

ПОЖИВНІ СЕРЕДОВИЩА НА ОСНОВІ ВІДХОДІВ ПТАХОФАБРИК ДЛЯ ВИРОЩУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ РІЗНИХ ТАКСОНОМІЧНИХ ГРУП

¹Ястремська Л.С., ²Криштаб Т.П.

¹Національний авіаційний університет, Інститут екологічної безпеки,

пр-т Космонавта Комарова, 1, м. Київ, 03058, Україна

²Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,

вул. Акад. Заболотного, 154, м. Київ, 03680

e-mail: lozare@gmail.com

На основі відходів птахівництва, а саме – курячого посліду та продуктів переробки птахів, розроблено недорогі поживні середовища для культивування мікроорганізмів різних таксономічних груп з діагностичною метою для лабораторних і клінічних умов, які можуть бути використані замість дорогих натуральних багатокomпонентних поживних середовищ.

Ключові слова: курячий послід, поживні середовища, сапрофітні мікроорганізми, умовно-патогенні мікроорганізми

Поживні середовища мають виняткове значення в мікробіології. Підбір оптимального складу середовища забезпечує можливість виділення певних мікроорганізмів, отримання чистих культур, вивчення їх морфологічних і фізіологічних особливостей, ідентифікації та інше.

Поживні середовища класифікують за фізичним станом, призначенням та складом. За складом середовища розділяють на натуральні та синтетичні постійного вмісту, компоненти яких уводяться в середовище за приписом [1]. Натуральні середовища складаються з продуктів рослинного та тваринного походження з невизначеним складом. Використовуються, головним чином, для підтримки росту культур мікроорганізмів, накопичення їх біомаси та діагностичних цілей. Як основу поживних середовищ з рослинної сировини часто використовують продукти гідролізу сої, які містять амінокислоти, подібні за складом до амінокислот тваринних білків [2]. Найбільш використовуваним натуральним поживним середовищем при роботі з мікроорганізмами залишається м'ясо-

пептонний бульйон (МПБ) і м'ясо-пептонний агар (МПА) та його різні модифікації. Джерелом азоту в цих середовищах є продукти розщеплення білків – пептони, суміш амінокислот, поліпептидів. Для культивування умовно-патогених мікроорганізмів додають збагачувальні компоненти – кров, сироватку, плаценту, цукор, фруктові соки, яєчний жовток і інше [2].

Натуральні середовища вимагають великих витрат і використання їх у наукових, практичних та промислових масштабах економічно недоцільне. Так, вартість МПБ, триптозо-соевого бульйону (ТСБ), складає 100-200 \$ за літр (залежно від виробника, розфасовки та упаковки) [3].

У зв'язку з цим, проводять оптимізацію існуючих поживних середовищ та створюють нові, економічно вигідні. На наш погляд, для цього доцільно використовувати відходи сільськогосподарського виробництва – курячий послід, який накопичується в великих масштабах та представляє серйозну проблему екологічної безпеки навколишнього середовища. Дослідження хімічного складу відходів птахівництва показало, що вони містять велику кількість органо-мінеральних сполук [4], тому їх можна розглядати як основу дешевого, багатокомпонентного поживного середовища. Відомий “Спосіб приготування основи для живильних середовищ для вирощування мікроорганізмів” [5], де органо-мінеральне середовище пропонується як універсальне середовище для культивування мікроорганізмів, але таке середовище не завжди може задовольнити потреби мікроорганізмів різних таксономічних груп у зв'язку з обмеженим складом його інгредієнтів.

У зв'язку з цим, метою нашої роботи є отримання недорогого поживного середовища на основі відходів птахофабрик для культивування мікроорганізмів різних таксономічних груп, склад якого легко корегується відповідно до потреб різних мікроорганізмів за рахунок внесення біодобавок, якими можуть бути внутрішні органи птахів.

Матеріали і методи. Сировиною для поживного середовища (умовна назва середовища “П”) є нативний послід (75 % вологості), відібраний на птахофабриці. З єдиної партії посліду брали певну наважку, заливали киплячою дистильованою водою (з розрахунку 200 г/л). Протягом 1,5 год. проводили екстракцію при 60 °С, безперервно помішуючи. Після екстракції суспензію центрифугували (8000 об/хв, 20 хв) або фільтрували, використовуючи гарячу

вакуумфільтрацію. Для приготування середовища використовували рідку фракцію. Отриманий об'єм рідини розливали у флакони або колби по 50-100 мл та стерилізували при 1,5 атм. 30 хвилин. Після стерилізації вимірювали інтенсивність кольору та рН середовища. Отримували прозорий розчин (показання ФЭК – 0,08 од. екст.), рН середовища корегували в залежності від умов росту різних груп мікроорганізмів.

Після стерилізації проводили хімічний аналіз отриманого середовища. Білок визначали методом Лоурі, азот NO_3^- – реактивом Грісса, азот NO_2^- – методом Граньвань-Ляжу, азот NH_4^+ – за використання реактиву Несслера, фосфор – методом Фіске-Суббароу, органічний вуглець – методом Тюріна [1]. Катіони (Na^+ , K^+ , Mg^+ тощо) визначали на атомно-адсорбційному електрофото-метрі С-302. Амінокислотний склад – на автоматичному аналізаторі амінокислот “АА-300-39” [6].

Амонійний азот має пригнічувальні властивості, тому кількість його не повинна перевищувати 100 мг/л. У разі перевищення – розбавляли фосфатним буфером або стерильною дистильованою водою.

Біодобавку готували з залізистого шлунку курей в умовах *in vitro* ферментативним гідролізом шлункової тканини птахів. Тканину шлунку розрізали, промивали та подрібнювали. Наважку тканини, з розрахунку 10 мг/мл заливали 0,1 N розчином соляної кислоти, тобто створювали умови для переварювання залізистої тканини пепсином шлунку в кислому середовищі. Тривалість гідролізу – 24 години, $t^\circ = 37^\circ\text{C}$. Залишки тканини видаляли фільтрацією. Фільтрат нейтралізували, потім фільтрували за допомогою фільтрів “Milipor”. Отриманий розчин біодобавки стерильно вносили до поживного середовища “П”.

Ріст сапрофітних та умовно-патогенних мікроорганізмів досліджували за накопиченням біомаси (г/л) та за величиною оптичної густини клітинної суспензії. Інтенсивність росту та накопичення біомаси мікроорганізмів проводили на апараті “Abbott” [7]. Тривалість інкубування – 6 годин, $t^\circ = 37^\circ\text{C}$.

На поживному середовищі “П” досліджували особливості росту сапрофітних, облігатно-анаеробних термофільних мікроорганізмів: метаногенні асоціації, целюлолітичний штаб *Clostridium thermocellum* 5СТ, які були виділені з активного мулу метантенка [8]. Середовище для облігатно-анаеробних мікроорганізмів

розливали в атмосфері інертного газу [9]. Культивування анаеробів проводили в пеніцилінових флаконах об'ємом 30 мл. Об'єм середовища – 10 мл. Кількість внесеного інокуляту – 2 мл. Субстрат – целюлоза (фільтрувальний папір) – 10 г/л. Як контрольне середовище використовували мінеральне середовище “Р”, рН 7,0-7,5, тривалість інкубування – 5-7 діб, $t^{\circ} = 60^{\circ}\text{C}$.

Ріст облігатно-анаеробних мікроорганізмів оцінювали за виділенням газів H_2 , CH_4 . Склад газів аналізували на газовому хроматографі ЛХМ-8МД [8]. Для визначення водню використовували сталеву колонку завдовжки 1,5 м і діаметром 3 мм, заповнену молекулярними ситами 5А фракції 0,25. Для визначення CH_4 використовували сталеву колонку завдовжки 2,5 м і діаметром 3 мм, заповнену полісорбom-1. Температура колонок 30°C , газ носій – аргон, швидкість потоку – 30 мл/хв, детектор – за теплопровідністю, струм детектора – 100 мА. Проби газової фази відбирали шприцем, об'єм проби – 0,5 мл.

Результати та їх обговорення. Поживне середовище “П” без біодобавки та з нею використано для культивування мікроорганізмів різних таксономічних груп: сапрофітних і умовно-патогенних. За хімічним складом поживне середовище “П” містить білок, біогенні елементи, комплекс мікро- і макроелементів, амінові кислоти, тощо, що відповідає багатокомпонентним поживним середовищам (табл. 1).

Облігатно-анаеробні, термофільні газотворюючі (H_2 , CH_4) мікроорганізми вирощують на мінеральному середовищі з додаванням ростових факторів – вітамінів, дріжджового автолізату або рідини метантенку [10]. При дослідженні росту анаеробних мікроорганізмів встановлено, що утворення водню целюлолітичним штамом *C. thermocellum* 5СТ (А) та метану – метаногенною асоціацією (Б) на середовищі “П” на основі курячого посліду відбувалося в 1,5-2 рази інтенсивніше, ніж на контрольному мінеральному середовищі (рис. 1).

Вирощування сапрофітних та умовно-патогенних мікроорганізмів на середовищі «П» показало накопичення до 3-3,7 г/л клітинної біомаси. Активність росту *Proteus spp.*, *Enterobacter sp.*, *Candida albicans* на поживному середовищі “П” вища в 2,5-4 рази у порівнянні зі стандартним контрольним середовищем МПБ (табл. 2).

Таблиця 1. Хімічний склад поживного середовища “П” на основі курячого посліду

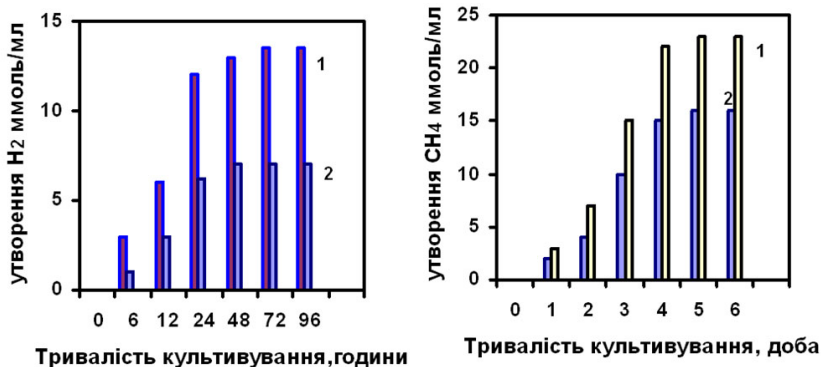
Компоненти	Вміст, г/кг
Білок	225
Амінові кислоти:	
Аспарагінова кислота	2,5
Треонін	0,72
Серін	0,66
Глутамінова кислота	4,8
Гліцин	1,56
Аланін	8,55
Валін	1,8
Метіонін	1,5
Гістидін	1,5
Лізін	1,6
Макроелементи:	
Вуглець	3,3
Азот	1,75
Фосфор	10,5
Калій	80,0
Натрій	35,0
Кальцій	100,0
Магній	50,
Мікроелементи:	
Мідь	0,4
Марганець	1,0
Залізо	2,0

Збільшення біомаси можна пояснити наявністю в середовищі “П” значної кількості макро- і мікроелементів, білка, амінових кислот та інших ростових факторів, що забезпечують повноцінність поживного середовища.

Для умовно-патогенних мікроорганізмів потрібні багатокомпонентні середовища з амінокислотами, вітамінами тому, що вони пристосувалися до життя в організмі людини і тварин.

У таблиці 3 наведено амінокислотний склад різних органічних середовищ “Abbott”, “199”, “ТСБ” (крім амінокислот середовища містять ще близько 30 інших сполук) [2, 7, 11]. Аналіз даних таблиці 3 свідчить, що зазначені середовища містять значну кількість амінокислот. Для збагачення середовища “П” амінокислотами використовували біодобавку – гідролізат шлункової тканини птахів.

Внесення біодобавки в середовище “П” підвищує вміст амінокислот, зокрема гістидину, в 40 разів, інших амінокислот – у 5-20 разів.



А)

Б)

Рис. 1. Динаміка росту анаеробних мікроорганізмів на середовищах:

1 – на основі курячого посліду; 2 – контроль;

А) утворення водню целюлолітичним штамом *S. thermocellum* 5СТ; Б) утворення метану метаногенною асоціацією;

Таблиця 2. Активність росту сапрофітних і умовно-патогенних мікроорганізмів у стандартному м'ясо-пептонному бульйоні (МПБ) та поживному середовищі “П”

Мікроорганізми	Накопичення біомаси, г/л	
	м'ясо-пептонний бульйон	поживне середовище “П”
<i>Candida albicans</i>	0,45±0,04	2,00±0,01
<i>Enterobacter</i> sp.	0,86±0,01	2,50±0,01
<i>Klebsiella</i> sp.	0,95±0,02	1,95±0,01
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,08±0,01	2,80±0,01
<i>Proteus</i> spp.	1,28±0,10	2,61±0,21
<i>Pseudomonas</i> spp.	1,54±0,11	3,03±0,23
<i>E. coli</i>	2,65±0,01	3,71±0,01

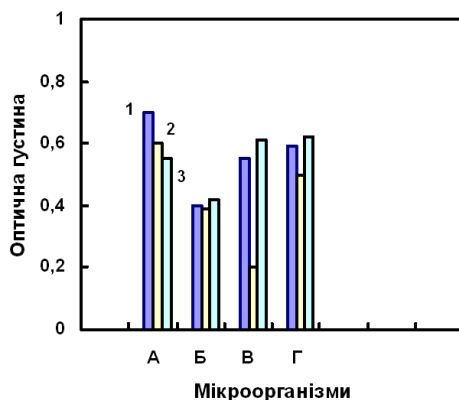
Культивування умовно-патогенних мікроорганізмів (рис. 2) на середовищі “П” зі збагаченим складом амінокислот за рахунок біодобавки, в порівнянні з середовищем “Abbott”, показало, що всі досліджені культури впродовж 6 годин росту накопичували майже однакову (0,4-0,43 од. екст. *E. coli*, 0,5-0,57 од. екст. *Staphylococcus*

aureus) або у 1,5-2 рази вищу клітинну біомасу (0,2-0,57 од. екст. *Klebsiella sp.* та 0,55-0,75 од. екст. *Proteus spp.*) як на середовищі “П”, середовищі “П” з біодобавкою, так і на контрольному середовищі “Abbott”, яке зазвичай використовують для культивування досліджених груп мікроорганізмів. Це свідчить, що розроблене середовище “П” з біодобавкою не поступається за своїм складом дорогому (за ціною) середовищу “Abbott” та може його замінити.

Таблиця 3. Амінокислотний склад поживних середовищ

Амінокислоти, мг/л	Середовища					
	“Abbott” [7]	199 [2, 11]	МПБ [2]	ТСБ [2, 11]	“П”	“П” з біо- добавкою
Аспарагінова к-та	216,2	60,0	136,1	60,23	7,74	25,0
Треонін	95,37	60,0	56,5	76,72	0	20,0
Серін	136,8	50,0	56,56	112,0	2,13	29,0
Глутамінова к-та	639,9	156,6	242,1	147,7	14,2	34,0
Пролін	278,4	40,0	223,4	142,2	4,88	29,0
Гліцин	49,74	50,0	101,2	34,61	23,76	38,0
Аланін	94,4	50,0	199,1	96,97	40,98	63,0
Цистеїн	0	0,11	95,53	0	0	29,0
Валін	143,5	50,0	172,6	177,4	0	24,0
Метіонін	43,43	30,0	66,65	111,1	2,28	31,0
Ізолейцин	87,11	40,0	133,2	120,2	9,28	28,0
Лейцин	199,3	120,0	261,8	665,5	17,55	73,5
Тірозин	65,45	57,66	67,47	257,1	5,8	41,0
Фенілаланін	139,1	50,0	122,7	489,3	15,19	65,0
Гістидин	165,1	21,88	176,9	466,3	8,6	344,0
Лізин	181,0	70,0	250,6	76,95	13,27	67,0
Аргінін	106,5	70,0	62,66	395,4	0	20,0
Діамінопімілінова к-та	0	0	0	0	0	2,4

Примітка: ТСБ – триптозо-соевий бульйон.



А – *Proteus spp.*; Б – *E. coli*; В – *Klebsiella sp.*; Г – *Staphylococcus aureus*
 1– “П”; 2 – “П” з біодобавкою; 3 – “Abbott”

Рис. 2. Ріст умовно-патогенних мікроорганізмів на поживних середовищах

Таким чином, розроблені поживні середовища “П” та середовище “П” з біодобавкою апробовані при культивуванні мікроорганізмів різних таксономічних груп. Показано, що вони можуть використовуватися для культивування мікроорганізмів з діагностичною метою у лабораторних і клінічних умовах. Відходи птахофабрик є дешевою великотонажною сировиною і поживні середовища, виготовлені на їх основі, можуть використовуватися замість дорогих натуральних багатокomпонентних поживних середовищ. Вартість таких середовищ за сировиною складає приблизно 0,01 \$ за літр, це робить їх конкурентноспроможними та перспективними.

1. Методы общей бактериологии /под ред. Ф. Герхарда: в 3 т. – М.: Мир, 1984. – Т. 1. – 536 с.

2. Поляк М.С. Питательные среды для медицинской микробиологии /М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб.: НИЦФ, 2002. – 80 с.

3. Микробиологические питательные среды. Прайс-лист //Фирма “Астра” Россия [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://astralabor.ru/micro-2.html>. 1. – 2 с. формату А4.

4. Дубровский В.С. Метановое сбраживание сельскохозяйственных отходов /В.С. Дубровский, У.Э. Виестур. – Рига: Зинатне, 1988. – 204 с.

5. Пат. 17391 Україна, С12N 1/00. Спосіб приготування

основи для живильних середовищ для вирощування мікроорганізмів /Малашенко Ю.Р., Руденко А.В., Карпенко В.І.– № 17391; заявл. 15.04.97; опубл. 31.10.97, Бюл. № 5.

6. Криштаб Т.П. Антиалкогольна та антинаркологічна дія *Methylobacterium extorquens* УКМВ-33-68 [Т.П Криштаб, В.О. Романовська, М.А. Стогній та ін.] //Мікробіол. журн. – 2009. – Т. 71, N 4. – С. 34-41.

7. Products by category «Abbott». – Режим доступу: <http://abbott.com> – 1 с. формату А4

8. Ястремская Л.С. Идентификация термофильных анаэробных микроорганизмов, изолированных из метантенка /Л.С. Ястремская //Мікробіол. журн. – 1993. – Т. 55, № 6. – С. 3-12.

9. Чернышенко Д.В. Система для создания анаэробноза /Д.В. Чернышенко //Мікробіол. журн. – 1992. – Т. 54, № 6. – С. 74-78.

10. Жилина Т.Н. Методы выделения и культивирования метанобразующих бактерий /Т.Н. Жилина, Г.А. Заварзин //Теоретические и методические основы изучения анаэробных микроорганизмов. – Пушино: НЦБИ, 1978. – С. 68-89.

11. Коротяев А.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология /А.И. Коротяев, С.А. Бабичев. – СПб.: СпецЛит, 2002. – С. 470-591.

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА НА ОСНОВЕ ОТХОДОВ ПТИЦЕФАБРИК ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ РАЗНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП

¹Ястремская Л.С., ²Крыштаб Т.П.

¹Национальный авиационный университет, Институт экологической безопасности,

²Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины

На основе отходов птицеводства, а именно – куриного помета и продуктов переработки птиц, разработаны недорогие питательные среды для культивирования микроорганизмов различных таксономических групп с диагностической целью для лабораторных и клинических условий, которые могут быть использованы вместо дорогих натуральных многокомпонентных питательных сред.

Ключевые слова: *куриный помет, питательные среды, сапрофитные микроорганизмы, условно-патогенные микроорганизмы.*

NUTRIENT MEDIUM BASED WASTE POULTRY FARMS FOR CULTIVATION OF MICROORGANISMS OF VARIOUS TAXONOMIC GROUPS

¹Yastremska L.S., ²Kryshtab T.P.

¹National Aviation University, Institute for Environmental Security

²Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine

On the basis of poultry waste – namely chicken manure and birds processing products the new inexpensive nutrient medium for cultivation of microorganisms of different taxonomic groups were developed as diagnostic tool for laboratory and clinical studies as the substitutes of more expensive natural multi-nutrient media.

Key words: chicken manure, nutrient medium, saprophytic microorganisms, opportunistic pathogenic bacteria.