідробіонтів та м'ясного перевару Хоттінгера.

Матеріали та методи. Дослідження проводили в умовах Херсонського державного підприємства – біологічна фабрика протягом 2011 року. Виробничі вакцинні штами збудників сальмонельозу телят, ентерококу телят, поросят, ягнят та бешихи свиней культивували на напіврідких середовищах на основі гідролізатів з морських гідробіонтів та еталонному напіврідкому агарі Хоттінгера.

Культури штамів висівали по 1см³ на середовища однакові за поживною цінністю. Після добового культивування пробірки з висівами закривали гумовими пробками та закладали на зберігання в холодильник при температурі 8-10⁰ С. Через 1,3,6, та 10 місяців перевіряли життєздатність культур. Для цього стерильною піпеткою перемішували середовище у пробірці, відбирали 0,5см³ вмісту та висівали в 5см³ МПБ. Потім методом кінцевих розведень встановлювали накопичення відповідних штамів бактерій.

Типовість культур встановлювали за даними мікроскопії мазків, пофарбованих за Грамом.

Дані зіставляли з рекомендованими способами виготовлення та зберігання таких імунобіологічних препаратів:

1. Концентрованої формол-галуневої вакцини проти сальмонельозу (паратифу) телят – суспензія сіро-білого кольору з жовтуватим відтінком з невеликим сірувато-білим осадом культури штаму *Salm.dublin 373*, виробник Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика (термін придатності 24 місяці з дня виготовлення).

2. Вакцини проти ентерокової інфекції телят, ягнят і поросят – суспензія жовто-коричневого кольору з сірувато-білим осадом культури штамів *Str.fecalis 356,189*, «Соколово», виробник Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика (термін придатності 24 місяці з дня виготовлення).

3. Вакцини проти бешихи свиней живої сухої – ліофілізована жива бульйонна культура штаму ВР-2, виробник Херсонське державне підприємство – біологічна фабрика (термін придатності 9 місяців з дня виготовлення).

Життєздатність мікроорганізмів, які зберігалися у холодильнику на напіврідких живильних середовищах з морепродуктів, перевіряли через 1,3, 6,10 місяців після посіву культур на МПБ.

Результати досліджень. Результати мікроскопії при вивченні культурально-морфологічних властивостей промислових штамів впродовж всього терміну зберігання показали, що культури на середовищах з гідролізатів морських гідробіонтів, мали типові характерні особливості, які узгоджуються з даними паспорту на відповідні штами.

Типовість морфологічних ознак мікробних клітин після висіву на МПБ не відрізнялася від первинних посівів на середовища, що свідчить про відсутність негативного впливу умов зберігання на середовищах з морських гідро біонтів протягом більше 10 місяців.

Таблиця №1

Рівень збереження життєздатності досліджуваних штамів мікроорганізмів при зберіганні на поживних середовищах

Найменування штамів	Еталонне середовище на переварі Хоттінгера, %					Досліджуване поживне середовище на основі гідролізатів з морських гідробіонтів, %				
	Конц. вих. мате-ріалу	1міс.	3міс.	6міс.	10міс.	Конц. вих. мате-ріалу	1міс.	3міс.	6міс.	10міс.
<i>Salm.dublin 373</i>	100 % (2×10^9)	94,5± 4,7	86,0± 4,3	51,0± 2,8	24,8± 3,5	100 % (2×10^9)	98,5± 2,9	93,7± 5,8	87,4± 3,2	74,6± 3,6
<i>Str.fecalis 356</i>	100 % (2×10^9)	98,6± 2,5	98,0± 3,1	72,4± 2,2	46,4± 5,1	100 % (2×10^9)	99,1± 4,8	98,3± 5,2	92,2± 4,5	80,5± 1,7
<i>Str.fecalis 189</i>	100 % (2×10^9)	98,0± 3,4	97,2± 1,4	76,2± 3,7	49,0± 3,6	100 % (2×10^9)	99,5± 3,7	98,8± 2,6	90,0± 1,8	70,8± 1,3
<i>Str.fecalis</i> «Соколово»	100 % (2×10^9)	96,2± 5,3	94,0± 6,2	70,3± 1,8	35,5± 2,5	100 % (2×10^9)	98,6± 4,3	96,7± 2,5	82,0± 1,4	75,3± 4,8
<i>Er.rhusiopathiae</i> ВР-2	100 % (1×10^9)	78,3± 2,5	43,6± 1,3	–	–	100 % (1×10^9)	82,7± 3,5	65,8± 2,1	34,0± 3,6	–

Примітка: різниця значень наведених показників вірогідна за $P < 0,001$ відносно значень відповідних показників до закладання на зберігання

У порівнянні з еталонними середовищами інтенсивність росту на досліджуваних середовищах протягом 3-х місяців зберігання не відрізнялися, за виключенням *Er.rhusiopathiae* BP-2, життєздатність яких на досліджуваному поживному середовищі була вища у 1,5 рази.

По закінченні 6-ти місяців зберігання, кількість життєздатних клітин в середовищах знизилася, та швидкість помутніння середовища відповідно уповільнилась, але досліджувані середовища випереджали еталонні за рівнем збереження життєздатності, відповідно *Salm.dublin* 373 в 1,7 рази, стрептококів в середньому в 1,2 рази, *Er.rhusiopathiae* BP-2 через 6 міс в еталоні ріст був відсутній, а в досліджуваному поживному середовищі наявний та складав $34,0 \pm 3,6 \%$, або 340млн мікробних клітин в 1см^3 .

На 10 місяць спостереження активним залишалось еталонне поживне середовище, але поступалося досліджуваному за рівнем збереження життєздатності сальмонел та стрептококів відповідно: сальмонел у 3 рази, а стрептококів в 1,7 разів.

Висновок. Зберігання промислових штамів мікроорганізмів для виготовлення ветеринарних імунобіологічних препаратів можливо проводити на напіврідких поживних середовищах з морських гідро біонтів в продовж не менше як 6 місяців за температури 8-10⁰С.

Список використаної літератури

1. *Бабич, М. А.* Гидролизатные среды для изготовления вакцин и антигенов. Научный отчет контрольного института ветеринарных препаратов / М. А. Бабич // Сельхозгиз, 1947.- С.171
2. *Голубь Н. А.* Изучение белкового состава водного экстракта из мидии *Mytilus galloprovincialis* Lam. // Экология моря.-2000.-№53.-С.68-72.
3. *Бабич, М. А.* Гидролизатные среды для изготовления вакцин и антигенов. Научный отчет контрольного института ветеринарных препаратов / М.А.Бабич // Сельхозгиз, 1947.- С.171
4. *Старцева, О.Л.* Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения: дис.канд.биол.наук: 03.00.23 / О.Л.Старцева. Ставрополь,2005.-182с.
5. *Лагунов Л. Л.* О питательной ценности и использовании некоторых беспозвоночных / Л.Л. Лагунов, Н.И. Рехина // Рыбное хозяйство. – 1962. – 11. – С. 82–85
6. *Рябушко В. І.* Пат. 91133 Україна, МПК UA A61K 39/02 C12N 1/20 (2009). Поживне середовище для культивування штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathiae* / В.І.Рябушко, Н.А.Пархоменко, В.Є.Єрохін, М.О.Голуб, К.Ю.Колеснікова // Заявник і патентовласник: Інститут біології південних морів ім.О.О.Ковалевського національної академії наук України, Севастополь; заявл. 10.11.2008; опубл. 25.06.2010; Бюл. №12. – 2 с.

7. *Рябушко В. І.* Пат. на корисну модель 40468 Україна, МПК UA A61K 39/02 C12N 1/20 (2009). Поживне середовище для культивування штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathiae* / В.І.Рябушко, Н.А.Пархоменко, В.Є.Єрохін, М.О.Голуб, К.Ю.Колеснікова // Заявник і патентовласник: Інститут біології південних морів ім.О.О.Ковалевського національної академії наук України, Севастополь; заявл. 10.11.2008; опубл. 10.04.2009; Бюл. №7. – 2 с.

8. *Пархоменко Н. А., Кисельова Т.Ф., Голуб М.О., Рябушко В.І.* Ростові властивості поживних середовищ з чорноморських гідробіонтів /.- Ветеринарна біотехнологія.- К., 2006.- №8.- С.197-202.

9. Колеснікова К. Ю., Пархоменко Н. А, Рябушко В. І., Голуб М. О., Скрипник В. Г. Використання бактеріальних поживних середовищ з морепродуктів для культивування промислових штамів мікроорганізмів в умовах Херсонського державного підприємства – біологічна фабрика./ Ветеринарна біотехнологія.- К., 2008.- № 13(1).- С.273-277.

10. Деклараційний патент на корисну модель "Спосіб отримання поживної основи мікробіологічних середовищ". Бюл.№ 6 от 25.03.2008. Заявка у 2007 13089 от 26.11.2007. Автори: Рябушко В.І., Голуб М.О., Єрохін В.Є., Пархоменко Н.А., Кисельова Т.Ф.

11. Деклараційний патент на корисну модель "Поживне середовище "Аквamedia" для культивування мікроорганізмів" Бюл. №16 от 26.08.2008. Заявка у 2008 00653 от 21.01 2008. Автори:Єремєєв В.Н., Рябушко В.І., Голуб М.О., Єрохін В.Є., Пархоменко Н.А., Кисельова Т.Ф., Скрипник В.Г.

ВЛИЯНИЕ ПОЛУЖИДКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ИЗ ГИДРОЛИЗАТОВ МОРСКИХ ГИДРОБИОНТОВ НА ДОЛГОВРЕМЕННОЕ СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ПРОМЫШЛЕННЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ / К. Ю. Колес-никова, В.Г. Скрипник

В работе представлены результаты испытания полужидких питательных сред, изготовленных на основе гидролизатов морских гидробионтов для длительного хранения промышленных штаммов микроорганизмов. Установлено, что эти среды могут быть пригодны для длительного хранения промышленных штаммов микроорганизмов, таких как Salmonella dublin 373 Str.fecalis 356,189, «Соколово» и Er.rhusiopathiae ВР-2 с сохранением их основных биологических свойств.

Ключевые слова: питательные среды, морские гидробионты, гидролизаты, микроорганизмы.

EFFECT OF SEMILIQUID NUTRIENT SOLUTIONS OF SEA HYDROCOLES ON LONG-TERM VIABILITY PRESERVATION OF INDUSTRIAL STRAINS OF MICROORGANISMS / K.Y. Kolesnikova, V.G. Skripnyk

This paper presents the testing results of semiliquid nutrient solutions prepared on the basis of hydrolysates of sea hydrocoles for long-term preservation of industrial strains of microorganisms. It is found that these solutions may be suitable for long-term preservation of industrial strains of microorganisms such as Salmonella dublin 373, Str.fecalis 356,189, “Sokolovo” Er.rhusiopathiae and VR-2 while preserving their basic biological properties.

Key words: nutrient solutions, sea hydrocoles, hydrolysates, microorganisms.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Н. Г.Пінчук

Рукопис надійшов 28.09.2013р.