

УДК 576.851.49/ 57.083.1

**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ
МІКРООРГАНІЗМІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ
НА ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ,
ОТРИМАНИХ ІЗ ВІДХОДІВ ВИРОБНИЦТВА**

Осолодченко Т. П.

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

Пошук нових білкових компонентів та конструювання на їх основі економічних і доступних поживних середовищ залишається важливою проблемою в мікробіології. Це обумовлено стрімким розвитком таких підрозділів мікробіології, як біотехнології, виробництво імунобіологічних препаратів і вакцин, діагностика інфекційних захворювань, суто наукових досліджень. Все це зумовлює необхідність більш широкого використання в практичних лабораторіях, в лікувальних та наукових закладах не тільки поживних середовищ, виготовлених із високоєфективних білкових компонентів (м'яса, риби, молочних продуктів, тощо). Але дефіцит м'яса та його харчова цінність вимагає пошуку нових більш дешевих живильних основ і тому необхідність в них в останній час надзвичайно зросла. Таким чином, продовжує набувати великого значення питання здешевлення поживних середовищ, тобто заміни традиційної харчової сировини на нехарчові, але висококалорійні білкові відходи [1, 2].

Найбільш практичне застосування серед замінників м'яса при виготовленні поживних середовищ здобули різноманітні відходи виробництва крові, відходи м'ясо-молочного та дріжджового виробництва, що містять цінні мінеральні сполуки

Таким чином можна зробити висновок, що питання про заміну харчової сировини на нехарчову, пошук нових джерел білка та додавання в отримані живильні основи стимуляторів росту мікробів, які сприяють накопиченню біомаси клітин бактерій, є актуальною проблемою. В практиці розробки та конструювання поживних середовищ вона розглядається як найбільш важливий напрямок проведення наукових досліджень в цій галузі, а також є об'єктом детального вивчення. [3, 4].

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом дослідження були, як стандартні штами мікроорганізмів з колекції основного фонду Музею патогенних для людини мікроорганізмів та рекомендованих ВООЗ для виконання відповідних дослідних робіт, і штами виділені з клінічного матеріалу [5].

Для дослідження брали тест-штами мікроорганізмів:

Staphylococcus aureus ATCC 25923;
Escherichia coli ATCC 25922;
Proteus vulgaris ATCC 4636;
Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853;
Candida albicans ATCC 885/653

промисловий:

Pseudomonas aeruginosa 66-16;
та клінічні, отримані з інших колекцій:
Staphylococcus aureus 83;
Escherichia coli.31.

Для вирощування бактерій в якості основних поживних середовищ використовували поживний агар, для грибів – агар Сабуро. Для визначення антибіотикочутливості мікроорганізмів - агар АГВ. Поживну агаризовану основу готували у відповідності із настановами підприємств-виробників. Дослідні серії поживних середовищ отримували шляхом кислотного гідролізу із відходів служби крові (IV фракція гамаглобулінового виробництва) та спиртового виробництва (зернова барда). При конструюванні поживного середовища враховували показники ступеню розщепленості вихідної сировини, накопичення амінного азоту та фізичні властивості. Культивування бактерій здійснювали при температурі 37° С продовж 18-24 години, а грибів при температурі 25°С 48-72 годин. При вирощуванні мікроорганізмів на експериментальних середовищах та стандартному поживному агарі проводили вивчення їх морфокультуральних властивостей (розмір та форми колоній мікроорганізмів, їх колір, стан, фарбування за Грамом). Чутливість до антибіотиків визначали методом дисків з урахуванням діаметрів зон затримки росту. В дослід брали стандартні диски антибіотиків: ампіцилін, гентаміцин, цефазолін, тетрациклін, офлоксацин [6,7]. У клінічних штамів стафілокока та синьогнійної палички вивчали порівняльні адгезивні властивості за методом В.І. Бриліс з формалізованими еритроцитами крові людини [8]. За ступенем адгезивності визначали індекс адгезивності (ІАМ). Мікроорганізми були неадгезивними при ІАМ < 1,75, низькоадгезивними – від 1,76 до 2,5, середньоадгезивними – від 2,6 до 4,0, високоадгезивними - > 4,0. Результати оброблялись статистично [9].

Результати та обговорення

За результатами дослідів було встановлено, що за фізико-хімічними показниками гідролізати, що були отримані із відходів IV фракції гамаглобулінового виробництва (I експериментальне середовище), та спиртового виробництва - зернова барда (II експериментальне середовище), не відрізнялись від стандартного поживного агару. Штами стафілококів та кишкової палички, як музейних, так і клінічних, по культуральним та морфологічним ознакам не відрізнялись один від одного при вирощуванні на дослідних та контрольному поживних середовищах. У *Candida albicans* ATCC 885/653 при вирощуванні на середовищі із відходів імунобіологічних препаратів колонії були невеликі за розміром, не блискучі та не вологі у порівнянні із колоніями, які культивувались на середовищі з поживним агаром та відходів зернової барди. У штамів *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та 66-16 при культивуванні на середовищі із відходів IV фракції гамаглобулінового виробництва спостерігалась відсутність пігменту, який є одним із факторів патогенності мікроорганізму. Однак було відмічено, що у протей при культивування на дослідних середовищах, які були отримані шляхом кислотного гідролізу, відсутній феномен "роїння". Він полягає в тому, що на вологих агаризованих

поверхнях клітини протею утворюють однорідку плівку, яка застиляє весь агар на чашках Петрі. В той же час на розроблених середовищах із відходів ІV фракції гамаглобулінового виробництва та зернової барди утворюються окремі колонії за рахунок зниження кількості перитрихальних жгутиків. Таким чином, при вирощуванні мікроорганізмів та грибів на середовищах, які отримані із відходів виробництва, спостерігається різниця в морфокультуральних ознаках колоній в порівнянні із стандартним середовищем.

Одним із тестових показників ростової якості середовища є врожай клітин мікроорганізмів при засіві визначеної посівної дози, яка складала 10^3 КУО/мл. В дослідних середовищах із відходів ІV фракції гамаглобулінового виробництва та спиртової барди через 24 години кількість колоній мікроорганізмів серед штамів *S.aureus* і *E.coli* дорівнювала $10^4 - 10^5$ КУО/мл і не відрізнялась від кількості на стандартному середовищі. При засіві *Proteus vulgaris* на експериментальних середовищах із відходів ІV фракції гамаглобулінового виробництва та зернової барди феномен "роїння" відсутний, а кількість поси-

вного матеріалу складала $< 10^3$ КУО/мл. У *Pseudomonas aeruginosa* відзначалось збільшення біомаси на середовищах із зернової барди ($10^5 - 10^6$ КУО/мл) та зменшення на середовищах із відходів ІV фракції гамаглобулінового виробництва ($< 10^3$ КУО/мл). На стандартному поживному агарі кількість колоній синьогнійної палички становила $10^4 - 10^5$ КУО/мл.

Кількість колоній грибів роду *Candida* на І-му дослідному середовищі (ІV фракції гамаглобулінового виробництва) складала $< 10^3$ КУО/мл. При культивуванні на агарі Сабуро та ІІ-му дослідному середовищі (зернова барда) кількість колоній була $10^4 - 10^5$ КУО/мл.

Таким чином ростові якості середовища, що отримані шляхом кислотного гідролізу із зернової барди (відходів спиртового виробництва), були вищі за показниками кількості колоній мікроорганізмів у порівнянні із середовищем, що отримано із відходів ІV фракції гамаглобулінового виробництва та не поступались якості стандартного поживного агару. Данні наведені в таблиці 1.

Таблиця 1 Кількість колоній (КУО/мл) мікроорганізмів при культивуванні на експериментальних середовищах та стандартному поживному агарі

Мікроорганізми	Кількість колоній мікроорганізмів (КУО/мл) на середовищі при засіві 10^3 КУО/мл		
	МПА	Відходи ІV фракції гамаглобулінового виробництва	Зернова барда
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	$10^4 - 10^5$	$< 10^3$ КУО/мл	$< 10^3$ КУО/мл
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	$10^4 - 10^5$	$< 10^3$ КУО/мл	$10^5 - 10^6$
<i>Candida albicans</i> ATCC 885/653	$10^4 - 10^5$	$< 10^3$ КУО/мл	$10^4 - 10^5$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 66-16	$10^4 - 10^5$	$< 10^3$ КУО/мл	$10^5 - 10^6$
<i>Staphylococcus aureus</i> 83	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$
<i>Escherichia coli</i> .31.	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$	$10^4 - 10^5$

Чутливість до антибактеріальних препаратів визначали по зонам затримки росту при культивуванні штамів мікроорганізмів на середовищах із відходів ІV фракції гамаглобулінового виробництва, зернової барди та МПА. Було встановлено, що діаметри зони затримки росту мікроорганізмів при культивуванні на експериментальних середовищах не відрізнялись від діаметрів зон на стандартних. Різниця спостерігалась в межах норми і була вірогідною ($p < 0,05$). Дані по визначенню антибактеріальної активності мікроорганізмів наведені в таблиці 2.

Відомо, що адгезія є одним із факторів патогенності та відіграє важливу роль в розвитку інфекційного процесу. Визначення ступені адгезії за ІАМ при культивуванні мікроорганізмів на середовищах із відходів імунобіологічних препаратів та зернової барди показало, що індекси адгезії не відрізнялись.

Штами, що були середгьоадгезивними або низькоадгезивними ці характеристики зберігали при культивуванні на стандартному та експериментальних середовищах. Дані по ступені адгезії мікроорганізмів наведені в таблиці 3.

Таким чином, проведені дослідження свідчать про задовільні ростові властивості розробленого середовища із зернової барди (відходів спиртового виробництва) шляхом кислотного гідролізу та ІV фракції гамаглобулінового виробництва для штамів протею, які не поступаються якостям стандартного МПА та агару АГВ. Культуральні та морфологічні ознаки мікроорганізмів були типовими при культивуванні мікроорганізмів та грибів на середовищі отриманому із зернової барди. Ступень адгезії вірогідно не відрізнялась у штамів при культивуванні на експериментальних середовищах.

Таблиця 2 Антибактеріальна активність мікроорганізмів при культивуванні на стандартних та дослідних середовищах

Середовище	Антибіотики	Діаметри зон затримки росту мікроорганізмів в мм $M \pm m$ ($p < 0,05$)			
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
МПА	ампіцилін	28,2±1,8	17,3±0,9	x	x
	гентаміцин	25,1±1,5	20,9±1,3	19,9±1,1	20,6±1,4
	цефазолін	32,3±2,1	23,4±1,3	x	x
	тераціклін	26,8±1,7	x	x	x
	офлоксацин	35,9±2,5	27,4±1,9	24,3±1,5	23,8±1,7
IV фракція гамаглобулінового виробництва	ампіцилін	26,2±1,4	16,4±0,8	x	x
	гентаміцин	22,6±1,1	21,4±1,2	17,7±0,9	18,5±1,1
	цефазолін	29,8±2,1	20,5±0,9	x	x
	тераціклін	25,8±1,4	x	x	x
	офлоксацин	32,3±2,2	23,5±1,3	20,2±0,8	21,1±0,8
Зернова барда	ампіцилін	27,3±1,7	18,1±0,7	x	x
	гентаміцин	23,1±1,2	21,6±1,2	17,4±0,7	19,8±0,8
	цефазолін	30,4±1,9	22,1±1,4	x	x
	тераціклін	25,7±1,6	x	x	x
	офлоксацин	33,5±2,4	25,3±1,7	21,1±0,9	22,2±1,1

Примітка: x – відсутність діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів

Таблиця 3 Ступінь адгезії мікроорганізмів при культивуванні на різних середовищах

Мікроорганізми	Ступінь адгезії за індексом (ІАМ) при культивуванні на різних середовищах $M \pm m$		
	IV фракція гамаглобулінового виробництва	Зернова барда	Поживний агар
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,4±0,4	3,2±0,3	3,6±0,5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,8±0,3	2,9±0,3	3,5±0,5
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	2,2±0,2	2,3±0,2	2,8±0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	2,5±0,2	2,7±0,3	3,3±0,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 66-16	2,1±0,1	2,5±0,3	2,3±0,2
<i>Staphylococcus aureus</i> 83	3,6±0,5	3,7±0,5	3,9±0,6
<i>Escherichia coli</i> .31	3,5±0,3	3,9±0,5	4,1±0,6

Висновки

1. Підтверджена ростова якість експериментальних середовища із відходів виробництва імунобіологічних препаратів та спиртового виробництва, яка не поступається ростовим якостям стандартного МПА.
2. Визначена перспективність подальшого вивчення зернової барди, як джерела мікробіологічних поживних середовищ.
3. Культуральні та морфологічні властивості штамів мікроорганізмів при культивуванні на дослідних середовищах не відрізнялись від властивостей при вирощуванні мікроорганізмів на стандартних середовищах.
4. Виявлено, що при культивуванні штаму протея на розробленому середовищі із IV фракції гамаглобулі-

нового виробництва відсутній феномен “роїння”, що дозволяє отримати окремі колонії мікроорганізмів.

5. Чутливість в до антибактеріальних препаратів та ступінь адгезії у мікроорганізмів не відрізнялись при культивуванні їх на середовищах із відходів виробництва та стандартному.

Список літератури

1. Раскин Б.М. Отечественные сухие питательные среды и перспективы их разработки// ЖМЭИ.-1990.- № 7.- С.25-32.
2. Пивоварова Н.И. Изучение возможности использования гидролизатов кормовых дрожжей и крови животных для изготовления питательных сред для диагностики клинических инфекций// ЖМЭИ.-1990.-№ 7.-С.32-35.

3. Бабушкин И.Н. Использование отходов плацентарной и абортной крови для приготовления питательной среды// Лабораторное дело.-1964.-№ 2.- С.741-743.
4. Журбенко Р.С., Барростабения Маркус Ф., Родригес Мартинес К., Варела Янес А.Э. Изучение возможности использования бактериологического пептона из цельной крови как питательной основы для выращивания микроорганизмов// ЖМЭИ.-1993.-№ 2.- С.23-27.
5. Каталог культур: Бактерії. Мікоплазми. Хламідії. Дріжджоподібні гриби. Міцеліальні гриби. Культури клітин / Сельнікова О.П., Мавров І.І., Бощенко Ю.А. та інш., - Київ: Знання, 2000.- 119 с.
6. Методические указания по применению унифицированных микробиологических методов исследования в клинико-диагностических лабораториях. Приказ № 535 от 22.04.1985 МЗ СССР.
7. Методические рекомендации определения активности антибактериальных средств наружного применения для лечения гнойно-воспалительных инфекций. Харків - 1991.- 14 с.
8. Брилис В.И., Брилине Т.А., Ленцер А.А., Ленцер Х.П. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов// Лаб. дело.-1986.-№ 4.- С.210-212.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М. 1990.-352 с.

УДК 576.851.49/ 57.083.1

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ ПРИ КУЛЬТИВУВАННІ НА ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩАХ, ОТРИМАНИХ ІЗ ВІДХОДІВ ПРОМИСЛОВОСТІ

Осолдченко Т. П

В роботі показана можливість використання відходів промисловості, для одержання живильної основи з метою конструювання микробиологічних поживних середовищ шляхом кислотного гідролізу. Дана оцінка ростових властивостей сконструйованих живильних середовищ на основі вивчення процесу культивування та біохімічних ознак штамів мікроорганізмів в порівнянні із стандартними середовищами.

Ключові слова: живильна основа, середовища, мікроорганізми, антибіотики, адгезія

УДК 576.851.49/ 57.083.1

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

Осолдченко Т. П

В работе показана возможность использования промышленных отходов с целью получения питательной основы для микробиологических сред путём кислотного гидролиза. Дана оценка ростовых свойств полученных питательных сред на основе изучения процесса культивирования и биохимических свойств штаммов микроорганизмов в сравнении со стандартными питательными средами.

Ключевые слова: питательная основа, среды, микроорганизмы, антибиотики, адгезия

УДК 576.851.49/ 57.083.1

BIOLOGICAL PROPERTIES OF MICRORGANISMS CULTIVATED ON NUTRITIOUS MEDIUM RECEIVED FROM INDUSTRY WASTE

Osolodchenko T.P

In work the opportunity use for reception of a nutritious basis for microbiological nutrient mediums by acid hydrolysis is shown. The estimation properties of the received nutrient mediums on the basis of studying process of cultivation microorganisms and biochemistry properties in comparison with standard nutrient mediums is given.

Key words: nutritious basis, medium, microorganisms, antibiotics, adhesion