УДК 619:579.22

ІНДИКАТОРНЕ СЕРЕДОВИЩЕ «ВС» ЯК ЗАСІБ КОНТРОЛЮ ПРИ ВИЗНАЧЕННІ ПРИСУТНОСТІ БАКТЕРІАЛЬНОЇ МІКРОФЛОРИ В ІНАКТИВОВАНИХ НЕПРОЗОРИХ БІОПРЕПАРАТАХ

В. О. Ушкалов, В. С. Тиндик, В. В. Андрущенко, О. В. Мачуський

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

У результаті проведених досліджень була розроблена технологія виготовлення індикаторного середовища «ВС» та перевірена ефективність його використання, порівняно з використанням традиційних середовищ, для визначення присутності живої мікрофлори у непрозорих посівних зразках. Дослідження проведені з використанням семи видів мікроорганізмів: Er. insidiosa, P. multocida, St. epidermidis, Tr. verrucosum, S. typhi murium, E. coli, Cl. chauvoei, B. anthracis. Ріст культур, отриманий на середовищі «ВС», свідчить про універсальність ростових властивостей у цьому середовищі для мікроорганізмів, що мають місце при виготовленні та контролі біопрепаратів.

Ключові слова: РЕВЕРСНИЙ ІНДИКАТОР, МІКРОФЛОРА, РН-МЕТР, СЕРЕДОВИЩЕ, БІОХІМІЧНІ РЕАКЦІЇ

Сьогодні в Україні для імунопрофілактики та діагностики інфекційних захворювань сільськогосподарських тварин та птиці використовуються біопрепарати як вітчизняних, так і закордонних фірм. Виробництво та придбання за кордоном такої продукції потребує застосування швидких та високоефективних засобів і середовищ бактеріологічного контролю.

Головною метою розробки технології виготовлення та застосування середовища «ВС» є те, що ряд біопрепаратів (Голландія — вакцина проти бешихи інактивована, Росія — вакцина проти лептоспірозу, Україна — вакцина проти бешихи свиней та емкару), а також багато інших біопрепаратів, які мають молочно-білий або мутний стан. Традиційно існуючий контроль, як бактеріологічний, так фізико-хімічний, потребує використання не менше 5 середовищ (МПА, МПБ, ТГС, Сабуро рідке, Сабуро тверде, а також визначення водневого показника (рН) на рН-метрі. Головною проблемою при цьому є те, що в біопрепаратах,отриманих для контролю, які мають молочно-білий або каламутний стан, під час контролю їх на середовищах візуально важко відрізнити помутніння від проростання сторонньої мікрофлори в розчині внесеного біопрепарату і контрольного середовища. До цього слід додати, що при мікроскопії, в такому випадку візуально виявляється мікрофлора, яка міститься в біопрепараті (наприклад, вакцина проти емкару). Проте ПЛР-діагностика не розрізняє живу мікрофлору від інактивованої. Робити висновки про повну інактивацію мікрофлори або відсутність сторонньої мікрофлори в інактивованих біопрепаратах за таких умов важко, а бо не можливо. В зв’язку з цим, метою роботи є розробка технології виготовлення сигнального індикаторного середовища з реверсним індикатором для визначення присутності живих мікробних клітин у досліджуваному матеріалі, який має непрозорий стан.

Матеріали і методи

До складу живильних середовищ часто вводять різні індикатори. Зміна кольору середовища вказує на присутність кислоти або лугу при ферментативній активності мікроорганізмів. В якості індикаторів використовують нейтральний-червоний, бромтимоловий-синій, бромкрезоловий-синій, бромкрезоловий-пурпуровий, конго-червоний, суміш розолової кислоти і водно-блакитного, індикатор Андреде [2].

Властивості деяких індикаторів наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Властивості індикаторів

№ п/п	Індикатор	Інтервал	Зміна кольору середовища
1.	Бромтимоловий-синій водорозчинний	6,0–7,6	Жовтого на синій
2.	Бромкрезоловий-пурпуровий водорозчинний	5,2–6,8	Жовтого на пурпуровий
3.	Конго-червоний	3,0–5,2	Синього на фіолетовий
4.	Нейтральний-червоний водорозчинний	6,8–8,0	Червоного на жовтий
5.	Водно-голубий+розалова кислота	6,2–8,0	Жовтого на червоний
6.	Феноловий червоний водорозчинний	6,8–8,4	Жовтого на червоний

Проведений аналіз показав, що існуючі індикаторні середовища, такі як Андреде та тіогліколеве, мають ряд недоліків, а саме: середовище Андреде (індикатор фуксин кислий) можна використовувати в обмеженому діапазоні показників pH. Тіогліколеве середовище, індикатор резазурін, розташований у верхньому рівні стоміліметрового стовпчика середовища, що не дає можливості використовувати його при контролі матеріалів, що мають анаеробні мікроорганізми [3].

Слід також відмітити, що використовуючи індикаторні системи як складову середовищ, потрібно пам'ятати також і про хемотаксис бактерій.

У деяких випадках хімічні речовини гальмують або зовсім припиняють ріст мікроорганізмів: діамантовий зелений — середовище Кіліана, малахітовий зелений у середовищі Левінштейн-Єнсена, Петраньяні та інше.

Таким чином, перед дослідниками при розробці технології виготовлення індикаторного середовища «ВС» постало питання підбору такого індикатора, щоб по-перше, був нетоксичний і не гальмував метаболічні процеси мікроорганізму, а по-друге — був чутливим до змін показника pH у широкому діапазоні від pH 5,0 до 8,0 за спеціальною візуальною шкалою зміни кольору з інтервалом 0,5 одиниці, з відповідною зміною кольору середовища. По-третє, ця речовина повинна добре і рівномірно розчинятись у стовпчику середовища в пробірках. По-четверте, ця речовина повинна бути стійкою при термічній обробці середовища, і по-п'яте, працювати в реверсному режимі.

Результати й обговорення

При культивуванні мікроорганізмів на живильних середовищах проходить багато біохімічних реакцій, пов'язаних з метаболізмом мікробних клітин, котрий, у свою чергу, пов'язаний з ензиматичними процесами внаслідок асиміляції основних органогенів з живильного середовища. Продукти метаболізму мікроорганізмів різноманітні за фізико-хімічними показниками, що є причиною зміни pH-показника живильного середовища в кислу або лужну сторону в процесі культивування.

Контроль біопрепаратів на стерильність, перевірка інактивованих вакцинних препаратів на присутність живих клітин (повноту інактивації), а також перевірка на наявність мікроорганізмів в емульгованих (непрозорих) біопрепаратах спонукало розробити технологію виготовлення індикаторного середовища «ВС».

Важливими етапами дослідницької роботи в цьому напрямку були:

1) Збалансування середовища за основними органогенами (C — вуглець, N — азот);
2) Підбір індикатору для середовища;
3) Перевірка ефективності готового середовища.

На першому етапі підбору індикатору для середовища «ВС» досліди проводились з перевірки чутливості індикатору до змін pH-розчину у широкому діапазоні показників.

Дослідження показало, що індикатор нейтральний червоний чутливий до змін pH на 0,5 одиниці у діапазоні pH від 5,0 до 8,0 і відповідно змінює колір від блідо-жовтого до малинового.

Побудована шкала відповідності забарвлення до показника pH (табл. 2).

Таблиця 2

Шкала відповідності забарвлення до показника pH

№ п/п	Показник pH по pH-метру	Колір
1.	5,0	Блідо-жовтий
2.	5,5	Жовтий

3.	6,0	Жовто-червоний
4.	7,0	Червоний
5.	7,5	Малиново-червоний
6.	8,0	Малиновий

На другому етапі були проведені досліди з встановлення достатньої поживності індикаторного середовища «ВС» для культивування широкого спектру мікроорганізмів. Значна кількість мікроорганізмів використовує вуглеводи, найчастіше цукри, як джерело вуглецю. Основним джерелом азотного живлення мікроорганізмів є амінокислоти — продуктами гідролізу білків тваринного походження.

Проведені дослідження показали, що значну кількість цукрів, мікроелементів, ферментів містить солодове молоко, котре виготовлялось в умовах лабораторії з пророщеного зерна пшениці. Вміст цукру за Белінгом у солодовому молоці становив 18–20 %. Мікроорганізми, особливо патогенні, потребують для росту значну кількість амінокислот. Проведені дослідження показали, що в переварах Хотінгера, які отримують при панкреатичному гідролізаті м'язевої тканини тварин, кількість амінного азоту становить 600–950 мг %.

На третьому етапі при створенні індикаторного середовища «ВС» було відпрацьовано технологію виготовлення індикаторного середовища «ВС» об'ємно-ваговим методом. У лабораторних умовах була виготовлена дослідна серія середовища в об'ємі 1000 см³. Щоб отримати дослідний зразок, змішували перевари Хотінгера з вихідною концентрацією амінного азоту 650–700 мг % амінного азоту солодовим молоком з вихідним вмістом цукру 20 % за Белінгом. За умовою досліду високомолекулярні білки переварів Хотінгера перетворювались у низькомолекулярні білки [4]. Суміш доводили до 1000 см³ дистильованою водою. Вміст амінного азоту в готовому середовищі становив 220 мг % амінного азоту, вміст цукру — 7 %.

Після цього до суміші додавали агар-агар.

Індикатор нейтральний-червоний додавали у кількості, щоб кінцева концентрація його становила 0,01 %. pH-показник середовища доводили до діапазону 7,0–7,2 фосфатним буфером за визначеною шкалою [5]. Стерилізацію середовища проводили шляхом автоклавування при 0,7 ат. 30 хв.

На четвертому етапі було проведено перевірки ефективності використання середовища «ВС». Для досліду було відібрано і одержано з національного центру штамів мікроорганізмів ДНДКІ БШМ наступні мікроорганізми, збудники патогенних інфекцій тварин і птиці: *Er. insidiosa, P. multocida, St. epidermidis, Tr. verrucosum, S. typhimurium, E. coli, Cl. chauvoei, B. anthracis.*

Результати досліджень деяких з них наведенні в статті.

Індикаторне середовище «ВС» розливали в пробірки по 10 см у кожну. На кожний штам брали по 6 пробірок. Посів матеріалу проводили методом уколу пастерівською піпеткою до дна пробірки, по п'ять пробірок на кожний штам, по одній пробірці залишали як контроль.

Паралельно робили висів кожного з перерахованих штамів на традиційні середовища: ГРМ-бульон, Сабуро, МППБ, ТГС, по три пробірки з кожним середовищем. Температура культивування підтримувалась на рівні 37,0±0,5 °С.

На 2–3 добу спостерігали зміну кольору в усіх пробірках, в які був внесений посівний матеріал. А саме, у тих пробірках, де культивувались бактеріальні штами *Er. insidiosa, P. multocida, St. epidermidis, Tr. verrucosum, S. typhi murium, E. coli, Cl. chauvoei, B. anthracis.* Колір індикаторного середовища змінився на границі посівного матеріалу з середовищем з червоного до жовтого, тобто, згідно з вищенаведеною таблицею становив 5,5–6,0 pH-показника. А вже на п'яту добу колір всього стовпчика середовища був червоно-жовтий, а на сьомий день — жовтий. Така зміна кольору середовища «ВС» зумовлена зміною pH, а присутність реверсного індикатора дозволяє відмітити це візуально, внаслідок зміни кольору. На п'яти пробірках, в які був висіяний *Tr. verrucosum*, на другу добу спостерігали зміну кольору середовища у приповерхневій частині з червоного на малиновий. При подальшому культивуванні *Tr. verrucosum* шар малинового забарвлення середовища

збільшувався. Ця зміна забарвлення індикаторного середовища «ВС» обумовлена зміною pH у лужну сторону від контрольного показника pH від 7,0–7,2 до 7,5–8,0.

Про присутність і ріст висіяних культур на традиційні середовища свідчила каламуть, обумовлена мікробними клітинами внесених культур у позитивних зразках, що з'являлась під час культивування.

Досліди з перевірки ефективності використання індикаторного середовища «ВС» на присутність мікрофлори в зразках емульгованих непрозорих середовищах проводили з розчинником «Ділувак» (молочно-біла емульсія). У п'ять пробірок, з індикаторним середовищем «ВС» вносили 0,1 см³ «Ділувак» у розведенні 10^{-2} (посівний зразок був непрозорий). Одну пробірку залишали контрольною. В інші п'ять пробірок вносили суспензію в кількості 0,1 см³ у вигляді суміші 1:1 «Ділувак» у розведенні 10^{-2} з внесеною культурою E. coli при температурі 37,0±0,5 °С. На другу добу спостерігали в п'яти пробірках з посівним матеріалом «Ділувак» непрозору білу смужку. За траєкторією внесення матеріалу колір індикаторного середовища не змінився і мав червоне забарвлення, а значить pH середовища залишилося без змін.

Тобто, за період інкубування ніяких біохімічних реакцій не проходило, що свідчить про те, що в зразку живих мікроорганізмів не було. Тривав дослід 10 діб. За цей час змін кольору середовищ «ВС» не спостерігали.

У п'яти пробірках з посівним матеріалом у вигляді суспензії мікроорганізмів E. coli в «Ділувак» вже на другу добу спостерігали зміну кольору індикаторного середовища в зоні контакту посівного матеріалу з середовищем, ця зона мала жовте забарвлення. Це свідчить про те, що вже на другу добу в зоні контакту посівного матеріалу з індикаторним середовищем показник pH знизився до 6,0–6,5 внаслідок метаболічних процесів живих мікробних клітин. Дослід тривав 10 діб. За цей період спостерігали збільшення зони зміни забарвлення середовища у жовтий колір, а в кінці досліду все середовище мало жовте забарвлення. Ця поступова зміна кольору індикаторного середовища «ВС» свідчить про збільшення кількості живих клітин (біомаси), а саме збільшення продуктів метаболізму, що змінюють pH середовища «ВС» (і взагалі поживних середовищ) у кислу сторону.

Разом з цим при перевірці ефективності використання індикаторного середовища «ВС» проводили посів аналогічних зразків на традиційні середовища. Одразу при внесенні обох зразків на всі живильні середовища спостерігали помутніння, котре обумовлено станом посівного матеріалу «Ділувак». Такий стан посівного матеріалу не дає змоги проводити контроль на традиційних середовищах.

У результаті проведених досліджень була розроблена технологія виготовлення індикаторного середовища «ВС» і перевірена ефективність його використання, в порівнянні з використанням традиційних середовищ для визначення присутності живої мікрофлори у посівних зразках, що мають каламутний або молочно-білий стан.

На 7 штамах мікроорганізмів: *Er. insidiosa, P. multocida, St. epidermidis, Tr. verrucosum, S. typhimurium, E. coli, Cl. chauvoei, B. Anthracis* спостерігали ріст культур, що свідчить про поживні властивості середовища для широкого кола мікроорганізмів, що викликають інфекційні патології тварин та птиці.

Присутність в розробленому індикаторному середовищі реверсного індикатора нейтрального червоного дає змогу визначати присутність мікроорганізмів вже на другу добу візуально, за зміною кольору середовища в зразках, що мають каламутний або молочно-білий стан.

Висновки

При дослідженні зразків посівного матеріалу, що мали каламутний або молочно-білий стан, на індикаторному середовищі «ВС» у присутності живої мікрофлори спостерігається зміна кольору середовища «ВС» у зоні контакту з посівним матеріалом вже на другу добу. На традиційних середовищах визначити присутність живої мікрофлори при згаданому вище стані посівного матеріалу не можливо внаслідок присутності початкового помутніння в розчині посівного матеріалу і традиційних контрольних середовищ. Таким чином, індикаторне середовище «ВС» дає змогу рекомендувати використання його, як експрес-

метод визначення присутності живої мікрофлори як у прозорих зразках, так і у зразках не прозорих.

Перспективи подальших досліджень. Вивчити можливість середовища для контролю присутності та культивування мікоплазм, як у роботі з контролю, так і при отриманні біопрепаратів.

V. A. Ushkalov, V. S. Tyndyk, V. V. Andrushchenko, A. V. Machurskyy

INDICATOR MEDIUM «VS» AS A METHOD OF CONTROL AT REVEALING PRESENCE OF BACTERIAL MICROFLORA IN INACTIVATED BIOPREPARATIONS WHICH HAVE OPAQUE STATE

S u m m a r y

As a result of the conducted research work the technology of making indicatory medium «BC» was worked out and the efficiency of its use as compared to the use of traditional environments for determination of presence of live microflora in opaque sowing standards was tested. Research work was conducted with the use 7 types of microorganisms: Er. insidiosa, P. multocida, St. epidermidis, Tr. verrucosum, S. typhimurium, E. coli, Cl. chauvoei, B. anthracis. The growth of cultures on the environment of «BC» testifies to universality of growth properties in this environment, for microorganisms which take place at producing and control of biopreparations.

В. А. Ушкалов, В. С. Тындык, В. В. Андрущенко, А. В. Мачуський

ИНДИКАТОРНАЯ СРЕДА «ВС» КАК СРЕДСТВО КОНТРОЛЯ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ ПРИСУТСТВИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МИКРОФЛОРЫ В ИНАКТИВИРОВАННЫХ НЕПРОЗРАЧНЫХ БИОПРЕПАРАТАХ

А н н о т а ц и я

В результате проведенных исследований была разработана технология изготовления индикаторной среды «ВС» и проверена эффективность его использования, по сравнению с использованием традиционных сред для определения присутствия живой микрофлоры в непрозрачных посевных образцах.

Исследовательская работа проводилась с использованием 7 видов микроорганизмов: Er. insidiosa, P. multocida, St. epidermidis, Tr. verrucosum, S. typhimurium, E. coli, Cl. chauvoei, B. anthracis.

Рост культур на среде «ВС» свидетельствует об универсальности ростовых свойств в данной среде, для микроорганизмов, которые имеют место при изготовлении и контроле биопрепаратов.

1. *Гончаров А. И.* Справочник по химии / А. И. Гончаров, М. Ю. Корнилов. — М. : Высшая школа, 1977. — 108 с.
2. *Меджидов М. М.* Справочник по микробиологическим питательным средам / М. М. Меджидов. — М. : Медицина, 2003. — 19 с.
3. ДСТУ 4483:2005 Препарати ветеринарні імунобіологічні. Методи визначення бактеріальної і грибної контамінації.
4. *Осидзе Д. Ф.* Методическое руководство по приготовлению и контролю питательных сред / Д. Ф. Осидзе.
5. Методы контроля медицинских имунобиологических препаратов. — 1996. — 124 с.

Рецензент: В. о. завідувача сектору стандартизації та патентно-ліцензійних досліджень Напненко О. О.