

УДК 579.64:595.771

Мерзлов С.В., доктор с.-г. наук, професор
Андрійчук А.В., кандидат ветеринарних наук
Зоценко В.М., кандидат ветеринарних наук
Король-Безпала Л.П., аспірантка
e-mail: lesy25@ukr.net
Білоцерківський національний аграрний університет

МІКРОБІОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЛИЧИНОК *CHIRONOMUS* ЗА РІЗНИХ РЕЖИМІВ ПАСТЕРИЗАЦІЇ

Поживним середовищем для розвитку личинки *Chironomus* є мул річок і водоймищ. Мул багатий на мікроорганізми. Особливістю мікроорганізмів є зміна хімічного складу поживного середовища, яке впливає на ріст і розвиток личинки *Chironomus*.

У статті представлено результати досліджень посівів із поживного середовища для личинки *Chironomus* з метою визначення видового і кількісного складу мікрофлори.

Виявлено, що у нативному мулі колонії бактерії роду *Pseudomonas* spp. складають 45,9%, *Vacillus* sp. – 32,4% і кокової мікрофлори – 21,7% від загальної кількості колонієутворюючих організмів. Температурна обробка призводить до зниження кількісних показників мікрофлори поживного середовища. Так, за тривалої пастеризації (65°C) кількість колонієутворюючих організмів знизилась у 13 разів, за короткочасної пастеризації (75°C) у 18 разів і за миттєвої пастеризації (95°C) знизилась у 285 разів порівнюючи із нативною формою.

Ключові слова: поживне середовище, режими пастеризації, ріст колоній, *Pseudomonas* spp., *Vacillus* sp., кокова мікрофлора

Рис. 3. Табл. 1. Літ. 10.

Постановка проблеми. Середовищем проживання бактерій є товща води і донні відкладення водойм. Залежно від місця перебування вони поділяються на бактеріопланктон (планктонні форми) та бактеріобентос (мешканці донних відкладень). Значна кількість бактерій розвивається на межі фаз вода – повітря (бактеріонейстон) та вода – тверді субстрати (бактеріоперифітон). Видовий склад бактеріальної флори і спрямованість мікробіологічних процесів у водоймах залежать від екологічного стану водойм, їх фізичних і гідрохімічних характеристик та наявності інших груп гідробіонтів [1].

У трофічних ланцюгах риби личинки *Chironomus* відіграють важливе значення. Основним поживним середовищем для личинок є мул озер, ставів та річок [1].

Невивченим залишається мікробіологічний склад нативного і пастеризованого мулу із р. Рось як основної складової поживного середовища для вирощування личинки *Chironomus*.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У водоймах мешкають представники всіх груп бактерій. Серед них є і бактерії, які зустрічаються у повітрі та ґрунті. Згідно з найбільш поширеною класифікацією до бактерій

належать також актиноміцети, які мають паличковидну, нитчасту або кокоподібну форму з бічними відгалуженнями без клітинних перегородок і за своєю формою нагадують мікроскопічні гриби [3, 9].

Мікрофлора води і донних відкладень відображає різний рівень трофності водойм. У водних екосистемах бактерії відіграють надзвичайно важливу роль. За їх участю відбувається перетворення складних органічних речовин у більш прості сполуки, придатні для засвоєння гідробіонтами інших трофічних рівнів [2, 6, 11].

Так само як і ґрунт, мул водоймищ є природним місцем для життя мікробів. Мікроорганізми в ньому не тільки знаходяться, але й розмножуються. У водойми вони потрапляють з ґрунтом, пилом, органічними рештками. У прибережній смужі зазвичай міститься більше мікробів, ніж далеко від берега. Мікрофлора вод носить випадковий характер, проте в неї входять і деякі постійні види, які потребують мінімальних кількостей органічних речовин. Забрудненість води мікроорганізмами залежить від її походження [7].

В озерних екосистемах бактеріальний склад формується в залежності від екологічних умов середовища. Найбільша кількість бактерій виявляється в евтрофних, найменша в оліготрофних водах. При цьому у різних екологічних зонах евтрофних вод, які відрізняються за рівнем розчиненого у воді Оксигену чітко виявляється залежність розвитку окремих бактеріальних угруповань від екологічних умов [4, 8, 10].

Найбільша кількість мікроорганізмів спостерігається у поверхневому шарі мулу, де утворюється своєрідна плівка з бактерій. Вона містить багато сіробактерій і залізобактерій і відіграє істотну роль у перетвореннях речовин у водоймі. Нестача оксигену сприяє розвитку анаеробних бактерій, що викликають бродіння рослинних залишків з утворенням метану і Гідрогену [1, 5, 6].

Мета дослідження. Дослідити бактеріальний склад мулу водоймищ, як основної складової поживного середовища для личинки *Chironomus* та виявити вплив різних режимів температурної обробки (пастеризації) на кількісний і якісний склад мікрофлори мулу із р. Рось.

Матеріали і методика дослідження. Об'єктом досліджень було поживне середовище в основу якого взято мул із р. Рось в межах Білоцерківського району Київської області, зразки відбирали з товщі дна на глибині до 8-10 см.

Досліджуване поживне середовище відважували по 10 г у 12 стерильних пробірок. Перші три пробірки термічно не обробляли (нативний мул). Поживне середовище у 4-6 пробірках піддавали тривалій пастеризації – за 65°C. Проби в 7-9 пробірках пастеризували – за 75°C (короткочасна пастеризація). На поживне середовище в 10-12 пробірках впливали миттєвою пастеризацією – за температури 95°C.

Всі бактеріологічні маніпуляції проводили у мікробіологічному боксі, який перед початком роботи стерилізували УФ-світлом, довжина хвилі 260-

280 нм. Потім послідовним методом розведень, за Л.Пастером готували розведення 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} .

Із поживних середовищ на основі мулу робили посіви на МПА, застосовуючи 3-х-8-и кратне розведення. Посіви проводили двома методами: на поверхню МПА (варіант А) і в товщу МПА (варіант В) [1]. Посів здійснювали з метою отримання окремих колоній з характерними ознаками.

Для посіву в товщу середовища в стерильну чашку Петрі вносили 1 мл розведеної суспензії мулу і заливали розплавленим і охолодженим до 45°C середовищем МПА. Ретельно (круговими рухами) перемішували мікробну суспензію і середовище. Після загусання поживного середовища чашки поміщали в термостат з оптимальною для росту мікроорганізмів температурою -37°C [1].

Облік результатів та вивчення культуральних властивостей проводили на 1, 2 та 3 добу.

Основні результати дослідження. Кожна колонія формується з нащадків однієї мікробної клітини (клон), тому їх склад досить однорідний. Особливості росту бактерій на живильних середовищах є проявом їх культуральних властивостей [1].

Чашки Петрі ретельно розглядали і вивчали ізольовані колонії, що виростили на поверхні МПА. Звертали увагу на розмір, форму, колір, характер країв і поверхні колоній, їх консистенцію та інші ознаки культуральних властивостей [1].

Аналізуючи посіви ми побачили домінуючий ріст таких колоній як *Bacillus sp.*, *Pseudomonas spp.* і кокові мікрофлори за різних розведень (рис. 1).

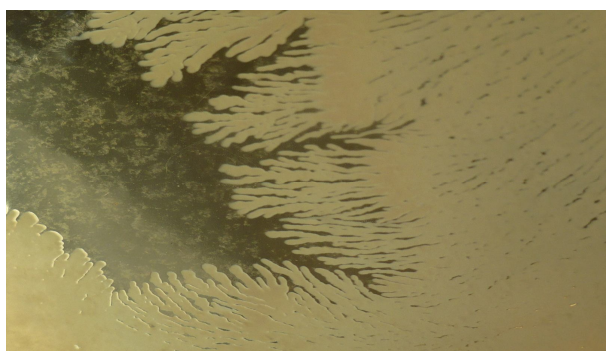


Рис. 1. Край колонії *Bacillus sp.*

Аналізуючи посіви ми побачили домінуючий ріст таких колоній як *Bacillus sp.*, *Pseudomonas spp.* і кокові мікрофлори за різних розведень. Паличкоподібна бактерія розмірами $3-5 \times 0,6$ мкм, ендоспори овальні, не перевищують розміру клітини, які не збільшені, утворюють спори еліпсоподібної форми з центральним розташуванням. Кожна клітина має кілька джгутиків, рухома. Ця бактерія – хемоорганогетеротроф, амоніфікує білки,

розщеплює крохмаль, глікоген. Дослідженнями було виявлено, що колонії сухі, дрібнозморшкуваті, бархатисті, безбарвні або рожеві. Краї колонії були хвилясті, коралоподібні.



Рис. 2. Ріст колонії Pseudomonas spp.

Серед висіяного матеріалу було ідентифіковано значну кількість *Pseudomonas spp.* Псевдомонади найменш вибагливі до факторів росту. Вони метаболізують складні органічні речовини і легкозасвоювані вуглеводи. Важливою діагностичною ознакою бактерій є їх здатність утилізувати вуглеводи як джерело живлення і енергії. Базовим вуглеводневим субстратом служить глюкоза. *Pseudomonas spp.* грам-негативні паличковидні бактерії розміром близько 0,5-1,0x1,5-5,0 мкм, аероби, вони є дуже різноманітні за типом метаболізму, і тому можуть колонізувати широкий ряд екологічних ніш. *Pseudomonas spp.* мають здатність метаболізувати різноманітні поживні речовини. Колонії були різної форми: плоскі неправильної форми, великі опуклі блискучі, слизові, карликові або точкові, складчасті. Мали сіре або жовтувато-сіре забарвлення, слабо опуклі, маслянистої консистенції.



Рис. 3. Ріст кокової мікрофлори у первинному посіві

Серед загальної різноманітності колоній нами було виявлено коки. Коки

– бактерії кулястої форми, мали правильну круглу форму розміром 0,5-1,5 мкм факультативні анаероби, росли в аеробних умовах. У мазках розміщувалися у вигляді неправильних скупчень чи поодинокі, грампозитивні, нерухливі. В складі клітинної стінки також знаходяться тейхоєві кислоти і пептидоглікан (муреїн). На МПА середовищі колонії мали правильну круглу форму, опуклі, непрозорі, гладенькі, блискучі, залежно від кольору пігменту були забарвлені в золотистий, палевий, білий, лимонно-жовтий колір. До живильних середовищ невибагливі, а також добре культивуються на простих середовищах.

Для подальшого дослідження отримували чисту культуру готували препарати мазки, фарбували методом Грама. Мікроскопію виконували з застосуванням імерсійної системи (об'єктив – 90-х, окуляр – 10-х).

Шляхом підрахунків було встановлено, що найбільше мікроорганізмів було у нативному мулі (табл. 1).

Таблиця 1

Кількість бактерій у нативному і пастеризованому мулі, $n=3$

п/п	Температурна обробка мулу	Підрахунок колоній бактерій		
		<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Bacillus sp.</i>	Кокова мікрофлора
1	відсутня (нативний мул)	$1,74 \cdot 10^8$ КУО/1г	$1,74 \cdot 10^8$ КУО/1г	$0,84 \cdot 10^8$ КУО/1г
2	тривала (65°C)	$1,34 \cdot 10^7$ КУО/1г	$0,94 \cdot 10^7$ КУО/1г	$0,64 \cdot 10^7$ КУО/1г
3	короткочасна (75°C)	$0,94 \cdot 10^7$ КУО/1г	$0,74 \cdot 10^7$ КУО/1г	$0,54 \cdot 10^7$ КУО/1г
4	миттєва (95°C)	$0,64 \cdot 10^6$ КУО/1г	$0,44 \cdot 10^6$ КУО/1г	$0,34 \cdot 10^6$ КУО/1г

Встановлено, що за кількістю підрахунків колоній бактерій найбільша кількість у нативному мулі $3,74 \cdot 10^8$ КУО/1г, а найменша кількість мікроорганізмів виділялась у посівах пастеризованого мулу – за миттєвої пастеризації 95°C, кількість бактерій складала $1,34 \cdot 10^6$ КУО/1г. У посівах з поживним середовищем пастеризованим за тривалої і короткочасної температури (65°C і 75°C), виявлено незначну кількість бактерій, так як найпростіші всі загинули під час пастеризації.

Також, встановлено, що найбільше колоній на нативному мулі припадає на *Pseudomonas spp.* – 45,9% на долю *Bacillus sp.* припадає 32,4% колоній і 21,7% представлені коковою мікрофлорою.

Висновки. 1. Виявлено, що від загальної кількості колонієутворюючих організмів у нативному мулі колонії бактерії родини *Pseudomonas spp.* припадає 45,9%, *Bacillus sp.* – 32,4% і кокова мікрофлора – 21,7%.

2. За тривалої пастеризації (65°C) кількість колонієутворюючих організмів знизилась у 13 разів, за короткочасної пастеризації (75°C) у 18 разів, а за миттєвої пастеризації (95°C) кількість колонієутворюючих організмів від загальної кількості колоній знизилась у 285 разів.

Перспективи подальших досліджень. Перспективним дослідженням є вивчення впливу пастеризованого мулу на біотехнологію вирощування личинки *Chironomus*.

Список використаної літератури

1. Асонов Н.Р. Практикум по микробиологии / Н.Р. Асонов // 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1988. – 155 с.
2. Баубекова Д.Г. Ростстимулирующая активность микроорганизмов рода *Bacillus* / Д.Г. Баубекова // *Universum: Химия и биология: электрон. научн. журн.* – 2014. – № 7 (7).
3. Головка А.М. Ветеринарна санітарна мікробіологія: навч. посіб. / А.М. Головка, І.О. Рубленко. – К.: Аграрна освіта, 2010. – 284 с.
4. Ключко В.В. Екологія, систематика та антибіологічна активність *Pseudomonas batumici* і *Alteromonas macleodil* та їх зв'язок зі структурою геномів / В.В. Ключко // *Мікробіологічний Журнал.* –2016. – Т. 78 (6). – С. 50-59.
5. Кривицька Т.М. Характеристика штамів бактерій роду *Bacillus* з лавіцидною активністю до грибних комариків *Bradysia pilistriata* frey (Sciaridae) / Т.М. Кривицька, О.С. Багаєва, С.П. Ужєвська [та ін.]. // *Мікробіологія і біотехнологія.* – 2010. – № 3. – С. 86.
6. Харвуд К.А. Бациллы. Генетика и биотехнология. / К.А. Харвуд. – М.: Мир, 1992. – 531 с.
7. Харченко С.М. Мікробіологія / С.М. Харченко // К.: Сільгоспосвіта. –1994. – С. 120-124.
8. Чеботарь В.К. Биохимические критерии оценки агрономически значимых свойств бацилл, используемых при создании микробиологических препаратов // *Сельскохозяйственная биология.* – 2011. – № 3. – С. 119-122.
9. Fayyaz U., Chaloupka J. Regulation of formation of proteases in *Bacillus megaterium* iv. The formation of the enzyme in the sporogenous strain KM // *Folia Microbiol.* – 1995. –Vol. 15(4). – P. 264-274.
10. Kumar P., Khare S., Dubey R. Diversity of Bacilli from Disease Suppressive Soil and their Role in Plant Growth Promotion and Yield Enhancement // *New York Science Journal.* –2012. – № 5(1). – P. 90-111.

References

1. Asonov N.R. Praktikum po mikrobiologii / N.R. Asonov //2-e izd., perorab. I dop. – М.: Agropromizdat, 1988. – 155 s.
 2. Baubekova D.G. Roststimuliruyushchaya aktivnost' mikroorganizmov roda *Bacillus* / D.G. Baubekova // *Universum: Himiya i biologiya: ehlektron. nauchn. zhurn.* – 2014. – № 7(7).
 3. Holovko A.M. Veterynarna sanitarna mikrobiolohiia: navch. posib. / A.M. Holovko, I.O. Rublenko. – К.: Ahrarna osvita, 2010. – 284 s.
 4. Klochko V.V. Ekolohiia, systematyka ta antybiolohichna aktyvnist *Pseudomonas batumici* i *Alteromonas macleodil* ta yikh zviazok zi strukturoiu henomiv / V.V. Klochko // *Mikrobiologichny Zhurnal.* –2016. – Т. 78(6). – S. 50-59.
 5. Kryvytska T.M. Kharakterystyka shtamiv bakterii rodu *Bacillus* z lavitsydnoiu aktyvnistiю do hrybnykh komarykiv *Bradysia pilistriata* frey (Sciaridae) / Т.М. Kryvytska, O.S. Bahaieva, S.P. Uzhevskaya [ta in.]. // *Mikrobiolohiia i biotekhnolohiia.* – 2010. – № 3. – S. 86.
 6. Harvud K.A. Bacilly. Genetika i biotekhnologiya. / K.A. Harvud. – М.: Mir, 1992. – 531 s.
 7. Kharchenko S.M. Mikrobiolohiia / S.M. Kharchenko // К.: Silhosposvita. –1994. – S. 120-124.
-

-
8. Shebotar' V.K. Biohimicheskie kriterii ocenki agronomicheskoi znachemykh svojstv bacill, ispol'zuemykh pri sozdanii mikrobiologicheskikh preparatov // Sel'skohozyajstvennaya biologiya. – 2011. – № 3. – S. 119-122.
 9. Fayyaz U., Chaloupka J. Regulation of formation of proteases in *Bacillus megaterium* iv. The formation of the enzyme in the sporogenous strain KM // Folia Microbiol. – 1995. – Vol. 15 (4). – P. 264-274.
 10. Kumar P., Khare S., Dubey R. Diversity of Bacilli from Disease Suppressive Soil and their Role in Plant Growth Promotion and Yield Enhancement // New York Science Journal. – 2012. – № 5 (1). – P. 90–111.
-

АННОТАЦИЯ

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЛИЧИНОК *CHIRONOMUS* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ПАСТЕРИЗАЦИИ

Мерзлов С.В., доктор с.-х. наук, профессор

Андрійчук А.В., кандидат ветеринарных наук

Зоценко В.Н., кандидат ветеринарных наук

Король-Безпалая Л.П., аспирантка

e-mail: lesy25@ukr.net

Белоцерковский национальный аграрный университет

*Питательной средой для развития личинки *Chironomus* является ил рек и водоемов. Ил богат микроорганизмами. Особенностью микроорганизмов является изменение химического состава питательной среды, которое влияет на рост и развитие личинки *Chironomus*.*

*В статье представлены результаты исследований посевов из питательной среды для личинки *Chironomus* с целью определения видового и количественного состава микрофлоры.*

*Выявлено, что в нативном иле колонии бактерии рода *Pseudomonas* spp. составляют 45,9%, *Bacillus* sp. – 32,4% и кокковой микрофлоры – 21,7% от общего количества колониеобразующих организмов. Температурная обработка приводит к снижению количественных показателей микрофлоры питательной среды. Так, по длительной пастеризации (65°C) количество колониеобразующих организмов снизилось в 13 раз, по кратковременной пастеризации (75°C) в 18 раз и по мгновенной пастеризации (95°C) снизилось в 285 раз сравнивая с нативной формой.*

Ключевые слова: *питательная среда, режимы пастеризации, бактериальные посевы, колонии роста, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* sp., коковые микрофлоры*

Рис. 3. Табл. 1. Лит. 10.

ANNOTATION

MICROBIOLOGICAL STUDY OF THE NUTRITIONAL MEDIUM FOR CHIRONOMUS LARVAE UNDER VARIOUS PASTERIZATION MODES

Merzlov S.V., Doctor of Agricultural Science, Professor

Andriychuk A.V., Candidate Veterinary Science

Zotsenko V.M., Candidate Veterinary Science

Korol'-Bezpala L.P., Postgraduate Student

e-mail: lesy25@ukr.net

Bilotsrkiivskiy National Agrarian University

The bacteria habitat is the water bulk and the bottom sediments. Depending on their location, they are divided into bacterioplankton (planktonic forms) and bacteriobentos (bottom sediments inhabitants). A significant amount of bacteria develops in the water-air interface – (bacterioneistone) and in water-solid substrates interface (bacterioperiphyton). The species composition of bacterial flora and the orientation of microbiological processes in the reservoirs depend on the ecological status of the reservoirs, their physical and hydrochemical characteristics and the presence of other groups of hydrobionts.

Chironomus larvae is an important elements in the trophic chains of fish. The main nutrient medium for larvae is the silt of lakes, ponds and rivers.

The microbiological composition of the native and pasteurized silt from the Ros' river as the main component of the nutrient medium for the cultivation of the Chironomus larvae remains unexplored.

The microflora of water and bottom sediments reflects various levels of water trophy. Bacteria play an extremely important role in aquatic ecosystems. They participate in the transformation of complex organic substances into simple compounds, suitable for absorption by hydrobionts of other trophic levels.

In lake ecosystems, the bacterial composition is formed depending on the environmental conditions of the habitat. The largest amount of bacteria is found in eutrophic waters and the smallest – in oligotrophic waters. At the same time, in different ecological zones of eutrophic waters, which differ in the level of oxygen dissolved in water, the dependence of the development of individual bacterial groups on ecological conditions manifests clearly.

The largest amount of microorganisms is observed in the upper layer of silt, where a peculiar film of bacteria forms. It contains a lot of thiobacteria and iron bacteria and plays a significant role in the substances transformation in the reservoir. Lack of Oxygen promotes the development of anaerobic bacteria fermenting plant residues with methane and Hydrogen formation.

The aim of the study was to establish the bacterial composition of water silt as the main component of the nutrient medium for the Chironomus larvae and to identify the effects of different modes of temperature treatment (pasteurization) on the quantitative and qualitative composition of the silt microflora from the Ros' river. The investigated nutrient medium was pasteurized under prolonged pasteurization (65°C), short pasteurization (75°C), and instant pasteurization (95°C). Inoculations for MPA were made on the base of silt nutrient media, using 3- and 8- multiple dilution. Inoculations were carried out in two ways: on the surface of the MPA (option A) and in the MPA bulk (option B). Inoculations were carried out in order to receive separate colonies with specific features.

Petri's cups were carefully examined the isolated colonies that grew up on the surface of the MPA were studied. Attention was paid to the size, shape, color, the nature of the edges and the surface of the colonies, their consistency and other features of cultural properties.

While analyzing the bacterial inoculations, we noticed the dominant growth of the colonies of Bacillus sp., Pseudomonas spp. and coccus microflora in different dilutions.

Bacillus sp. is an aerobic soil bacteria "hay bacterium" which forms endospores. Studies have shown that the colonies are dry, creasy, velvety, colorless or pink. The edges of the colony were wavy, coral-like.

Colonies of Pseudomonas spp. were of different shapes: flat irregular shapes, large convex shiny, mucous, dwarf or dotted, folded. They had a gray or yellowish-gray color, slightly convex, oily consistency.

Cocca – are spherical bacteria of regular round shape sized 0.5-1.5 microns, optional anaerobes, growing in aerobic conditions. They were located in the smears in the form of irregular clusters or singly, gram-positive, immovable. The composition of the cell wall includes peptidoglycan (murein) and teichoic acids. They are unpretentious for the nutrient medium, well cultivated in simple media.

It was established that in a native mule the amount of bacteria was $3.7 \cdot 10^8$ NSU / 1 g. The smallest amount of microorganisms was isolated in pasteurized silt inoculations - for instant pasteurization (95°C) - the amount of bacteria was $1.3 \cdot 10^6$ NSU / 1 g.

It was also found that in a native mule, the species of Pseudomonas spp. accounted for 45.9% of the total number of colony-forming organisms, Bacillus sp. – 32.4% and cocca microflora – 21.7%.

Keywords: *nutrient medium, pasteurization modes, colony growth, Pseudomonas spp., Bacillus sp., Cocca microflora*

Fig. 3. Tab. 1. Lit. 10.

*Рецензент: Скоромна О.І., доктор с.-г. наук, професор
Вінницький національний аграрний університет*