

ucts on phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by milk leucocytes. *Am. J. Vet. Res.* Vol. 44 (3). P. 385-388.

6. Nickerson S.C., Paape, M.J., Harmon R.J., Ziv G. (1986). Mammary leukocyte response to drug therapy. *J. Dairy Sci.* Vol. 69 (6). P. 1733-1742.

7. Griesbeck-Zilch B., Meyer H.H., Kuhn C.H., Schwerin M., Wellnitz O. (2008). *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* cause deviating expression profiles of cytokines and lactoferrin messenger ribonucleic acid in mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* Vol. 91 (6). P. 2215-2224.

8. Wellnitz O., Arnold E.T., Bruckmaier R.M. (2011). Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid induce different immune responses in the bovine mammary gland. *J. Dairy Sci.* Vol. 94 (11). P. 5405-5412.

9. Walt D.R. (2013). Optical methods for single molecule detection and analysis. *Analytical Chem.* Vol. 85 (3). P. 1258-1263

10. van Dorland H.A., Richter S., Morel I., et al. (2009). Variation in hepatic regulation of metabolism during the dry period and in early lactation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* Vol. 92 (5). P. 1924-1940.

11. Radkowski, M. (2006). The effect of polyphosphates on streptococci isolated from mastitis cases. *Pol. J. Vet. Sci.* Vol. 9 (2). P. 135-138.

12. Rukovodstvo po eksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv / pod obshch. red. chlenakorespondenta RAMN, professora R.U. Khabrieva. – 2-izd., pererab. i dop. – M.: OAO «Izdatelstvo «Meditsina», 2005. – 832 s.

13. Malanin L.P., Morozov A.P., Selivanova A.S. Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu toksicheskikh svoystv preparatov, primenyaemykh v veterinarii i zhivotnovodstve: veterinarnye preparaty: spravochnik. – M.: Agropromizdat, 1988. – S. 239-289.



УДК 619:616.98.9

Ю.Н. Романцева  
Yu.N. Romantseva

## УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАНТОЛИЗАТА

### IMPROVEMENT OF CULTURE MEDIA BY USING PANTOLIZAT PRODUCT

**Ключевые слова:** питательная среда, пантолизат, шрот, микроорганизмы, информативность, мясопептонный бульон, мясопептонный агар.

Питательные среды без преувеличения считаются одними из главных составляющих в микробиологических исследованиях. Современная микробиология без питательных сред существовать не может, а их качество во многом определяет информативность, точность микробиологического анализа. При подборе питательной среды следует учитывать ее полноценность, то есть обособанный и сбалансированный набор различных питательных соединений, необходимых микроорганизму для построения растущей клетки. Для нормального роста и развития микроорганизмов в питательной среде должны присутствовать все элементы, из которых формируется клетка. Изыскание высокоэффективных питательных сред на дешевой белокосодержащей основе из отходов различных производств является актуальной задачей. В связи с этим необходима разработка экономически обос-

нованных эффективных питательных сред, исключающих использование в качестве сырья дорогостоящего мяса, обладающих повышенной информативностью при уменьшении сроков культивирования микроорганизмов при первичном посеве. Биохимический состав пантового шрота вполне отвечает требованиям, предъявляемым к сырью для производства жидкой основы питательных сред. При проведении контроля модифицированных питательных сред использовали штаммы микроорганизмов: *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, изолированных от маралов. По проведенным микробиологическим исследованиям новые среды на основе пантолизата, полученного из пантового шрота, превосходят общепризнанные МПА и МПБ. Сокращается время появления первичного роста на 1-7 ч, увеличивается накопление биомассы, а также не требуется добавления сыворотки крови, необходимой для культивирования стрептококков. Все вышеизложенное позволяет использовать эту среду для первичного посева биоматериала.

**Keywords:** *culture medium, Pantolizat (hydrolysate of velvet antler), extraction cake, microorganisms, information value, beef-extract broth, beef-extract agar.*

Quite literally, culture media are considered to be one of the primary components of microbiological research. The modern microbiology cannot exist without culture media, and their quality largely determines the information value and accuracy of microbiological analysis. When selecting a culture medium, its full value should be taken into account, i.e., it should be a substantial and well-balanced set of various nutritional compounds that a microorganism requires to build up a growing cell. To ensure a normal growth and development of microorganisms, a culture medium must have all of the elements from which a cell is formed. Finding highly-efficient culture media on a cheap protein base obtained from by-products of various industries is a topical issue. In this regard, the development of economically feasible effective culture media that does not use expensive meat as the base

material will have an increased information value and allow for a decreased cultivation period at the primary isolation stage. The biochemical composition of the velvet antler cake quite corresponds to the requirements for the raw material intended for the production of the culture medium liquid base. The following microbial strains: *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* isolated from marals were used for the control of modified culture media. According to the conducted microbiological research, the new media based on the hydrolysate of velvet antler obtained from velvet antler cake outperforms the generally acknowledged beef-extract broth and beef-extract agar. The time before the primary growth decreases by 1-7 hours, the accumulation of the bacterial mass increases, and no blood serum needs to be added in order to cultivate streptococci. In view of the above, this medium can be used for the primary inoculation of biological material.

**Романцева Юлия Николаевна**, к.в.н., вед. н.с., лаб. болезней животных, отдел «ВНИИПО», Федеральный Алтайский научный центр агробиотехнологий, г. Барнаул. E-mail: wniipo@rambler.ru.

**Romantseva Yuliya Nikolayevna**, Cand. Vet. Sci., Leading Staff Scientist, Lab. of Animal Diseases, Federal Altai Scientific Center of Agro-Biotechnologies, Barnaul. E-mail: wniipo@rambler.ru.

### Введение

Задачи, стоящие перед ветеринарными врачами по снижению уровня инфекционных болезней, тесно связаны с бактериологической диагностикой, которая в значительной степени зависит от качества и ассортимента питательных сред [1].

Питательные среды без преувеличения считаются одними из основных составляющих в микробиологических исследованиях. Современная микробиология без питательных сред существовать не может, а их качество во многом определяет информативность, точность микробиологического анализа. Число питательных сред, включенных в ряд руководств (с учетом модификаций), превышает 5000 прописей, причем эта цифра вряд ли может считаться полной [2].

Проблема изыскания высокоэффективных питательных сред на дешевой белоксодержащей основе из отходов различных производств в настоящее время является актуальной [3, 4].

В связи с этим разработка экономически обоснованных эффективных питательных сред, исключающих использование в качестве сырья дорогостоящего мяса, обладающих повышенной информативностью и при уменьшении сроков

культивирования микроорганизмов при первичном посеве, является актуальной.

Исходя из вышеизложенного, целью исследований явилась модификация общепринятых питательных сред.

Для решения поставленной цели предусматривались следующие задачи:

- определить оптимальный способ изготовления питательных сред на основе пантолизата;
- изучить информативность полученных питательных сред.

**Объекты и методы:** пантолизат, информативность модифицированных питательных сред, микробиологические методы исследований.

**Экспериментальная часть:** изучение оптимальных способов изготовления модифицированных питательных сред с исследованием их информативности.

### Материалы и методы

При проведении контроля разрабатываемых питательных сред использовали штаммы микроорганизмов: *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, изолированных от маралов.

Для сравнения новых питательных сред использовали общепринятые среды – мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА). Новую питательную среду для выращивания микроорганизмов готовили следующим образом: 200 г пантового шрота смешивали с 1 л дистиллированной воды, смесь помещали в экстрактор и экстрагировали при 98°C под давлением 1,5 атм. в течение 3 ч. Содержимое емкости фильтровали через ватно-марлевый фильтр с последующей стерилизацией при 120°C в течение 40 мин. После стерилизации экстракт (пантолизат) фильтровали вторично. Для приготовления 500,0 г среды брали 487,5 г пантолизата и смешивали с 5,0 г пептона, 2,5 г натрия хлорида (жидкая питательная среда) и 5,0 г агар-агара (для приготовления плотной среды), доводили рН до 7,6, после этого среду кипятили в течение 30 мин., отстаивали, фильтровали, фасовали в пробирки и стерилизовали при 1 атм. в течение 30 мин.

Для посева определенного количества микробных клеток в жидкую или плотную питательную среду использовали бактериальный стандарт мутности (ОСО 42-28-85-04) ГИСК им. Л.А. Тарасевича на 10 ед.

При этом учитывали в жидких средах: рост микроорганизмов с помутнением среды, придонный рост, поверхностный рост, на плотных средах, соответственно, размер, форму, цвет, рельеф и структуру колоний.

Показатель роста определяли во время инкубации посевов, фиксируя дату и час видимого роста культур.

Биохимические свойства выделенных культур изучали согласно регламентированным методикам [5, 6].

### Результаты исследований

В процессе приготовления пантокринина, в который переходит лишь 3-4% сухого вещества измельченного панта, значительная часть биологически активных веществ остается в пантовом шроте [7]. Исследования биохимического состава пантового шрота приведены в таблице 1.

Согласно данным, приведенных в таблице 1, пантовый шрот богат макро- и микроэлементами, липидами и аминокислотами.

В свою очередь, это позволяет использовать его как основу для питательных сред, таких как мясопептонный бульон и мясопептонный агар.

Таблица 1

**Биохимический состав пантового шрота**

Наименование показателя	Ед. измерения, мг/кг	Наименование показателя	Ед. измерения, мг/кг
Железо	124	Незаменимые аминокислоты	161848
Кадмий	Менее 0,003		
Калий	1200		
Кальций	205000		
Кобальт	Менее 0,1		
Кремний	26,3		
Магний	5500	Заменимые аминокислоты	125833
Марганец	1,29		
Медь	0,56		
Мышьяк	Менее 0,005		
Натрий	4300		
Никель	0,036	Белок	287681
Свинец	Менее 0,007	Липиды	13300
Селен	1,11		
Фосфор	121000		
Цинк	59,2		

Питательные среды на основе пантолизата были испытаны на штаммах микроорганизмов: *St. aureus*, *St. epidermidis*, *Str. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*. В таблицах 2, 3 приведены сравнительные данные роста микроорганизмов на питательных средах: мясопептонном бульоне и питательных сред, приготовленных на основе пантолизата, полученного в режимах:

- соотношение шрот:сырье 1:5, экстракция в течение 3 ч при 1,5 атм. и 98-99°C;
- соотношение 1:4, время 4 ч, 1,5 атм., 98-99°C.

Для изучения влияния питательных сред на основе пантолизата, полученного из пантового шрота, на изменчивость микроорганизмов проведено определение их биохимических свойств.

*St. aureus* – в мазках, окрашенных по Граму, обнаружены клетки сферические диаметром 0,5-1,5 мкм, одиночные, в парах и в группах неправильной формы, грамположительные, неподвижные, не спорообразующие. В заявленной жидкой питательной среде отмечен рост с равномерным помутнением среды, сформировал компактный легкоосuspendируемый осадок. На плотных питательных средах образует круглые, выпуклые, гладкие, блестящие, непрозрачные колонии. На данной среде с добавлением крови образует зону α-гемолиза. Каротиноидный пигмент колоний, растёт в анаэробных и аэробных условиях, на агаре с 10-15% NaCl, при температу-

ре 15 и 45°C. Образует молочную кислоту. Образует кислоту (в аэробных условиях) из сахарозы, мальтозы, маннита, маннозы, трегалозы, лактозы, галактозы, фруктозы, туранозы, рибозы. Образует дезоксирибонуклеазу, аргининдигидролазу, гиалуронидазу, коагулазу, оксидазоотрицателен, восстанавливает нитрат, положительная реакция на щелочную фосфатазу, обладает уреазной активностью.

*St. epidermidis* – в окрашенных мазках обнаружены сферические клетки, диаметром 0,5-1,5 мкм, одиночные, в парах и в группах неправильной формы, грамположительные, неподвижные, не спорообразующие. В жидкой питательной среде растёт с помутнением и последующим просветлением среды, формирует слизистый осадок. На агаровой среде колонии округлые, гладкие, выпуклые, блестящие, непрозрачные, 3-6 мм в диаметре. Цвет колоний серый. Растёт в анаэробных и аэробных условиях, на агаре с концентрацией NaCl 10%, при температуре культивирования 45°C. Образует кислоту (в аэробных условиях) из сахарозы, мальтозы, маннозы, лактозы, галактозы, фруктозы, рибозы, туранозы. Образует ацетонин, восстанавливает нитрат, положительная реакция на щелочную фосфатазу, образует аргининдигидролазу, обладает уреазной активностью. Биопроба отрицательная.

Таблица 2

**Сравнительная характеристика роста микроорганизмов на питательных средах**

Вид микроорганизма и показатели роста	Питательные среды на основе		
	мясной воды (МПБ)	пантолизата (в режиме 1:5, 3 ч, 1,5 атм., 98-99°C)	пантолизата (в режиме 1:4, 4 ч, 1,5 атм., 98-99°C)
1. <i>St. aureus</i> , <i>St. epidermidis</i> Время появления роста	12 ч	9 ч	11 ч
2. <i>Str. pneumoniae</i> Время появления роста	Роста нет	15 ч	21 ч
3. <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> Время появления роста	11 ч	4 ч	9 ч

**Сравнительная характеристика роста микроорганизмов на питательных средах**

Вид микроорганизма и характер роста	Питательные среды на основе		
	мясной воды (МПА)	пантолизата (в режиме 1:5, 3 ч, 1,5 атм., 98-99°C)	пантолизата (в режиме 1:4, 4 ч, 1,5 атм., 98-99°C)
1. <i>St. aureus</i> , <i>St. epidermidis</i> Время появления роста Количество колоний	12 ч 35, 80	9 ч 70, 130	9 ч 47, 115
2. <i>Str. pneumoniae</i> Время появления роста Количество колоний	роста нет	15 ч 100	15 ч 26
3. <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> Время появления роста Количество колоний	12-14 ч 20; 40	9-10 ч 17, 54	12 ч 15, 46

*Str. pneumoniae* – в окрашенных мазках из суточных агаровых культур обнаружены сферические клетки диаметром 0,5-2,0 мкм, неподвижные, не спорообразующие, грамположительные, капсулообразующие. В жидкой питательной среде растёт с равномерным помутнением и образованием осадка. Колонии на твердой питательной среде мелкие, круглые, полупрозрачные, плоские, с приподнятым центром и краями. На данной среде с добавлением крови образует зону α-гемолиза. Растёт на воздухе, с 5%-ным CO<sub>2</sub>. Роста нет при культивировании при температуре 10, 45°C; при pH 9,6; растёт на средах с концентрацией NaCl 6,5%; 40% – желчи; 0,25% – оптоцина. Гидролизует аргинин, эскулин, не гидролизует геппурат. Образует кислоту из инулина, лактозы, раффинозы, трегалозы. Отрицательная реакция Фогеса-Проскауэра. Биопроба положительная.

*Escherichia coli* – в мазках, окрашенных по Граму, обнаружены прямые палочки 1,1-1,5x2,0-6,0 мкм, одиночные или в парах, грамотрицательные, подвижные. В жидкой питательной среде растёт диффузно с помутнением среды. На твердой питательной среде образует гладкие, выпуклые, блестящие с ровными краями колонии, хорошо суспензируемые в растворе хлорида натрия. Оксидазоотрицателен, образует индол, реакция с метиленовым красным положительная,

реакция Фогеса-Проскауэра – отрицательная. Не растёт на среде Симмонса. Сероводород не образует. Мочевину не гидролизует. Образует лизиндекарбоксилазу, образует кислоту из глюкозы, арабинозы, глицерола, дульцита, ксилозы, мальтозы, маннита, маннозы, мелибиозы, рамнозы, сорбита, трегалозы. Использует ацетат, восстанавливает нитрат, каталазоположителен. Биопроба отрицательная.

*Enterobacter aerogenes* – в мазках, окрашенных по Граму, обнаружены прямые палочки, 0,6-1,0x1,2-3,0 мкм, грамотрицательные, подвижные. В жидкой питательной среде растёт диффузно с помутнением среды с выпадением осадка. На твердой питательной среде образует гладкие, выпуклые, блестящие с ровными краями колонии. Оксидазоотрицателен, индол и сероводород не образует, реакция с метиленовым красным отрицательная, реакция Фогеса-Проскауэра – положительная. Растёт на среде Симмонса. Растёт в присутствии KCN. Использует малонат. Образует кислоту и газ из глюкозы, кислоту из адонитола, арабинозы, глицерола, мио-инозитола, ксилозы, лактозы, мальтозы, маннита, маннозы, мелибиозы, рамнозы, рафинозы, салицина, сахарозы, сорбита, трегалозы, целлобиозы. Гидролизует эскулин, не гидролизует мочевину. По лизиндекарбоксилазе и орнитиндекарбоксилазе положи-



телен, использует ацетат, восстанавливает нитрат, каталазоположителен. Биопроба отрицательная.

Из вышеизложенных результатов следует, что при использовании пантолизата, полученного из пантового шрота, для приготовления питательных сред повышается их информативность при культивировании *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *St. aureus*, *St. epidermidis*, а при культивировании *Str. pneumoniae* нет необходимости в добавлении 20%-ной сыворотки крови лошади, без добавления которой этот микроорганизм не растет на общепринятых средах МПБ и МПА.

### Заключение

Новые среды на основе пантолизата, полученного в процессе переработки пантового шрота, превосходят общепризнанные МПА и МПБ по своей информативности. Сокращается время появления первичного роста на 1-7 ч, увеличивается накопление бакмассы, а также не требуется добавления сыворотки крови, необходимой для культивирования стрептококков, что позволяет использовать эту среду в микробиологических исследованиях.

### Библиографический список

1. Егорова И.Ю., Никитченко Д.В., Чернышева А.Н., Рысцова Е.О. Микробиологические питательные среды нового формата в ветеринарно-санитарной оценке продуктов питания и сырья животного происхождения // Вестник РУДН. – 2017. – № 1. – С. 76-85.
2. Поляк М.С. Питательные среды для медицинской микробиологии В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич. – СПб., 2002. – С. 4.
3. Султанов З.З. Разработка и усовершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред: автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Махачкала, 2008. – С. 7.
4. Bridson E.Y., Brecker A. Design and formulation of microbial culture media. In: Norris J.R., Rib-

bons D.W., editors. Methods in microbiology. London and New York: Academic Press; 1970. p. 968-974.

5. Скородумов Д.И., Сидоров М.А., Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. – М.: ИзографЪ, 2005. – С. 94-106.

6. Cowan, S.T., Steel, K.J. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edn. Revised by S.T. Cowan. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1974. P. 238.

7. Луницын В.Г., Борисов Н.П. Пантовое оленеводство России: монография. – Барнаул, 2012. – 1000 с.

### References

1. Yegorova I.Yu., Nikitchenko D.V., Chernysheva A.N., Rystsova Ye.O. Mikrobiologicheskie pitatelnye sredy novogo formata v veterinarno-sanitarnoy otsenke produktov pitaniya i syrya zhivotnogo proiskhozhdeniya // Vestnik RUDN. – 2017. – No. 1. – S. 76-85.
2. Polyak M.S., Sukharevich V.I., Sukharevich M.E. Pitatelnye sredy dlya meditsinskoy mikrobiologii. – SPb., 2002. – S. 4.
3. Sultanov Z.Z. Razrabotka i usovershenstvovanie tekhnologiy polucheniya mikrobiologicheskikh pitatelnykh osnov i sred: avtoref. dis. ... dokt. biol. nauk. – Makhachkala, 2008. – S. 7.
4. Bridson E.Y., Brecker A. Design and formulation of microbial culture media. In: Norris J.R., Ribbons D.W., editors. Methods in microbiology. London and New York: Academic Press; 1970. p. 968-974.
5. Skorodumov D.I., Subbotin V.V., Sidorov M.A., Kostenko T.S. Mikrobiologicheskaya diagnostika bakterialnykh bolezney zhivotnykh. – M.: Izograf, 2005. – S. 94-106.
6. Cowan, S.T., Steel, K.J. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd edn. Revised by S.T. Cowan. Cambridge, UK: Cambridge University Press. 1974. P. 238.
7. Lunitsyn V.G., Borisov N.P. Pantovoe olenevodstvo Rossii: monografiya. – Barnaul, 2012. – 1000 s.

