

## ОДЕРЖАННЯ ЖИВИЛЬНОЇ ОСНОВИ ІЗ ВІДХОДІВ СЛУЖБИ КРОВІ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

*В.М. Ніколаєнко<sup>1</sup>, Т.П. Осолодченко<sup>1</sup>, С.І. Чупрінова<sup>1</sup>, Л.Г. Штикер<sup>1</sup>, О.І. Кравченко<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України, Харків

<sup>2</sup>Національний технічний університет „ХПІ”, Харків

### РЕЗЮМЕ

У роботі показана можливість використання еритроцитарної маси крові людини, для одержання живильної основи з метою конструювання мікробіологічних поживних середовищ шляхом кислотного гідролізу. Дана оцінка ростових властивостей сконструйованих живильних середовищ на основі вивчення процесу культивування тест-штамів у порівнянні із стандартними середовищами.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** живильна основа, конструювання, еритроцитарна маса, кислотний гідроліз, культивування

Питання про заміну харчової сировини на нехарчову є актуальним у практиці виготовлення поживних середовищ для культивування мікроорганізмів. Розробкам технології виготовлення поживних середовищ із промислових білкововмісних відходів, які містять також цінні мінеральні сполуки, для культивування різних штамів мікроорганізмів, приділяють останнім часом велику увагу. Це обумовлено пошуком заміни харчового білка (м'яса) і відповідно, здешевленням вартості мікробіологічних середовищ при збереженні необхідних властивостей, що має велике практичне значення, так як проблема заміни м'ясних середовищ у медичній бактеріології на сьогодні остаточно не вирішена. Складність цієї задачі обумовлена ще й тим, що, з одного боку, патогенні мікроорганізми є гетеротрофами і особливо чутливі до складу середовища, а з іншого – достатньо економічні сировинні джерела не завжди складають весь необхідний комплекс поживних речовин.

Конструювання, технології виготовлення, пошук нових видів сировини є предметом численних дослідів в наукових лабораторіях та фірмах багатьох країн світу [1, 2, 3, 4, 5]. Але в розвинутих країнах виробництвом бактеріологічних живильних середовищ займаються спеціалізовані фірми, які не розкривають своїх технологій у доступній нам літературі, а вказують лише № середовища і мету його застосування. Використання відходів виробництва служби крові здається достатньо обґрунтованим, оскільки нутритивна повноцінна сировина не викликає сумнівів [6, 7, 8, 9].

Актуальність цієї роботи в умовах дефіциту високоякісних харчових продуктів, які традиційно є сировиною для більшості поживних середовищ, очевидна, а подальші наукові дослідження – перспективними, так як поряд з вирішенням суто наукових проблем велике значення набуває питання зде-

шевлення живильних основ.

Метою дослідження є пошук нового дешевого джерела сировини для отримання живильної основи та розробка й наукове обґрунтування етапів конструювання середовищ, доступних для споживання мікроорганізмів.

Робота виконана в рамках НДР Інституту мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова АМН України “Розробка технології отримання компонентів білкових основ живильних середовищ із відходів промисловості імунобіологічних препаратів для культивування музейних та клінічних штамів мікроорганізмів”, № держреєстрації 0104U002955

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для рішення поставлених задач в якості вихідної сировини використовувалась еритроцитарна маса крові з простроченим терміном дії, одержана з Харківської обласної станції переливання крові. Вона являє собою суміш різноманітних за амінокислотним складом білків, збагачена мінеральними солями, що дає можливість розглядати кров як високоякісну сировину для живильних середовищ.

З метою одержання живильної основи було використано декілька способів обробки, але ми зупинились на кислотному та лужному гідролізі. При одержанні живильної основи були проведені досліди по з'ясуванню оптимальних умов експерименту.

Вміст загального, білкового та безбілкового азоту визначали за уніфікованими методами, амінного азоту – формол-титриметричним методом Серенсена, триптофана та заліза за методом І. Йоффе.

Остаточну оцінку живильної повноцінності експериментального середовища давали після проведення бактеріологічних випробувань. В якості тест-об'єктів використовували еталонні штами мікроорганізмів, отримані із музею живих культур:

*Bacillus subtilis* ATCC – 6633, *Escherichia coli* ATCC – 9027, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC – 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC – 6538-P, *Staphylococcus aureus* ATCC – 25923, *Candida albicans* ATCC – 885/653.

Для вирощування бактерій використовували стандартний м'ясо-пептонний агар (МПА) з додаванням глюкози. Середовище готували у відповідності із настановами підприємства-виробника. Мікроорганізми культивували при  $t=37^{\circ}\text{C}$  24 години, а гриби при кімнатній 72 години.

Оптичну щільність мікробної суспензії визначали за допомогою стандарту каламутності. Робота з мікроорганізмами проводилась відповідно до нормативних документів. Результати оброблялись статистично.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У результаті експерименту встановлено, що найбільш ефективним екстрагентом живильної основи із еритроцитарної маси крові людини, враховуючи показники ступеня розщепленості вихідної сировини, накопичення амінного азоту та за фізичними властивостями, виявився солянокислий гідроліз.

*coli* ATCC – 25922, *Pseudomonas aeruginosa*

Невеликі штамоочки еритроцитарної маси відділяли від основного згустку (50 г від фракції 200 г), а потім перемелювали дуже ретельно у фарфоровій ступці. Одержаний матеріал відмивали продовж 96-и годин 0,2% розчином оцетової кислоти, змінюючи розчин в перший день по три рази, а у подальшому по одному разу, зливали верхню рідину, відмивали дистильованою водою і доводили до  $\text{pH} = 6,0$ . Отримані гідролізати доводили дистильованою водою до 500,0 мл і проводили гідроліз за допомогою розчину 12 н соляної кислоти. Суміш стерилізували в автоклаві впродовж 3-х годин при тиску 1,5 атм. Одержану суспензію фільтрували і розводили водою 1:1, освітлювали активованим вугіллям з розрахунку 20 г на літр, знову стерилізували в автоклаві 10 хвилин при  $t^{\circ}=100^{\circ}\text{C}$  та фільтрували через склотканину. Для виготовлення поживного середовища живильну основу розводили до необхідного значення амінного азоту, додавали відповідну кількість агару, доводили до  $\text{pH} = 7,0$  та стерилізували в автоклаві 10 хвилин при  $t^{\circ}=100^{\circ}\text{C}$  (табл. 1).

Таблиця 1

Деякі фізико-хімічні характеристики отриманої основи у порівнянні із стандартними середовищами

Характеристика	Показник	
	Дослідне середовище	Стандартне середовище
Колір	Жовто-коричневий	Жовто-коричневий
Прозорість	Висока	Висока
Здатність до фільтрації	Фільтрується	Фільтрується
Азот загальний, мг %	379,0	350,0
Азот аміний, мг %	353,0	280,0
Fe <sup>2+</sup> , мкг/мл	4,3	4,1
Триптофан, мкг/мл	539,0	500,0

Як видно із наведених даних, одержані гідролізати характеризуються високим вмістом амінного азоту, не відрізняються від стандартних середовищ показники заліза та триптофану.

Для з'ясування адекватності значення

амінного азоту як показника якості живильного середовища було поставлено дослід по визначенню урожаю клітин тестових мікроорганізмів на середовищах з різним вмістом амінного азоту (табл. 2).

Таблиця 2

Урожай клітин тестових мікроорганізмів при різному вмісті амінного азоту на дослідному та стандартному середовищах (тривалість культивування – 18 годин, посівна доза –  $(10 \times 10^8)$ )

Вміст амінного азоту, мг %	Мікроорганізми, млрд / мл			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>
264	0,840	1,100	0,022	2,280
132	0,620	0,780	1,380	3,010
61	0,250	0,700	1,750	3,550
Стандартне середовище 120	0,630	0,750	1,300	3,000

Як свідчать наведені дані, активність росту мікроорганізмів не завжди корелює з кількістю амінного азоту в середовищі. Із досліджених тестових мікроорганізмів

*P. aeruginosa* і *E. coli* дають більший врожай при більш високих значеннях амінного

азоту. Активність росту *S. aureus* та *B. subtilis* гальмується високим вмістом амінного азоту, у той час як при значеннях, рівних (61 та 132) мг%, активність росту практично однакова.

На виготовлені середовища для перевірки

ростових властивостей проводиться висів культур в кількості 500, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> мікробних клітин у 0,1 мл фізіологічного розчину. Наявність росту при висіві 500 та 10<sup>3</sup> мікробних клітин є індикаторами задовільної ростової якості середовища для взятого мікроорганізму. При висіві 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> мікробних клітин ростові властивості

середовища оцінюють як високі і в подальшому можуть бути використані для розробки селективних або діагностично-диференційних середовищ для культивування відповідного виду мікроорганізму та для отримання біологічно активних речовин бактеріального походження (табл. 3).

Таблиця 3

**Ростові якості середовища із еритроцитарної маси у відношенні до тест-штамів мікроорганізмів**

Тест-штами	Ростові якості									
	Основа із HCl – гідролізату					Основа із NaOH – гідролізату				
	Посівна доза клітин									
	500	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	500	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Cillus subtilis</i> ATCC 6633	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	-	-	5 колоній
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	-	-	-	10 колоній	20 колоній
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-	-	3 колонії	5 колоній
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	-	-	-	5 колоній	11 колоній
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	-	-	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	-	-	-	4 колонії	18 колоній

Примітка: підрахунок через 24 години культивування

Дані, наведені в таблиці 3, свідчать про задовільні ростові властивості розробленого середовища із еритроцитарної маси крові шляхом кислотного гідролізу, які не поступаються якостям стандартного МПА, на відміну від лужного гідролізату.

### ВИСНОВКИ

1. Найбільш ефективним екстрагеном живильної основи із еритроцитарної маси крові людини, враховуючи показники ступеня розщепленості вихідної сировини, накопичення амінного азоту та за фізичними властивостями є солянокислий

гідроліз.

2. Підтверджена задовільна ростова якість розробленого середовища із відходів виробництва служби крові, яка не поступається якостям стандартного МПА, та перспективність подальшого вивчення як джерела мікробіологічних поживних основ.
3. Культуральні, морфологічні та біохімічні властивості штамів мікроорганізмів при культивуванні на розроблених середовищах не відрізнялись при вирощуванні на стандартних середовищах.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Пат. 4828500/13 1776690 A1 C12 N 1/00 Способ приготовления питательной основы микробиологической среды из цельной крови животных. Шиловская Т.Е., Литвинец Е.Н. Заявл. 05.04.2001. Оpubл. 12.04.2003.
2. Пат. 2002043586 Украина МКИ C12Q1/04, C12N1/20 Живильне середовище для культивування *Bordetella pertussis*. Щетініна В.М., Везуб Л.Г., Ніколаєнко В.М., Колоколова О.Б. Заявл. 29.04.2002. Оpubл. 15.04.2003. Бюл. № 4.
3. Патент № 2235785 Россия. Питательная среда для выделения бактерий рода *Yersinia*. Меджидов М.М., Мавраєва Р. Н. Оpubл. 2004.09.10.
4. Голшмид В.К., Илджиев А.К., Ландсман Н.М., и др. // Лаб. дело. - 2000. - № 10. - С. 68-70.
5. Ахапкина И.Г., Блинова Л.П. // ЖМЭИ. - 2001. - № 6. - С. 94-104.
6. Орлова О.Е., Ястребова Н.Е., Елкина С.И. // ЖМЭИ. - 2001. - № 3. - С. 111-117.
7. Пиотрович В. А. Разработка питательных сред для культивирования клеток. Автореф. Канд. дис. К., 2002. -18 с.
8. Щетініна В.М., Ніколаєнко В.М., Руденко С.С., и др. // Анали Мечніковського інституту. - Харків. - 2003. - № 4-5. - С. 73-75.
9. Меджидов М. М. Справочник по микробиологическим питательным средам. -М.:Медицина. - 2003. - 240 с.

# ПОЛУЧЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ ОСНОВЫ ИЗ ОТХОДОВ СЛУЖБЫ КРОВИ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

*В.Н. Николаенко<sup>1</sup>, Т.П. Осолодченко<sup>1</sup>, С.И. Чупринова<sup>1</sup>, Л.Г. Штыкер<sup>1</sup>, О.И. Кравченко<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины, Харьков

<sup>2</sup>Национальный технический университет «ХПИ», Харьков

---

## РЕЗЮМЕ

В работе показана возможность использования отходов крови для получения питательной основы для микробиологических питательных сред путём кислотного гидролиза. Дана оценка ростовых свойств полученных питательных сред на основе изучения процесса выращивания тестовых штаммов в сравнении со стандартными питательными средами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** питательная основа, конструирование, эритроцитарная масса, кислотный гидролиз, культивирование

# DEVELOPMENT OF NUTRITIOUS BASIS OF WASTE OF BLOOD FOR CULTIVATION OF MICROORGANISMS

*V.N. Nikolayenko<sup>1</sup>, T.P. Osolodchenko<sup>1</sup>, S.I. Chuprinova<sup>1</sup>, L.G. Chtiker<sup>1</sup>, O.I. Kravchenko<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>I.I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of AMS of Ukraine, Kharkiv

<sup>2</sup>National Technical University of Ukraine, Kharkiv

---

## SUMMARY

In work the opportunity of use of waste of blood 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 test-microorganisms in comparison with standard nutrient mediums is given.

**KEY WORDS:** nutritious basis, development, erythrocytes of blood, acid hydrolysis, cultivation microorganisms