



УКРАЇНА

(19) UA (11) 17391 (13) A
(51) 6 C 12 N 1/00ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДБез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ОСНОВИ ДЛЯ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ВИРОЩУ-
ВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

1

- (21) 93007563
(22) 09.12.93
(24) 15.04.97
(46) 31.10.97. Бюл. № 5
(47) 15.04.97
(56) 1. Мейнел Дж., Мейнел Э Экспериментальная микробиология, 1967.
2. Пяткин К.Д. и соавт. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. М., "Медицина", 1969
3. Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П. - Микробиологический журнал, 1984, № 12
4. Авторское свидетельство СССР № 1124029.
5. Патент Австралии № 475824, кл. C 07 67/00, A 23 1/18; A 23 K 1/00, опублик. 1976.
(72) Малащенко Юрій Романович, Руденко Адель Вікторівна, Карпенко Валерій Іванович

2

- (73) Малащенко Юрій Романович (UA), Руденко Адель Вікторівна (UA), Карпенко Валерій Іванович (UA)
(57) Способ приготовления основы для питательных сред для выращивания микроорганизмов, включающий анаэробную ферментацию куриного помета, разбавленного водой, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что используют куриный помет, разбавленный водой в соотношении 50-100 г на 1 л воды, перед анаэробной ферментацией осуществляют аэробную ферментацию при 28-40°C в течение 48 часов, а анаэробную ферментацию осуществляют при 60°C в течение 3-5 суток с последующим центрифугированием, отделением надосадочной фракции и ее стерилизацией.

Изобретение относится к общей и медицинской микробиологии, а именно получению питательной среды для выращивания микроорганизмов. Оно может быть использовано в научно-исследовательской и практической работе как для выделения и культивирования микроорганизмов, так и для накопления их биомассы в крупнотоннажных промышленных масштабах

Выделение микроорганизмов из объектов среды, получение их биомассы осуществляют на питательных средах. В зависимости от происхождения среды под-

разделяют на сложные непостоянного состава мясо-пептонный бульон (МПБ), картофельная среда и др. и синтетические среды постоянного состава, питательные компоненты которых вводятся в определенную среду строго по прописи (Мейнел Дж., Мейнел Э., 1967).

Сложные среды непостоянного состава более полно, по сравнению с искусственными, удовлетворяют трофическим потребностям растущих микроорганизмов, так как они содержат практически все необходимые для клеток вещества (белки, аминокислоты,

(19) UA (11) 17391 (13) A

нуклеиновые кислоты, минеральные компоненты и т.п.), находящиеся в легкодоступной форме. Именно на таких средах растут условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, обуславливающие инфекционно-воспалительные процессы различной локализации у человека и животных. К таким средам прежде всего относится мясо-пептонный бульон, который готовится прибавлением к мясной воде 1% пептона и 0,5% хлористого натрия с последующим кипячением 20 минут при помешивании. pH среды устанавливают добавлением щелочи (10% раствор едкого натра) до 7,6–7,8. Для стабилизации pH, рекомендуют добавлять к бульону фосфатные буферные смеси с последующим кипячением среды 35–45 минут до выделения осадка. Затем среду фильтруют, добавляют водой до первоначального объема и стерилизуют в автоклаве при 120°C (1 атм) в течение 15–20 минут. На основе МПБ готовится ряд сред специального назначения. Мясная вода готовится из дорогостоящего дефицитного пищевого сырья – обезжиренной высокосортной телятины или говядины (Пяткин К.Д. и соавт. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии. М., "Медицина", 1969, с.62). Стоимость 1 л МПБ 9 тыс. крб. В силу этого среды, приготовленные на основе МПБ, как правило дефицитны даже для лабораторных исследований. Практически не реально применять эти среды для получения микробной биомассы в крупнотоннажном процессе. Помимо МПБ в медицинской микробиологии используют питательные среды, основой которых является триптический перевар или насой бычьих сердец (Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П., 1984). Обогащенные добавками (лошадиной сывороткой и дрожжевым экстрактом) эти среды используют для выделения микоплазм, уреоплазм, Л-форм бактерий – микроорганизмов, вызывающих заболевания человека и животных, и не растущих на каких-либо других питательных средах. Стоимость одного литра этой среды более 24 тыс. крб., что указывает о ее дороговизне.

Описаны способы приготовления питательной среды из свежей плаценты (Отраслевое рационализаторское предложение № 423 от 11 мая 1986 г. "Питательная среда для выделения и культивирования урогенитальных уреоплазм"). Несмотря на высокую чувствительность питательной среды, вряд ли она может найти широкое внедрение, т.к. плацента – ценное сырье для косметической промышленности.

Известны способы получения питательных сред, близких по качеству к МПБ, но

получаемых из дешевых субстратов. Так, для производства биомассы сапрофитного микроорганизма *Bac. subtilis* получают питательную среду на основе сусла, а также среду, содержащую минеральную основу и органические источники питания, из гидролизата вермикулитовой подстилки, применяемой на птицефабриках (Авт. св. № 1124029). Однако в настоящее время птицефабрики отказались от применения вермикулитовых подстилок, применяя более прогрессивный способ содержания птиц в клетках, исключающий использование каких-либо подстилок, а среда на основе сусла бедна на питательные элементы для многих групп микроорганизмов.

Наиболее близким по технической сущности является питательная среда на основе помета птиц, которая подвергается анаэробной бактериальной ферментации с доведением количества аммиака в ней как источника азота до 0,4–2,2%. Приготовленная таким образом питательная среда использовалась для культивирования дрожжей (Дик Питер Хенри, Патент Австралии № 475824, кл. С 07 67/00, А 23 1/18, А 23 К 1/00, 1976). В известном решении среда избрана авторами в качестве прототипа как наиболее близкая по сущности к заявляемому объекту. Недостатком этой питательной среды является то, что в среде на основе помета птиц в достаточном количестве присутствуют только жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная, валериановая) и в недостаточном количестве для выделения и культивирования многих групп микроорганизмов присутствуют белки, аминокислоты, витамины. Это существенно снижает возможности использования данной среды для выделения и культивирования разных групп микроорганизмов.

Задача, которую решает изобретение, состоит в создании оптимально сбалансированной питательной среды для выделения и выращивания микроорганизмов различного таксономического положения и получения в промышленных масштабах биомассы микробных культур, при значительном снижении ее себестоимости.

Поставленная цель достигается тем, что в качестве исходного питательного сырья используют помет домашней птицы после следующей обработки: помет соединяют с водой при содержании 50–100 г его в 1 л воды. Полученную массу подвергают аэробному брожению при 28–40° в течение 48 часов, а затем подвергают анаэробному сбраживанию при 60°C в метантенке. Время анаэробного сбраживания 3–5 суток. Твердую часть среды отделяют центрифугирова-

нием, жидкую фракцию разливали в стеклянную посуду и стерилизуют 30 мин при 0,5 атм. Разлитая и простерилизованная жидкая фракция являлась питательной средой для выделения и культивирования микроорганизмов различных таксономических групп, в том числе микоплазм, уреплазм, Л-форм бактерий. С целью получения твердой питательной среды к жидкой фракции добавляли агар, причем концентрации этого желирующего реагента могут быть ниже применяемых для изготовления МПА. Например, если для создания твердой среды на основе МПБ необходимо добавить 2 г/л агар-агара, то аналогичное по плотности желирование на основе предлагаемой питательной основы осуществляется при добавлении на 1 л 1,3–1,5 г/л агара. Химический состав предложенной универсальной питательной среды приведен в табл.1. Для сравнения приводим состав компонентов среды на основе среды, полученной при анаэробном сбраживании помета (среда по прототипу), и предлагаемой универсальной питательной среды.

Анализ данных табл.1 свидетельствует о том, что разработанная универсальная питательная среда является обогащенной, ценными питательными элементами (витаминами, аминокислотами, и другими) для микроорганизмов.

Пример 1. Для получения среды с концентрацией компонентов, лимитирующих рост микробных культур в колбу с 1 л водопроводной воды, вносили 50 г исходного помета с влажностью 70%. Содержимое колбы тщательно перемешивали и подвергали анаэробному сбраживанию при 30°C в течение 48 часов на качалках (160 об./мин). Затем содержимое колбы продували 5 минут инертным газом (аргоном) и в колбу вносили термофильную анаэробную метаногенную ассоциацию (100 мл инкумма на 1 л среды), после чего проводили анаэробное сбраживание помета при 60°C в термостате. Время анаэробного сбраживания составляло 3 суток. Затем твердую часть отделяли центрифугированием, жидкую фракцию разливали в посуду и стерилизовали 30 минут при 0,5 атм. На полученной таким образом питательной среде культивировали различные виды микроорганизмов. Накопление их биомассы на этой среде представлено в табл.2.

Пример 2. Для получения среды с концентрацией компонентов среды, обеспечивающих оптимальный рост микробных культур, в колбу с 1 л водопроводной воды вносили 75 г исходного помета с влажностью 70%. Последующие операции по получению питательной среды проводили

аналогично, как приведено в примере 1. Накопление биомассы различных микробных культур на приготовленной среде представлены в табл.2.

Пример 3. Для получения среды с максимально допустимой концентрацией компонентов среды в колбу с 1 л водопроводной воды вносили 100 г исходного помета с влажностью 70%. Последующие операции по получению питательной среды проводили аналогично, как приведено в примере 1. Накопление биомассы различных микробных культур на приготовленной среде представлены в табл.2.

Пример 4. Для получения среды с ингибирующими концентрациями компонентов среды в колбу с 1 л водопроводной воды вносили 100 г исходного помета с влажностью 70%. Последующие операции по получению питательной среды проводили аналогично, как приведено в примере 1. Накопление биомассы различных микробных культур на приготовленной среде представлены в табл.2.

Следовательно, как видно из табл.2, можно заключить, что минимально допустимая концентрация помета для приготовления среды 50 г/л воды. Значения менее 50 г/л воды будут лимитирующими. Оптимальная концентрация помета для приготовления питательной среды 75 г/л воды. Максимально допустимая 100 г/л воды.

Как ранее было показано, разработанная основа питательной среды является обогащенной ценными питательными элементами для микроорганизмов (табл.1).

В подтверждение вышесказанного приводим данные по накоплению биомассы различных микроорганизмов на основе из помета по предлагаемому прототипу и заявляемой питательной среде (табл.3, 4).

Практически все изученные культуры в течение 48 часов роста накапливали до одного и более грамма клеточной биомассы. Нарращивание биомассы проводили в 0,5 л колбах на качалках 160 об./мин при температуре 28–30°C, а также в условиях непрерывного культивирования в ферментерах типа АНКУМ-2 и АК-10.

Как видно из данных, представленных в табл.2 и 3, на разработанной питательной среде отмечен наиболее активный рост как условно-патогенных микроорганизмов, так и сапрофитных, получаемых в промышленном масштабе. Достигнутый эффект объясняется наличием в предлагаемой питательной среде значительного количества витаминов, микроэлементов, аминокислот и других ростовых факторов. Все выросшие на предлагаемой среде культуры

микроорганизмов были морфологически идентичны исходным культурам и не имели каких-либо различий при идентификации по биохимическим свойствам.

На полученной среде можно выделять также микроорганизмы, не имеющие стабильной клеточной стенки микоплазмы, уреаплазмы, что позволит применять ее для диагностики воспалительных заболеваний, микробного происхождения у человека и животных. При выделении микоплазм для подавления сопутствующей микрофлоры использовали ацетат калия, пенициллин, а в качестве индикатора фенолрот.

Таким образом, полученную нами из отходов птицефабрик (помет домашней птицы)

5 жидкую фракцию, которая после комбинированной обработки путем аэробного и анаэробного сбраживания, можно использовать как органо-минеральную питательную среду для выращивания микроорганизмов различных таксономических групп.

10 Использование этого сырья для получения питательной среды с целью организации крупнотоннажного наращивания практически ценных микробных культур позволит организовать безотходное производство птиц и животных, значительно улучшить экологическую обстановку на животноводческих комплексах и осуществить экономию ценного и дорогостоящего пищевого сырья – мяса крупного рогатого скота.

Таблица 1

Основные показатели опробованных сред для выращивания микроорганизмов

Определяемые показатели состава сред	Концентрации компонентов питательных сред			
	Среда на помете после анаэробного сбраживания (по прототипу)	Предлагаемая универсальная питательная среда		
		Максимальное значение	Минимальное значение	Оптимальное значение
Белок, г/л	1,3-0,5	1,9	1,0	1,45
Углеводы, г/л	0,15-0,3	0,3	0,17	0,24
Углерод, г/л	1,0-0,4	1,8	1,0	1,4
Общий азот, г/л	0,78-0,3	0,99	0,5	0,75
N ₄ , г/л	0,53-0,2	0,58	0,3	0,44
Минеральные компоненты: P ₂ O ₅ , г/л	0,1-0,05	0,2	0,1	0,15
Кальций, г/л	0,8-0,32	0,65	0,4	0,53
Калий, г/л	0,4-0,2	0,35	0,2	0,28
Натрий, г/л	0,12-0,6	0,1	0,07	0,09
Витамины:				
B ₁ , мг/л	0,05-0,02	0,2	0,1	0,15
B ₅ мкг/л	0,5-0,3	19,2	9,2	14,2
B ₁₂ , мкг/л	1,0-0,42	36,0	18,4	27,2
Суммарное количество жирных кислот, М/л (уксусная, пропионовая, масляная, изовалериановая, валериановая, капроновая кислоты)	0,03-0,01	0,08	0,05	0,07

Продолжение табл. 1

Определяемые показатели состава сред	Концентрации компонентов питательных сред			
	Среда на помете ана- эробного сбражива- ния (по про- тотипу)	Предлагаемая универсальная пита- тельная среда		
		Максималь- ное значе- ние	Минималь- ное значе- ние	Оптималь- ное значе- ние
Лизин	97-42	426	226	326,0
Гистидин	Следы	33	16	24,5
Аргинин	Следы	27	17	22,0
Аспарагин	63-31	9,4	3 5	6,45
Тирозин	Следы			
Фенилаланин	Следы	24	12	18,0
Серин	Следы			
Глутамин	23-12	109	58	83,5
Треонин	Следы	26,3	18,1	22,2
Пролин	Следы	25	13,3	19,2
Глицин	Следы			
Аланин	Следы	434	264	349,0
Цистеин	Следы	364	188	276,0
Валин	Следы	221	120	170,5
Метионин	Следы	82	60	71 0
Лейцин	Следы	60	30	45,0
Изолейцин	Следы	112	52	82,0

Таблица 2

Накопление биомассы микробных культур на предлагаемой среде при различных значениях компонентов, входящих в среду

Показатели состава среды	Минимальная концентрация компонентов среды	Накопление биомассы (г/л) минимальной концентрации компонентов среды		Оптимальная концентрация компонентов среды	Накопление биомассы (г/л) при оптимальной концентрации компонентов среды		Максимально допустимая концентрация компонентов	Накопление биомассы (г/л) при максимально допустимой концентрации компонентов среды		Ингибирующая концентрация компонентов среды	Накопление биомассы (г/л) при ингибирующей концентрации среды	
Белок, г/л	1,0	2,6	2,9	1,45	3,9	4,1	1,9	3,4	3,6	2,4	2,1	2,3
Углеводы, г/л	0,17			0,24			0,3			0,1		
Углерод, г/л	1,0			1,4			1,8			2,5		
Общий азот, г/л	0,5			0,75			0,99			1,6		
H ₄ , г/л	0,3			0,44			0,58			1,4		
Минеральные компоненты:												
P ₂ O ₅ , г/л	0,1			0,15			0,2			0,6		
Кальций, г/л	0,4			0,53			0,65			0,9		
Калий, г/л	0,2			0,28			0,53			0,7		
Натрий, г/л	0,07			0,09			0,1			0,5		
Витамины:												
B ₁ мг/л	0,1			0,15			0,2			0,4		
B ₆ мкг/л	9,2			14,2			19,2			24,2		
B ₁₂ мкг/л	18,4			27,2			36			41,3		
Суммарное количество жирных кислот, М/л	0,05			0,07			0,08			0,1		

11

17391

12

Показатели состава среды	Мини- маль- ная концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) минимальной концентрации компонентов сре- ды		Опти- маль- ная концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) при оптимальной кон- центрации компо- нентов среды		Макси- мально допусти- мая кон- центра- ция компо- нентов	Накопление био- массы (г/л) при максимально допустимой кон- центрации компо- нентов среды		Ингиби- рующая концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) при ингибирующей концентрации среды	
Аминокислоты, мкМ/л.												
Лизин	2,6			326			426			456		
Гистидин	16			24,5			33			44		
Аргинин	17			22,0			27			35		
Аспарагин	3,5			6,45			9,4			15,2		
Фенилаланин	12			18,0			24			29		
Серин												
Глутамин	58			83,5			109			110		
Треонин	18,1			22,2			26,3			29,5		
Пролин	13,3			19,2			25			28,2		
Аланин	264			349,0			434			443		
Цистеин	188			276			364			378		
Валин	120			170,5			221			235		
Метионин	60			71			82			94		
Лейцин	30			45			60			78		
Изолейцин	52			82			112			141		

Таблица 3

Активность роста условно-патогенных микроорганизмов на среде,
приготовленной на основе жидкой питательной фракции, полученной
из помета и стандартного мясопептонного бульона (МПБ)

Питательная среда	Накопление биомассы, г/л						
	Rotens spp.	E. coli	Klebsiella sp.	Enterobacter sp.	Pseudomonas spp.	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Мясо-пептонный бульон	1,12-1,32	2,65	0,95	0,86	1,43-1,65	1,08	0,45
Жидкая питательная фракция, полученная из помета после анаэробной ферментации	1,64-1,85	3,18	0,74	1,52	1,97-2,04	1,41	0,64
Предлагаемая универсальная питательная среда	2,13-2,68	3,71	1,95	2,50	2,42-3,63	2,8	2,0

Таблица 4

Активность роста сапрофитных микроорганизмов различных
таксономических групп на средах, приготовленных на основе
помета и МПБ

Питательная среда	Накопление биомассы микроорганизмов, г/л					
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus Lickeniformis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Blastobacter- viscosus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>
Среда, полученная на основе по- мета, подвергнутого анаэробной ферментации	1,8	1,2	1,2	0,3	0,2	1,3
МПБ	1,5	1,1	0,6	0,2	0,3	0,5
Вода (контроль)	0	0	0	0	0	0
Предлагаемая универсальная питательная среда	3,9	2,8	3,3	2,1	1,8	2,7

Упорядник	Техред М.Моргентал	Коректор М. Самборська
-----------	--------------------	------------------------

Замовлення 4231

Тираж
Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Підписне

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород вул.Гагаріна, 101



УКРАЇНА

(19) UA (11) 17391 (13) A
(51) C 12 N 1/00ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДБез проведення експертизи по суті
на підставі Постанови Верховної Ради України
№ 3769-XII від 23 XII 1993 рПублікується
в редакції заявника(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ ОСНОВИ ДЛЯ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ ВИРОЩУ-
ВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ

1

(21) 93007563

(22) 09.12.93

(24) 15.04.97

(46) 31.10.97. Бюл. № 5

(47) 15.04.97

(56) 1. Мейнел Дж., Мейнел Э. Эксперимен-
тальная микробиология, 1967.2. Пяткин К.Д. и соавт. Руководство к
практическим занятиям по медицинской
микробиологии. М., "Медицина", 1969.3. Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П. -
Микробиологический журнал, 1984, № 12.4. Авторское свидетельство СССР
№ 1124029.5. Патент Австралии № 475824,
кл. C07 67/00, A23 1/18; A23 K1/00, опублик.
1976.(72) Малащенко Юрий Романович, Руденко
Адель Викторовна, Карпенко Валерий
Иванович

2

(73) Малащенко Юрий Романович (UA), Ру-
денко Адель Викторовна (UA), Карпенко Ва-
лерий Иванович (UA)(57) Способ приготовления основы для пита-
тельных сред для выращивания микроорга-
низмов, включающий анаэробную
ферментацию куриного помета, разбавлен-
ного водой, о т л и ч а ю щ и й с я тем, что
используют куриный помет, разбавленный
водой в соотношении 50-100 г на 1 л воды,
перед анаэробной ферментацией осущест-
вляют аэробную ферментацию при 28-40°C
в течение 48 часов, а анаэробную фермента-
цию осуществляют при 60°C в течение 3-5
суток с последующим центрифугированием,
отделением надосадочной фракции и ее сте-
рилизацией.

Изобретение относится к общей и меди-
цинской микробиологии, а именно получе-
нию питательной среды для выращивания
микроорганизмов. Оно может быть исполь-
зовано в научно-исследовательской и прак-
тической работе как для выделения и
культивирования микроорганизмов, так и
для накопления их биомассы в крупнотон-
нажных промышленных масштабах.

Выделение микроорганизмов из объек-
тов среды, получение их биомассы осущест-
вляют на питательных средах. В
зависимости от происхождения среды под-

разделяют на сложные непостоянного со-
става мясо-пелтоновый бульон (МПБ), карто-
фельная среда и др. и синтетические среды
постоянного состава, питательные компо-
ненты которых вводятся в определенную
среду строго по прописи (Мейнел Дж., Мей-
нел Э., 1967).

Сложные среды непостоянного состава
более полно, по сравнению с искусственны-
ми, удовлетворяют трофическим потребно-
стям растущих микроорганизмов, так как
они содержат практически все необходимые
для клеток вещества (белки, аминокислоты,

(19) UA (11) 17391 (13) A

нуклеиновые кислоты, минеральные компоненты и т.п.), находящиеся в легкодоступной форме. Именно на таких средах растут условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, обуславливающие инфекционно-воспалительные процессы различной локализации у человека и животных. К таким средам прежде всего относится мясо-пептонный бульон, который готовится прибавлением к мясной воде 1% пептона и 0,5% хлористого натрия с последующим кипячением 20 минут при помешивании. pH среды устанавливают добавлением щелочи (10% раствор едкого натра) до 7,6–7,8. Для стабилизации pH, рекомендуют добавлять к бульону фосфатные буферные смеси с последующим кипячением среды 35–45 минут до выделения осадка. Затем среду фильтруют, добавляют водой до первоначального объема и стерилизуют в автоклаве при 120°C (1 атм) в течение 15–20 минут. На основе МПБ готовится ряд сред специального назначения. Мясная вода готовится из дорогостоящего дефицитного пищевого сырья – обезжиренной высокосортной телятины или говядины (Пяткин К.Д. и соавт. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, М., "Медицина", 1969, с.62). Стоимость 1 л МПБ 9 тыс. крб. В силу этого среды, приготовленные на основе МПБ, как правило дефицитны даже для лабораторных исследований. Практически не реально применять эти среды для получения микробной биомассы в крупнотоннажном процессе. Помимо МПБ в медицинской микробиологии используют питательные среды, основой которых является триптический перевар или насой бычьих сердец (Скрипаль И.Г., Малиновская Л.П., 1984). Обогащенные добавками (лошадиной сывороткой и дрожжевым экстрактом) эти среды используют для выделения микоплазм, уреаплазм, Л-форм бактерий – микроорганизмов, вызывающих заболевания человека и животных, и не растущих на каких-либо других питательных средах. Стоимость одного литра этой среды более 24 тыс. крб., что указывает о ее дороговизне.

Описаны способы приготовления питательной среды из свежей плаценты (Отраслевое рационализаторское предложение № 423 от 11 мая 1986 г. "Питательная среда для выделения и культивирования урогенитальных уреаплазм"). Несмотря на высокую чувствительность питательной среды, вряд ли она может найти широкое внедрение, т.к. плацента – ценное сырье для косметической промышленности.

Известны способы получения питательных сред, близких по качеству к МПБ, но

получаемых из дешевых субстратов. Так, для производства биомассы сапрофитного микроорганизма *Bac. subtilis* получают питательную среду на основе сусла, а также среду, содержащую минеральную основу и органические источники питания, из гидролизата вермикулитовой подстилки, применяемой на птицефабриках (Авт. св. № 1124029). Однако в настоящее время птицефабрики отказались от применения вермикулитовых подстилок, применяя более прогрессивный способ содержания птиц в клетках, исключающий использование каких-либо подстилок, а среда на основе сусла бедна на питательные элементы для многих групп микроорганизмов.

Наиболее близким по технической сущности является питательная среда на основе помета птиц, которая подвергается анаэробной бактериальной ферментации с доведением количества аммиака в ней как источника азота до 0,4–2,2%. Приготовленная таким образом питательная среда использовалась для культивирования дрожжей (Дик Питер Хенри, Патент Австралии № 475824, кл. С 07 67/00, А 23 1/18, А 23 К 1/00, 1976). В известном решении среда избрана авторами в качестве прототипа как наиболее близкая по сущности к заявляемому объекту. Недостатком этой питательной среды является то, что в среде на основе помета птиц в достаточном количестве присутствуют только жирные кислоты (уксусная, пропионовая, масляная, валериановая) и в недостаточном количестве для выделения и культивирования многих групп микроорганизмов присутствуют белки, аминокислоты, витамины. Это существенно снижает возможности использования данной среды для выделения и культивирования разных групп микроорганизмов.

Задача, которую решает изобретение, состоит в создании оптимально сбалансированной питательной среды для выделения и выращивания микроорганизмов различного таксономического положения и получения в промышленных масштабах биомассы микробных культур, при значительном снижении ее себестоимости.

Поставленная цель достигается тем, что в качестве исходного питательного сырья используют помет домашней птицы после следующей обработки: помет соединяют с водой при содержании 50–100 г его в 1 л воды. Полученную массу подвергают аэробному брожению при 28–40° в течение 48 часов, а затем подвергают анаэробному сбраживанию при 60°C в метантенке. Время анаэробного сбраживания 3–5 суток. Твердую часть среды отделяют центрифугирова-

нием, жидкую фракцию разливали в стеклянную посуду и стерилизуют 30 мин при 0,5 атм. Разлитая и простерилизованная жидкая фракция являлась питательной средой для выделения и культивирования микроорганизмов различных таксономических групп, в том числе микоплазм, уреаплазм, Л-форм бактерий. С целью получения твердой питательной среды к жидкой фракции добавляли агар, причем концентрации этого желирующего реагента могут быть ниже применяемых для изготовления МПА. Например, если для создания твердой среды на основе МПБ необходимо добавить 2 г/л агар-агара, то аналогичное по плотности желирование на основе предлагаемой питательной основы осуществляется при добавлении на 1 л 1,3–1,5 г/л агара. Химический состав предложенной универсальной питательной среды приведен в табл.1. Для сравнения приводим состав компонентов среды на основе среды, полученной при анаэробном сбраживании помета (среда по прототипу), и предлагаемой универсальной питательной среды.

Анализ данных табл.1 свидетельствует о том, что разработанная универсальная питательная среда является обогащенной, ценными питательными элементами (витаминами, аминокислотами, и другими) для микроорганизмов.

Пример 1. Для получения среды с концентрацией компонентов, лимитирующих рост микробных культур в колбу с 1 л водопроводной воды, вносили 50 г исходного помета с влажностью 70%. Содержимое колбы тщательно перемешивали и подвергали анаэробному сбраживанию при 30°C в течение 48 часов на качалках (160 об./мин). Затем содержимое колбы продували 5 минут инертным газом (аргоном) и в колбу вносили термофильную анаэробную метаногенную ассоциацию (100 мл инокумма на 1 л среды), после чего проводили анаэробное сбраживание помета при 60°C в термостате. Время анаэробного сбраживания составляло 3 суток. Затем твердую часть отделяли центрифугированием, жидкую фракцию разливали в посуду и стерилизовали 30 минут при 0,5 атм. На полученной таким образом питательной среде культивировали различные виды микроорганизмов. Накопление их биомассы на этой среде представлено в табл.2.

Пример 2. Для получения среды с концентрацией компонентов среды, обеспечивающих оптимальный рост микробных культур, в колбу с 1 л водопроводной воды вносили 75 г исходного помета с влажностью 70%. Последующие операции по получению питательной среды проводили

аналогично, как приведено в примере 1. Накопление биомассы различных микробных культур на приготовленной среде представлено в табл.2.

Пример 3. Для получения среды с максимально допустимой концентрацией компонентов среды в колбу с 1 л водопроводной воды вносили 100 г исходного помета с влажностью 70%. Последующие операции по получению питательной среды проводили аналогично, как приведено в примере 1. Накопление биомассы различных микробных культур на приготовленной среде представлено в табл.2.

Пример 4. Для получения среды с ингибирующими концентрациями компонентов среды в колбу с 1 л водопроводной воды вносили 100 г исходного помета с влажностью 70%. Последующие операции по получению питательной среды проводили аналогично, как приведено в примере 1. Накопление биомассы различных микробных культур на приготовленной среде представлено в табл.2.

Следовательно, как видно из табл.2, можно заключить, что минимально допустимая концентрация помета для приготовления среды 50 г/л воды. Значения менее 50 г/л воды будут лимитирующими. Оптимальная концентрация помета для приготовления питательной среды 75 г/л воды. Максимально допустима 100 г/л воды.

Как ранее было показано, разработанная основа питательной среды является обогащенной ценными питательными элементами для микроорганизмов (табл.1).

В подтверждение вышесказанного приводим данные по накоплению биомассы различных микроорганизмов на основе из помета по предлагаемому прототипу и заявляемой питательной среде (табл.3, 4).

Практически все изученные культуры в течение 48 часов роста накапливали до одного и более грамма клеточной биомассы. Нарращивание биомассы проводили в 0,5 л колбах на качалках 160 об./мин при температуре 28–30°C, а также в условиях непрерывного культивирования в ферментерах типа АНКУМ-2 и АК-10.

Как видно из данных, представленных в табл.2 и 3, на разработанной питательной среде отмечен наиболее активный рост как условно-патогенных микроорганизмов, так и сапрофитных, получаемых в промышленном масштабе. Достигнутый эффект объясняется наличием в предлагаемой питательной среде значительного количества витаминов, микроэлементов, аминокислот и других ростовых факторов. Все выросшие на предлагаемой среде культуры

микроорганизмов были морфологически идентичны исходным культурам и не имели каких-либо различий при идентификации по биохимическим свойствам.

На полученной среде можно выделять также микроорганизмы, не имеющие стабильной клеточной стенки микоплазмы, уреоплазмы, что позволит применять ее для диагностики воспалительных заболеваний, микробного происхождения у человека и животных. При выделении микоплазм для подавления сопутствующей микрофлоры использовали ацетат калия, пенициллин, а в качестве индикатора фенолрот.

Таким образом, полученную нами из отходов птицефабрик (помет домашней птицы)

жидкую фракцию, которая после комбинированной обработки путем аэробного и анаэробного сбраживания, можно использовать как органо-минеральную питательную среду для выращивания микроорганизмов различных таксономических групп.

Использование этого сырья для получения питательной среды с целью организации крупнотоннажного наращивания практически ценных микробных культур позволит организовать безотходное производство птиц и животных, значительно улучшить экологическую обстановку на животноводческих комплексах и осуществить экономию ценного и дорогостоящего пищевого сырья — мяса крупного рогатого скота.

Таблица 1

Основные показатели опробованных сред для выращивания микроорганизмов

Определяемые показатели состава сред	Концентрации компонентов питательных сред			
	Среды на помете после анаэробного сбраживания (по прототипу)	Предлагаемая универсальная питательная среда		
		Максимальное значение	Минимальное значение	Оптимальное значение
Белок, г/л	1,3-0,5	1,9	1,0	1,45
Углеводы, г/л	0,15-0,3	0,3	0,17	0,24
Углерод, г/л	1,0-0,4	1,8	1,0	1,4
Общий азот, г/л	0,78-0,3	0,99	0,5	0,75
H ₄ , г/л	0,53-0,2	0,58	0,3	0,44
Минеральные компоненты: P ₂ O ₅ , г/л	0,1-0,05	0,2	0,1	0,15
Кальций, г/л	0,8-0,32	0,65	0,4	0,53
Калий, г/л	0,4-0,2	0,35	0,2	0,28
Натрий, г/л	0,12-0,6	0,1	0,07	0,09
Витамины:				
B ₁ , мг/л	0,05-0,02	0,2	0,1	0,15
B ₅ , мкг/л	0,5-0,3	19,2	9,2	14,2
B ₁₂ , мкг/л	1,0-0,42	36,0	18,4	27,2
Суммарное количество жирных кислот, М/л (уксусная, пропионовая, масляная, изовалериановая, валериановая, капроновая кислоты)	0,03-0,01	0,08	0,05	0,07

Продолжение табл. 1

Определяемые показатели состава сред	Концентрации компонентов питательных сред			
	Среда на помете ана- эробного сбражива- ния (по про- тотипу)	Предлагаемая универсальная пита- тельная среда		
		Максималь- ное значе- ние	Минималь- ное значе- ние	Оптималь- ное значе- ние
Лизин	97-42	426	226	326,0
Гистидин	Следы	33	16	24,5
Аргинин	Следы	27	17	22,0
Аспарагин	63-31	9,4	3,5	6,45
Тирозин	Следы			
Фенилаланин	Следы	24	12	18,0
Серин	Следы			
Глутамин	23-12	109	58	83,5
Треонин	Следы	26,3	18,1	22,2
Пролин	Следы	25	13,3	19,2
Глицин	Следы			
Аланин	Следы	434	264	349,0
Цистеин	Следы	364	188	276,0
Валин	Следы	221	120	170,5
Метионин	Следы	82	60	71,0
Лейцин	Следы	60	30	45,0
Изолейцин	Следы	112	52	82,0

Таблица 2

Накопление биомассы микробных культур на предлагаемой среде при различных значениях компонентов, входящих в среду

Показатели состава среды	Мини- маль- ная концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) минимальной концентрации компонентов сре- ды		Опти- маль- ная концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) при оптимальной кон- центрации компо- нентов среды		Макси- мально допусти- мая кон- центра- ция компо- нентов	Накопление био- массы (г/л) при максимально до- пустимой кон- центрации компонентов сре- ды		Ингиби- рующая концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) при ингибирующей концентрации среды	
Белок, г/л	1,0			1,45			1,9			2,4		
Углеводы, г/л	0,17			0,24			0,3			0,1		
Углерод, г/л	1,0	2,6	2,9	1,4	3,9	4,1	1,8	3,4	3,6	2,5	2,1	2,3
Общий азот, г/л	0,5			0,75			0,99			1,6		
H ₄ г/л	0,3			0,44			0,58			1,4		
Минеральные компоненты:												
P ₂ O ₅ , г/л	0,1			0,15			0,2			0,6		
Кальций, г/л	0,4			0,53			0,65			0,9		
Калий, г/л	0,2			0,28			0,53			0,7		
Натрий, г/л	0,07			0,09			0,1			0,5		
Витамины:												
B ₁ мг/л	0,1			0,15			0,2			0,4		
B ₅ мкг/л	9,2			14,2			19,2			24,2		
B ₁₂ мкг/л	18,4			27,2			36			41,3		
Суммарное количество жирных кислот, М/л	0,05			0,07			0,08			0,1		

11

17391

12

Продолжение табл 2

Показатели состава среды	Мини- маль- ная концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) минимальной концентрации компонентов сре- ды		Опти- маль- ная концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) при оптимальной кон- центрации компо- нентов среды		Макси- мально допусти- мая кон- центра- ция компо- нентов	Накопление био- массы (г/л) при максимально допустимой кон- центрации компо- нентов среды		Ингиби- рующая концен- трация компо- нентов среды	Накопление био- массы (г/л) при ингибирующей концентрации среды	
Аминокислоты мкМ/л												
Лизин	2,6			326			426			456		
Гистидин	16			24,5			33			44		
Аргинин	17			22,0			27			35		
Аспарагин	3,5			6,45			9,4			15,2		
Фенилаланин	12			18,0			24			29		
Серин												
Глутамин	58			83,5			109			110		
Треонин	18,1			22,2			26,3			29 5		
Пролин	13,3			19,2			25			28,2		
Аланин	264			349,0			434			443		
Цистеин	188			276			364			378		
Валин	120			170,5			221			235		
Метионин	60			71			82			94		
Леицин	30			45			60			78		
Изолейцин	52			82			112			141		

13

17391

14

Таблица 3

Активность роста условно-патогенных микроорганизмов на среде,
приготовленной на основе жидкой питательной фракции, полученной
из помета и стандартного мясопептонного бульона (МПБ)

Питательная среда	Накопление биомассы, г/л						
	Roteus spp.	E. coli	Klebsiella sp.	Enterobacter sp.	Pseudomonas spp.	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Мясо-пептонный бульон	1,12-1,32	2,65	0,95	0,86	1,43-1,65	1,08	0,45
Жидкая питательная фракция, полученная из помета после анаэробной ферментации	1,64-1,85	3,18	0,74	1,52	1,97-2,04	1,41	0,64
Предлагаемая универсальная питательная среда	2,13-2,68	3,71	1,95	2,50	2,42-3,63	2,8	2,0

Таблица 4

Активность роста сапрофитных микроорганизмов различных
таксономических групп на средах, приготовленных на основе
помета и МПБ

Питательная среда	Накопление биомассы микроорганизмов, г/л					
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus Licheniformis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Blastobacter- viscosus</i>	<i>Streptococcus lactis</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i>
Среда, полученная на основе по- мета, подвергнутого анаэробной ферментации	1,8	1,2	1,2	0,3	0,2	1,3
МПБ	1,5	1,1	0,6	0,2	0,3	0,5
Вода (контроль)	0	0	0	0	0	0
Предлагаемая универсальная питательная среда	3,9	2,8	3,3	2,1	1,8	2,7

17

17391

18

Упорядник

Техред М.Моргентал

Коректор М. Самборська

Замовлення 4231

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Відкрите акціонерне товариство "Патент", м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101