

Міністерство освіти і науки України
Дрогобицький державний педагогічний університет імені Івана Франка
Кафедра біології та хімії

«До захисту допускаю»
завідувач кафедри біології та хімії
кандидат біологічних наук, доцент
_____ Ірина БРИНДЗЯ
«__» _____ 20__ р.

**ДОСЛІДЖЕННЯ РІЗНИХ РЕЖИМІВ АВТОКЛАВУВАННЯ
ТА СПОСОБІВ МЕМБРАННОЇ СТЕРИЛІЗАЦІЇ НА
ВЛАСТИВОСТІ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ**

Спеціальність: 091 Біологія та біохімія

Магістерська робота

на здобуття кваліфікації – Магістр з біології за спеціалізацією
«Лабораторна діагностика біологічних систем»

Автор роботи: Деревянчук Галина Володимирівна _____

**Науковий керівник: кандидат біологічних наук,
доцент Клепач Галина Миколаївна _____**

Дрогобич, 2025

**Дрогобицький державний педагогічний університет
імені Івана Франка**

Зав. кафедрою:

Завдання

на підготовку кваліфікаційної магістерської роботи

Тема: Дослідження різних режимів автоклавування та способів мембранної стерилізації на властивості живильних середовищ.

1. Керівник: Клепач Галина Миколаївна

2. Студент: Деревянчук Галина Володимирівна

3. Перелік питань, що підлягають висвітленню у кваліфікаційній роботі: здійснити аналіз наукової та науково-методичної літератури з досліджуваної проблеми; оволодіти методом автоклавування та методом мембранної стерилізації деяких живильних середовищ, особливостями їх приготування та підготовкою до стерилізації, ознайомитись із методами аналізу стерильності живильних середовищ; дослідити вплив різних режимів автоклавування на властивості деяких живильних середовищ; дослідити вплив різних способів мембранної стерилізації на властивості деяких живильних середовищ; проаналізувати та математично-статистично опрацювати отримані результати досліджень; зробити висновки про вплив різних режимів та видів стерилізації на властивості живильних середовищ.

4. Список рекомендованої літератури: 1) М. Д. Мельничук «Загальна (промислова) біотехнологія», 2014; 2) В.Г. Герасименко «Біотехнологія», 2010; 3) Bhowmik G. «Introduction to the Laboratory. Analytical techniques in biotechnology», 2011; 4) Elizabeth L., Machado P., Lawrence M. «Ultra-processed foods and health outcomes: A narrative review. *Nutrients*», 2020; 5) Hussain M.A., Gooneratne R. «Understanding the fresh produce safety challenges. *Foods*», 2017.

5. Етапи підготовки роботи:

№	Назва етапу	Термін виконання	Термін звіту перед керівником, кафедрою
1.	Підготовчий: • затвердження теми магістерської роботи; визначення мети та завдань роботи; збір та аналіз літератури; написання аналітичного огляду літератури	вересень – грудень, 2025 р.	січень, 2025
2.	Експериментальний:	лютий –	жовтень, 2025

	- дослідити вплив різних режимів автоклавування на властивості деяких живильних середовищ; - дослідити різні способи мембранної стерилізації на властивості деяких живильних середовищ.	вересень, 2025 р.	
3.	Аналітично-узагальнюючий: • аналіз та обробка результатів дослідження; • написання магістерської роботи	вересень – жовтень, 2025 р.	листопад, 2025 р.
4.	Попередній захист роботи	листопад, 2025 р.	листопад, 2025 р.

6. Дата видачі завдання: вересень, 2024 р.

7. Термін подачі роботи керівнику: жовтень, 2025 р.

8. З вимогами до виконання кваліфікаційної роботи і завданням ознайомлена _____
(підпис студента)

9. Керівник _____

Захист магістерської роботи

(тема роботи)

Оцінка за стобальною шкалою: _____

Оцінка за національною чотирибальною шкалою: _____

Коротка мотивація захисту:

Дата

Голова ЕК

підпис

прізвище, ім'я

Секретар ЕК

підпис

прізвище, ім'я

АНОТАЦІЯ

Деревянчук Галина

Дослідження різних режимів автоклавування та способів мембранної стерилізації на властивості живильних середовищ.

Досліджено вплив різних режимів автоклавування та способів мембранної стерилізації на властивості деяких живильних середовищ – поживного та Сабуро-декстрозного агару, Гісса з глюкозою, Ендо агару, тіогліколевого середовища, триптон-соєвого бульйону/агару, агару Мак-Конки, бульйонів Мак-Конки та Мозеля.

Виявлено, що оптимальним режимом автоклавування для більшості досліджуваних середовищ є 121 °С протягом 15 хвилин; для стерилізації бульйону Мозеля ефективним виявилось використання фільтрування за допомогою мембранних фільтрів з розміром пор 0,22 мкм; для середовища Гісса з глюкозою оптимальним режимом автоклавування є 112°С протягом 15 хвилин. Результати можуть бути використані в мікробіологічній практиці для вдосконалення підготовки даних середовищ.

ABSTRACT

Derevianchuk Halyna

Study of different autoclaving regimes and membrane sterilization methods on the properties of nutrient media

The influence of different autoclaving regimes and membrane sterilization methods on the properties of certain nutrient media was investigated – Nutrient Agar, Sabouraud-Dextrose Agar, Hiss with Glucose, Endo Agar, Thioglycollate Medium, Tryptone Soya Broth/Agar, MacConkey Agar, MacConkey and Mossel Broths.

It was found that the optimal autoclaving regime for most of the studied media is 121°C for 15 minutes; for the sterilization of Mossel Broth, the use of filtration through membrane filters with a pore size of 0,22 µm proved effective; for Hiss Medium with Glucose, the optimal autoclaving regime is 112 °C for 15 min. The results can be used in microbiological practice to improve the preparation of media.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ У ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ ТА ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ	10
1.1. Загальна характеристика методів стерилізації живильних середовищ	10
1.2. Автоклавування як вид стерилізації живильних середовищ	12
1.3. Особливості мембранної стерилізації живильних середовищ	13
РОЗДІЛ 2. ТИПИ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ОСОБЛИВОСТІ ЇХ СКЛАДУ ТА ПРИЗНАЧЕННЯ	19
2.1. Класифікація живильних середовищ, їх різноманітність	19
2.2. Умови підготовки та контроль ефективності стерильності живильних середовищ	21
2.3. Застосування живильних середовищ у лабораторно-дослідницькій та фармацевтичній практиці	24
РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	29
3.1. Характеристика об'єкту дослідження	29
3.2. Характеристика умов проведення дослідження	29
3.3. Автоклавування живильних середовищ за різних режимів	30
3.4. Мембранна стерилізація живильних середовищ	33
3.5. Визначення ефективності стерилізації живильних середовищ	33
3.6. Математично-статистичний аналіз даних експериментів	34
РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ	36
4.1. Дослідження властивостей різних типів живильних середовищ	36
4.2. Дослідження впливу різних режимів автоклавування на властивості живильних середовищ	43
4.3. Дослідження впливу мембранної стерилізації на властивості живильних середовищ	43
ВИСНОВКИ	48
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50
ДОДАТКИ	

ВСТУП

Живильні середовища є ключовим елементом у мікробіологічних дослідженнях, оскільки вони забезпечують необхідні умови для росту та розвитку мікроорганізмів. Важливою складовою процесу підготовки таких середовищ є їх стерилізація, яка сприяє усуненню небажаних мікроорганізмів і забезпеченню чистоти експериментальних умов.

Стерилізація живильних середовищ може здійснюватися різними методами, такі як кип'ятіння, автоклавування та мембранна фільтрація. Автоклавування та кип'ятіння передбачають використання високих температур для знищення мікроорганізмів, тоді як мембранна фільтрація дозволяє усунути контамінанти без термічного впливу. Вибір методу стерилізації може суттєво впливати на фізико-хімічні і культуральні характеристики живильних середовищ, що, у свою чергу, визначає ефективність аналізів у лабораторній практиці та достовірність біологічних досліджень.

Актуальність дослідження обумовлена необхідністю оптимізації умов стерилізації для збереження стабільності складу та біологічної активності живильних середовищ. Незважаючи на широке використання автоклавування та мембранної стерилізації, їх вплив на властивості середовищ досі потребує детального вивчення. Таким чином, проведене дослідження сприятиме покращенню точності мікробіологічних аналізів та вдосконаленню методів підготовки середовищ для наукових і медичних досліджень.

Мета роботи: дослідження впливу різних режимів автоклавування та методів мембранної стерилізації на фізико-хімічні та культуральні властивості живильних середовищ.

Об'єкт дослідження: живильні середовища, що використовуються у мікробіологічних дослідженнях; різні режими автоклавування та способи мембранної стерилізації живильних середовищ.

Предмет дослідження: вплив різних режимів автоклавування та способів мембранної стерилізації на властивості живильних середовищ.

Основні завдання роботи:

- проаналізувати наукову та науково-методичну літературу стосовно досліджуваної проблеми;
- дослідити властивості деяких типів живильних середовищ залежно від призначення;
- дослідити вплив різних режимів автоклавування на властивості деяких живильних середовищ;
- дослідити вплив мембранної стерилізації на властивості деяких живильних середовищ;
- оцінити ефективність методів автоклавування та мембранної стерилізації на властивості деяких живильних середовищ.

Методи досліджень: мікробіологічний – для оцінки їхньої ефективності у підтримці росту мікроорганізмів; фізико-хімічний – для визначення змін у хімічному складі та структурних характеристиках середовищ; обчислювальний – для оцінки ефективності методів стерилізації; математично-статистичний – для визначення достовірності отриманих даних.

Наукова новизна. Порівняно ефективність класичних (термічних) і комбінованих методів стерилізації для середовищ, що мають складні або термолабільні компоненти; визначено оптимальні параметри стерилізації, які забезпечують збереження стерильності середовищ при мінімальній зміні їхніх візуальних та фізико-хімічних характеристик; встановлено, що поєднання кип'ятіння та мембранної фільтрації є ефективним методом стерилізації нагромаджувального бульйону Мозеля, а режим автоклавування при 121 °C протягом 15 хв є оптимальним способом стерилізації для більшості середовищ, що використовуються в лабораторії контролю якості.

Практичне значення. Результати досліджень можуть бути застосовані для ефективної стерилізації різних типів поживних середовищ у виробничих умовах, а окремі розділи роботи – під час вивчення окремих тем з навчальної дисципліни Мікробіологія і вірусологія, Санітарна мікробіологія та виробничий

(лабораторно-дослідницькій) практиці здобувачами вищої освіти біологічних спеціальностей.

Апробація роботи. Результати досліджень роботи обговорені на науковому семінарі кафедри біології та хімії, опубліковані у матеріалах V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (23-24 жовтня 2025 року, Рівне, Україна) [24].

Структура та обсяг роботи. Кваліфікаційна робота складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел і додатків. Загальний обсяг роботи складає 70 сторінок, містить 10 таблиць, 4 рисунки, 87 джерел використаної літератури, додатки.

Кваліфікаційна робота виконана на базі бактеріологічного відділу лабораторії контролю якості ДП «Фарматрейд» у рамках договору про наукову співпрацю з ДДПУ імені Івана Франка.

РОЗДІЛ 1. МЕТОДИ СТЕРИЛІЗАЦІЇ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ У ЛАБОРАТОРНІЙ ПРАКТИЦІ ТА ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ

1.1. Загальна характеристика методів стерилізації живильних середовищ

Стерилізація є важливим етапом у підготовці живильних середовищ для мікробіологічних досліджень. Вона спрямована на знищення всіх форм мікроорганізмів, включаючи бактерії, віруси, гриби та їх спори. Від якості стерилізації залежить достовірність отриманих результатів у лабораторній практиці та наукових експериментах [38].

Для виготовлення стерильної продукції потрібно дотримуватись особливих вимог для мінімізації ризиків мікробного забруднення. Персонал повинен мати відповідну кваліфікацію та досвід, пройти навчання та виконувати правила поведінки з особливою увагою до принципів захисту стерильної продукції під час процесу виробництва. Керування процесами, обладнанням, приміщеннями та виробничою діяльністю слід здійснювати згідно з принципами управління ризиками для якості, щоб гарантувати проактивні заходи виявлення, наукової оцінки та контролю можливих ризиків для якості [22].

Контроль забруднення та заходи, що застосовують для мінімізації ризику забруднення мікроорганізмами і частками, включають низку взаємопов'язаних заходів. В межах стратегії контролю контамінації важливо брати до уваги всі аспекти контролю забруднення з їхнім безперервним та періодичним моніторингом, що, в разі потреби, веде до покращення фармацевтичної системи якості [38].

Існують різноманітні методи стерилізації, наприклад, за допомогою мікрохвильової печі, описані у працях Сюзан Шарів, Пеймена Акрама Хамасаїда та Абдуліли Салеха Ісмаїла [66; 73]. Також ефективними та перевіреними є методики ультразвукової та хімічної стерилізації, висвітлені в статті Четана Крішнана (Університет Алабами в Бірмінгемі) та Віджая Джеякумара (Інженерний коледж Шрі Сівасубрамані) [65; 68]. Ультрафіолетове

(УФ) випромінювання окремо або в поєднанні з іншими методами обробки, зокрема використання органічних кислот чи дезінфікуючих розчинів, продемонструвало себе як перспективний підхід для підтримання мікробіологічної безпеки. Цей метод розглянуто у липні 2022 року авторами Ачютом Адхікарі (Університет Луїзіани) та Хуаном Мореїрою (Університет штату Колорадо) [64].

Найефективнішим способом стерилізації залишається стерилізація у парових стерилізаторах або установках для приготування поживних середовищ з герметичною кришкою. Залежно від фізико-хімічних властивостей середовищ, застосовують різні методи стерилізації: фізичний, механічний та хімічний. До фізичних методів стерилізації відносяться: термічний (наприклад, автоклавування та обробка кип'ятінням), повітряний (сухе гаряче повітря), нагрівання у воді (тиндалізація, пастеризація), променевий метод (інфрачервоне, ультрафіолетове, радіаційне, лазерне випромінювання), а також метод із застосуванням струмів високої частоти. У фармацевтичній практиці найчастіше використовують автоклавування – стерилізацію насиченою парою під тиском [60].

Тривалість процесу стерилізації залежить від фізико-хімічних характеристик ЖС, об'єму рідин і особливостей апаратури. Текуча пара з температурою 100 °C застосовується переважно для знищення вегетативних форм мікроорганізмів, проте у випадках наявності спор – метод неефективний.

Під час автоклавування використовується насичена пара під надлишковим тиском при температурі 110-132 °C. Цей метод забезпечує ефективне проникнення пари всередину пористих об'єктів без зміни властивостей речовин [41].

Сухожарова стерилізація здійснюється при температурі 180-200 °C у спеціальних шафах. Вона підходить для термостійких порошків (наприклад, натрій хлорид, оксид цинку, тальк), олій, ланоліну, вазеліну, а також для виробів із скла, металу, фарфору [6].

Тиндалізація – багатоступенева стерилізація з періодичним нагріванням при 60–80 °C упродовж кількох днів. Її застосовують для термолабільних речовин, які не витримують кип'ятіння. Між нагріваннями розчини зберігають при 25–37 °C, що дозволяє спорам прорости та бути знищеними при наступному нагріванні. Цей метод застосовується рідко.

Пастеризація – це одноразове нагрівання до 80 °C на 30 хвилин, яке дозволяє знищити вегетативні форми мікроорганізмів. Його використовують у разі присутності антисептиків, які пригнічують життєдіяльність мікробів і не дозволяють проростати спорам [10].

Контроль якості стерилізації здійснюється за допомогою термометрів, манометрів, хімічних та біологічних індикаторів (зміна кольору при досягненні певної температури), а також тестів на герметичність (перевірка швидкості підвищення тиску вручну, тест-пакет Бові-Дік). Завдяки використанню термолабільних матеріалів, актуальними стали методи холодної стерилізації: променевий (переважно в промисловості), механічний (бактеріальна фільтрація) та хімічний [24].

Механічне видалення мікроорганізмів досягається фільтрацією через глибинні, мембранні або скляні фільтри. Мембранні фільтри мають стабільні розміри пор і позбавлені недоліків глибинних фільтрів, таких як ризик забруднення фільтрату волокнами. Фільтрація проводиться в умовах асептики (зона чистоти А, під ламінаром). Хімічна стерилізація передбачає застосування бактерицидних газів (озон, оксид етилену) або розчинів антисептиків. Такі методи використовують лише згідно з вимогами нормативної документації [12].

Стерилізація у заводських умовах контролюється згідно з ДФУ та Європейською Фармакопеєю.

Вибір методу стерилізації живильних середовищ залежить від їх складу та термостабільності. Найбільш ефективним є автоклавування, тоді як для чутливих речовин застосовують фільтрацію або стерилізацію кип'ятінням. Хімічні методи використовуються рідко через можливі зміни в складі

середовища. Якісна стерилізація забезпечує точність мікробіологічних досліджень та безпечність медичних препаратів.

1.2. Автоклавування як вид стерилізації живильних середовищ

Автоклавування є одним із найефективніших методів стерилізації окремих живильних середовищ у мікробіологічній практиці. Цей процес базується на використанні насиченої водяної пари під підвищеним тиском, що уможливорює досягти температур вище 100°C , необхідних для знищення всіх форм мікроорганізмів, включаючи стійкі спори [10]. **Принцип роботи автоклава** полягає у тому, що температура кипіння води підвищується разом із ростом тиску. Наприклад, при звичайному атмосферному тиску (1 атм) вода кипить при $99,1^{\circ}\text{C}$, а при тиску в 2 атм – вже при $119,6^{\circ}\text{C}$. Якщо збільшити тиск на 1 атмосферу (98,0665 кПа) понад нормальний, вода починає кипіти при температурі $120\text{--}120,5^{\circ}\text{C}$. Пара, що утворюється в таких умовах, ефективно знищує мікроорганізми. Контроль за тиском у пристрої здійснюється за допомогою манометра [27].

Автоклави використовуються для стерилізації як поживних середовищ, так і лабораторного посуду та інструментів. Як правило, більшість середовищ для вирощування мікроорганізмів стерилізують при температурі 121°C протягом 15 хвилин за тиску в 1,1 атм на манометрі автоклава [13].

Основні вимоги до парового методу стерилізації: раціональне пакування (див. Додаток А) і укладання виробів для стерилізації; обов'язкове видалення повітря зі стерилізаційної камери перед проведенням стерилізації; дотримання усіх параметрів режиму стерилізації (температури, тиску, експозиції); забезпечення надійної герметичності стерилізаційної камери; справність КВП (електротермометрів, манометрів).

У мікробіологічній практиці автоклавну стерилізацію зазвичай проводять за температури від 111 до 138°C , що відповідає тиску від 0,5 до 2,5 атмосфер. Температура нижча за 111°C не вважається надійною для стерилізації, а перевищення 138°C зазвичай не є доцільним, оскільки високий тиск ускладнює

експлуатацію автоклава. Для апаратів без вакуумних насосів найбільш ефективними є режими: 15–45 хвилин при 121 °С (1 атмосфера) або 10–38 хвилин при 128 °С (1,5 атмосфери). Найчастіше у мікробіологічній практиці використовують режими з тиском 0,5 і 1,1 атмосфери [14].

Тривалість й температура автоклавування живильних середовищ залежить від їх складу та стійкості компонентів до високих температур. Такі речовини, як молоко, желатинові середовища, або продукти, що містять вітаміни та цукри (наприклад, пивне сусло, фруктові соки, дріжджовий автолізат), зазвичай стерилізують при 0,5-1,1 атмосфери протягом 15-30 хвилин. М'ясопептонні середовища можна автоклавувати при 1 атмосфері близько 20 хвилин. Деякі речовини (наприклад, гліцерин, вазелінове масло) погано прогрівуються через низьку теплопровідність, тому їх краще стерилізувати в сушильних шафах за температури 160 °С протягом 2 годин або при 170 °С протягом 1 години. Важливо, щоб шар речовини не перевищував 1,5 см [34].

Водневий показник середовища також слід враховувати при виборі режиму стерилізації. При кислій реакції можливий гідроліз деяких компонентів, що посилюється при високих температурах і тривалому нагріванні. Унаслідок цього середовища з желатином або агаром можуть втратити здатність застигати. При лужному рН можлива поява осаду солей феруму, карамелізація цукрів, що робить середовище непридатним. Під час стерилізації рН деяких середовищ може змінюватися – наприклад, у присутності ксилози може спостерігатися їх закислення з рН 7 до рН 6. Щоб запобігти цим змінам, рекомендується стерилізувати окремо у дистильованій воді такі компоненти, як вуглеводи, фосфати, солі заліза, в концентрованому вигляді та при оптимальному рН. Після стерилізації компоненти змішують у стерильних умовах. Такий метод роздільної стерилізації широко використовується в мікробіологічній практиці, оскільки уможливорює застосовувати уніфіковані режими для багатьох інгредієнтів [16].

Об'єм стерилізованого матеріалу також впливає на вибір режиму: чим

більший об'єм, тим більше часу потрібно для досягнення належного ефекту за однакової температури та тиску. До того ж, важливе значення має товщина стінок і форма ємностей. До переваг автоклавування відносять: універсальність (підходить для більшості живильних середовищ, за винятком тих, що містять термолабільні компоненти); надійність (забезпечує повне знищення як вегетативних форм мікроорганізмів, так і їх спор); економічність (не потребує використання хімічних реагентів, що знижує вартість процесу та ризик хімічного забруднення). До недоліків автоклавування відносять: здатність деєструктуризувати деякі речовини (такі як деякі вітаміни, антибіотики або білки, які можуть денатуруватися при високих температурах), у таких випадках доцільно використовувати альтернативні методи стерилізації, наприклад, фільтрацію та/або кип'ятіння [15].

Перед автоклавуванням живильні середовища розливають у відповідний лабораторний посуд. Стерильний посуд зберігають та використовують згідно терміну зберігання стерильності (див. Додаток Б). Ємності з живильним середовищем закривають ватно-марлевими пробками або гумовими корками з алюмінієвими (в залежності від виду середовища). Після завершення процесу стерилізації важливо дотримуватися правил асептики при роботі з простерилізованими середовищами, щоб запобігти їх повторному контамінуванню. Загалом, автоклавування є незамінним методом стерилізації в мікробіологічній практиці, яке забезпечує високу ефективність та надійність при підготовці живильних середовищ для культивування мікроорганізмів [48].

1.3. Особливості мембранної стерилізації живильних середовищ

Мікрофільтрація – це метод очищення рідин (або газів) за допомогою спеціальних мембранних фільтрів з дуже малими порами. Їх використовують, щоб відокремити дрібні частинки з рідини або зібрати мікроорганізми для подальшого вивчення. Частинки, які більші за розмір пор, затримуються на поверхні фільтра [46].

Фільтри виробляють зі спеціальних матеріалів, вони бувають

різноманітних діаметрів та з різними розмірами пор. Вони відіграють важливу роль для мікробіологічного контролю якості виробів харчової, фармацевтичної та косметичної промисловості. Мембранна стерилізація є ключовим методом обробки живильних середовищ, що містять термолабільні компоненти, такі як білки, вітаміни, антибіотики та інші біологічно активні речовини. Цей метод уможливорює збереження біологічної активності та структури чутливих до високих температур речовин, забезпечуючи при цьому ефективне видалення мікроорганізмів [34].

Фільтрація полягає у проходженні розчину через пористий шар, який утримує небажані частинки, дозволяючи при цьому рідині проходити далі. Мембрани видаляють домішки із зразків, які можуть впливати на критично важливі біологічні та хімічні показники, подальший аналіз та ефективність тестів. Оскільки домішки можуть бути йонними, молекулярними або у вигляді частинок, правильний вибір фільтра може суттєво вплинути на вихід, відтворюваність результатів і якість фільтрату.

Для мембранної стерилізації поживних середовищ використовують фільтри з певним розміром пор, які ефективно видаляють мікроорганізми без нагрівання [44]. Для стерилізації рідких живильних середовищ застосовують мембранну фільтрацію з використанням стерильних мембранних фільтрів із різноманітних матеріалів. Вибір матеріалу мембрани ґрунтується на необхідності забезпечення ефективної стерилізації, сумісності з компонентами середовища та мінімізації небажаних взаємодій, таких як адсорбція білків. Основні характеристики використовуваних матеріалів мембранних фільтрів є наступні (див. Додаток Д): мембранні фільтри з **нітроцелюлози (CN)** характеризуються високою гідрофільністю та швидкістю фільтрації. Однак, їхнє значне зв'язування білків та низька хімічна та термічна стійкість обмежують їх застосування у випадках, коли необхідно зберегти білкові компоненти середовища або проводити фільтрацію агресивних розчинів; фільтри з **полівініліденфториду (PVDF)** є універсальними, оскільки можуть використовуватися як для водних, так і для органічних розчинів. Вони

демонструють слабе зв'язування білків, стійкість до широкого спектру хімічних речовин та витримують нагрівання, що робить їх придатними для стерилізації різноманітних середовищ; мембрани з **поліетерсульфону (PES)** відзначаються високою гідрофільністю, швидкістю фільтрації та дуже низьким рівнем зв'язування білків, що є особливо важливим при стерилізації біологічних розчинів та культуральних середовищ. Їхня стійкість до багатьох хімічних речовин та висока термостійкість роблять їх оптимальним вибором для фільтрації середовищ та буферних розчинів; фільтри з **нейлону (Nylon)** також мають високу гідрофільність та швидкість фільтрації, проте демонструють середній рівень зв'язування білків. Їхня стійкість до деяких органічних розчинників та лугів, а також здатність витримувати нагрівання, розширюють спектр їхнього застосування; гідрофобні мембранні фільтри з **поліетертетрафторетилену (PTFE)** характеризуються винятковою хімічною стійкістю до практично всіх реагентів та високою термостійкістю. Слабе зв'язування білків робить їх придатними для фільтрації розчинників, корозійних розчинів та газів. Для фільтрації водних розчинів потрібна їх попередня обробка для забезпечення змочування; мембрани зі **змішаних ефірів целюлози (MCE)** є гідрофільними, мають високу швидкість фільтрації та пористість. Їхнє середнє зв'язування білків та здатність витримувати автоклавування роблять їх широко використовуваними в мікробіологічному аналізі для стерилізації водних розчинів та утримання мікроорганізмів [25].

У ЛКЯ ДП «Фарматрейд» для мембранної фільтрації використовують фільтри розміром пор 0,22 і 0,45 мкм (див. Додаток Г).

Метод мембранної фільтрації має низку суттєвих переваг, особливо у разі стерилізації чутливих до температур речовин. Перевагами методу є: стерилізація термолабільних речовин – ідеальний для речовин, які руйнуються при нагріванні (вітаміни, гормони, антибіотики, білки, сироватки), не змінює фізико-хімічних властивостей розчину, на відміну від автоклавування; висока ефективність – пори фільтра ефективно затримують бактерії та грибки, забезпечують повну стерильність без впливу на хімічний склад середовища;

економія часу – особливо помітна при фільтрації малих об'ємів, а також не вимагає спеціального обладнання, окрім фільтра і шприца або насосної системи; можливість стерилізації перед додаванням до автоклавованих середовищ. Зокрема, антибіотики або індикатори можна профільтрувати окремо, а потім додати до вже стерильного охолодженого середовища.

Недоліками методу є [25]: неможливість фільтрації мутних або в'язких середовищ: якщо середовище містить великі частинки, осад або є в'язким – фільтрація неможлива; висока вартість фільтрів: одноразові стерильні фільтри – недешеві, і при частому використанні витрати ростуть; потреба в повній стерильності всього процесу: усі елементи системи фільтрації повинні бути попередньо простерилізовані, щоб уникнути контамінації; метод вимагає максимальної уваги до стерильності рук, поверхонь і посуду; механічні пошкодження або порушення фільтра: якщо фільтр пошкоджений або неправильно встановлений – стерильність не буде досягнута; потрібно працювати акуратно і з якісними фільтрами.

Практичні аспекти застосування. Перед початком фільтрації живильне середовище необхідно належним чином підготувати: розчинити всі компоненти та провести попередню фільтрацію через фільтри для видалення крупних часток, що можуть забивати мембрану. Мембранну стерилізацію проводять у стерильних умовах, під ламінаром. Використовують фільтраційну установку або фільтротримач із колбою Бунзена. Стерильним пінцетом (додатково профламбованим) поміщають мембранний фільтр на столик фільтротримача. Під'єднують шланг вакуумного насосу через перехідник до колби Бунзена/фільтраційної установки. У лійку з фільтром вливають рідке живильне середовище, фільтрують та переливають у стерильні флакони. Закупорюють та передають через передаточний шлюз з обдувом (шлюз 9/7).

Отож, мембранна стерилізація є незамінним методом обробки живильних середовищ з термолабільними компонентами, забезпечуючи їхню стерильність без впливу високих температур. Дотримання технологічних вимог та асептичних умов під час фільтрації гарантує отримання якісних та безпечних

середовищ для мікробіологічних досліджень [39].

РОЗДІЛ 2. ТИПИ ЖИВИЛЬНИХ СЕРЕДОВИЩ, ОСОБЛИВОСТІ ЇХ СКЛАДУ ТА ПРИЗНАЧЕННЯ

2.1. Класифікація живильних середовищ, їх різноманітність

Живильне середовище (*англ. culture medium*) – суміш речовин у рідкому, напівтвердому або твердому стані, в яку входять природні і/або синтетичні інгредієнти, призначені для підтримання розмноження (з пригніченням росту певних мікроорганізмів або без нього), ідентифікації або збереження життєздатності мікроорганізмів [9].

У лабораторній практиці мікроорганізми культивують на спеціальних живильних середовищах, які мають містити всі необхідні для їхнього розвитку речовини. Оскільки синтетичні та енергетичні процеси у різних мікроорганізмів значно варіюються, відрізняються й їхні потреби в поживних речовинах. Універсального середовища, що підходило б для культивування всіх мікроорганізмів без винятку, не існує. На сьогодні описано велику кількість поживних середовищ – ще у 1930 році їх було описано понад дві тисячі. Проте набір основних інгредієнтів, що становлять їх основу, є досить обмеженим [4].

Ключовими складовими будь-якого середовища для вирощування мікроорганізмів є джерела вуглецю та азоту, оскільки саме вони визначають тип і властивості середовища. Зокрема, автотрофні мікроорганізми здатні використовувати вуглекислий газ як єдине джерело вуглецю, тому до середовищ додають натрій гідрокарбонат або пропускають повітря, збагачене вуглекислим газом. Гетеротрофні види споживають різноманітні органічні речовини, що містять вуглець, такі як кислоти, спирти, вуглеводи та ароматичні сполуки. Щодо потреб в нітрогені, мікроорганізми його отримують із азотовмісних сполук із різними ступенями окиснення – це можуть бути амонійні солі, нітрати, амінокислоти, молекулярний азот, а в окремих випадках білки або пептони. Для нормального росту багатьох мікроорганізмів необхідна присутність факторів росту – вітамінів, амінокислот, пуринів і піримідинів. Їх додають до середовища як у вигляді очищених сполук, так і у формі екстрактів,

наприклад, дріжджового або кукурудзяного. Окрім джерел карбону, нітрогену та факторів росту, для синтезу клітинних речовин мікроорганізмам необхідні також сульфур, фосфор та інші хімічні елементи, включаючи мікроелементи. Всі ці речовини мають бути присутні в живильному середовищі у формах, доступних для засвоєння мікроорганізмами. Завершальним етапом приготування живильного середовища є регулювання рН розчину до оптимального значення [16].

Для виживання мікроорганізми повинні отримувати всі свої клітинні складові з навколишнього середовища. Це середовище може варіюватися від простого сольового розчину до складної комбінації численних компонентів. Як правило, хімічно визначене поживне середовище може містити: джерело енергії у вигляді вуглеводів, зазвичай глюкози; джерело аміноазоту у вигляді пептонів, інших гідролізатів білків або екстрактів, які забезпечують карбон, нітроген та енергію; фактори росту, зокрема кров, сироватка, вітаміни – необхідні для росту вимогливих мікроорганізмів; метали та мінеральні солі, такі як кальцій, магній, залізо (Fe^{3+}), марганець (Mn^{3+}), мікроелементи, фосфати та сульфати, що додаються в макро- або мікрокількостях; буфери (бікарбонатні, органічні, фосфатні), які підтримують стабільний рН під час ферментації; індикаторні барвники (наприклад, бромкрезол-пурпуровий, нейтральний червоний, феноловий червоний), які сигналізують про зміну рН середовища під час росту мікроорганізмів. Їх концентрація має бути контрольованою, адже вони можуть бути токсичними; селективні агенти, зокрема антибіотики, хімічні речовини (бісмут-сульфіт, цетримід, хлорид літію, телурит калію, селеніт натрію, тетратіонат), інгібуючі барвники (акрифлавін, кристалічний фіолетовий, яскраво-зелений) – пригнічують ріст небажаних мікроорганізмів і стимулюють ріст цільових. Їх концентрація також критична; гелеутворювач, зазвичай агар – забезпечує утворення твердого інертного гелю, на якому мікроорганізми ростуть у вигляді окремих колоній. У методі «наливу в чашку» (англ. *pour plate*) розплавлений агар утримує мікроорганізми в матриці до моменту застигання.

Ріст мікроорганізмів також залежить від потреби в кисні: аеробні організми (зокрема, *Pseudomonas*) ростуть при позитивному редокс-потенціалі; анаероби – лише при низькому редокс-потенціалі (наприклад, *Clostridia*); факультативні анаероби – в широкому діапазоні від +150 мВ до –600 мВ (зокрема, *Enterobacteriaceae*) [20].

Розуміння класифікації та різноманітності живильних середовищ є ключовим для правильного вибору методів культивування та дослідження мікроорганізмів у лабораторній практиці. Живильні середовища, що застосовуються в мікробіологічних дослідженнях, класифікують за кількома ознаками: за походженням, консистенцією та функціональним призначенням [5]. Залежно від консистенції поживні середовища поділяють на рідкі, сипкі та тверді: рідкі середовища використовують для накопичення клітинної маси або продуктів метаболізму, а також для підтримки та зберігання культур, що погано ростуть на щільних середовищах; сипкі середовища знаходять застосування у промисловій мікробіології – наприклад, для вирощування грибів або продуцентів біологічно активних речовин. До таких середовищ належать субстрати на основі зернових – пшениця, жито, ячмінь, пшоно, висівки; тверді середовища слугують для виділення чистих культур, діагностики, вивчення морфології колоній, підрахунку мікроорганізмів, оцінки їх активності та тривалого зберігання. Щоб надати середовищу твердої форми, до нього додають агар або желатин [11].

До **натуральних середовищ** відносять ті, що виготовлені з продуктів тваринного або рослинного походження й мають складний хімічний склад. Це можуть бути соки з овочів або фруктів, м'ясо, кров, молоко, різноманітні відвари та екстракти, отримані з м'яса, риби, ґрунту, гною або овочів. Вони широко застосовуються для зберігання мікробних культур, нарощування біомаси та в діагностичних цілях. Серед найбільш поширених натуральних середовищ у лабораторній практиці – м'ясо-пептонний бульйон та неохмелене пивне сусло [5].

Синтетичні поживні середовища – це середовища, склад яких

визначений точно за хімічною формулою та кількістю компонентів. Їх широко застосовують у вивченні обміну речовин мікроорганізмів. Існує велика кількість варіантів складу таких середовищ, які підходять для культивування різних видів мікроорганізмів [29].

Окрім природних та синтетичних, існують також **напівсинтетичні середовища**. У їх основі лежать синтетичні компоненти, до яких додають невелику кількість речовин із невизначеним складом – таких як пептон (джерело нітрогену), автолізат дріжджів (містить вітаміни групи В та азотисті основи), або гідролізат казеїну (джерело амінокислот). Такі середовища мають широке застосування в мікробіологічному виробництві, зокрема для синтезу вітамінів, антибіотиків і амінокислот [17].

Селективні середовища призначені для вибіркового росту певних груп мікроорганізмів, що мають подібні фізіологічні потреби. Вони дозволяють ізолювати специфічні види з природного середовища без обов'язкової стерилізації. Так, для виділення стафілококів використовують жовчно-сольовий агар чи телуритові середовища, а для сальмонел – агар Мюллера, або селенітове середовище [29].

Диференційно-діагностичні середовища застосовуються для швидкої ідентифікації видів мікроорганізмів або виявлення окремих їх властивостей. Наприклад, середовище Ендо використовується для визначення бактерій кишкової групи, а агар Сабуро – для виявлення дріжджоподібних грибів, зокрема роду *Candida* [18].

У ЛКЯ ДП Фарматрейд використовують рідкі, тверді та напівтверді середовища. Кожне середовище має специфічний склад, що забезпечує оптимальні умови для росту певних груп мікроорганізмів або дозволяє диференціювати їх за певними біохімічними ознаками. Нижче представлено детальний опис складу та функціонального призначення живильних середовищ.

Поживний агар є середовищем загального призначення, яке використовується для вирощування широкого спектра мікроорганізмів. Це середовище прописано в багатьох стандартних методиках для дослідження

харчових продуктів, молочних продуктів, води та інших матеріалів. Після стерилізації значення рН дорівнює $6,8 \pm 0,2$ при 25°C . Поживний агар має в складі пептон (5,0 г), м'ясний екстракт (1,0 г), дріжджовий екстракт (2,0 г), натрію хлорид (5,0 г), агар (15,0 г). Пептон і м'ясний екстракт є джерелами амінокислот, азоту, вуглецю, вітамінів і мінералів, необхідних для росту мікроорганізмів. Екстракт дріжджів постачає вітаміни, особливо групи В. Хлорид натрію забезпечує осмотичну рівновагу середовища. Агар виконує роль загусника. Зовнішній вигляд зневодненого середовища: сипкий, однорідний порошок бежевого кольору. Зовнішній вигляд готового середовища: злегка опалесцюючий, світло-бурштиновий розчин після автоклавування та охолодження [6].

Сабуро-декстрозний агар застосовується для виділення та культивування дріжджів і плісневих грибів, особливо з клінічних, харчових і фармацевтичних зразків. Високий вміст декстрази та кисле значення рН (близько 5,6) сприяють росту грибів та пригнічують більшість бактерій. Кінцеве значення рН дорівнює $5,6 \pm 0,2$ при 25°C . Складається з декстрази (40,0 г), суміші пептичного гідролізату тваринних тканин та панкреатичного гідролізату казеїну (1:1, 10,0 г), агару (15,0 г). Пептони є джерелом амінокислот, нітрогену, карбону, вітамінів і мінеральних речовин, необхідних для росту мікроорганізмів; декстроза (глюкоза) слугує джерелом енергії та вуглецю; агар виконує роль загусника. Висока концентрація декстрази та кислотне значення рН середовища забезпечують селективність для грибів за рахунок пригнічення росту бактеріальної мікрофлори. Зовнішній вигляд зневодненого середовища: сипкий, однорідний порошок світло-бежевого кольору. Зовнішній вигляд готового середовища після автоклавування: злегка опалесцюючий, світло-бурштиновий розчин.

Триптон-соєвий агар – це неселективне середовище для ізоляції, що використовується для вирощування бактерій, які не мають специфічних потреб, а також для підготовки референтних штамів з метою проведення тестів на стимуляцію росту на живильних середовищах. Дегідратоване середовище:

сипуче, однорідне, від світло-бежевого до жовтуватого. Приготовлене середовище: прозоре, світло-бурштинове. Після стерилізації значення рН $7,3 \pm 0,2$ при 25°C . Має в складі пептон казеїновий (15,0 г), пептон соєвий (5,0 г), натрію хлорид (5,0 г), агар (15,0 г). Казеїновий та соєвий пептони забезпечують організми амінокислотами, джерелом азоту, вуглецю, вітамінами та мінералами, необхідними для росту; хлорид натрію підтримує осмотичну рівновагу середовища; агар є агентом для застигання середовища. Середовище може бути додатково збагачене кров'ю для культивування вимогливих до поживних речовин мікроорганізмів та вивчення гемолітичних реакцій [51].

Агар Мак-Конки – це диференційно-діагностичне середовище, яке підтримує ріст лише грамнегативних бактерій. Воно також дозволяє диференціювати грамнегативні організми за здатністю ферментувати лактозу. Зовнішній вигляд зневодненого середовища: сипкий, однорідний, бежево-рожевий. Зовнішній вигляд готового середовища: злегка опалесцюючий, насичено-червоний. Після стерилізації значення рН дорівнює $7,1 \pm 0,2$ при 25°C . У складі має панкреатичний гідролізат желатину (17,0 г), пептони (м'ясний та казеїновий) (3,0 г), лактози моногідрат (10,0 г), натрію хлорид (8,0 г), солі жовчних кислот (1,5 г), агар (13,5 г), нейтральний червоний (30,0 г), кристалічний фіолетовий (1 мл). Панкреатичний гідролізат желатину та пептон із м'яса та казеїну забезпечують середовище амінокислотами, вітамінами та мінералами, які необхідні для росту мікроорганізмів; лактоза є ферментованим вуглеводом; хлорид натрію підтримує осмотичну рівновагу середовища; жовчні солі та кристалічний фіолетовий – селективні агенти, які пригнічують ріст грампозитивних організмів, дозволяючи рости грамнегативним бактеріям; агар виступає як тверда основа середовища; нейтральний червоний є індикатором рН. Ферментація лактози призводить до утворення органічних кислот, зокрема молочної кислоти, що знижує рН агару. Лактозопозитивні грамнегативні бактерії утворюють рожеві колонії, а лактозонегативні – непрозорі, білуваті колонії.

Ендо агар використовується для підтвердження наявності коліформних

організмів. Коліформи, які ферментують лактозу (наприклад, *E. coli*), утворюють темно-червоні колонії, які забарвлюють навколишнє середовище та мають золотистий металічний блиск. Нелактозоферментуючі бактерії формують безбарвні прозорі колонії на фоні рожевого до безбарвного середовища. Сухе середовище: сипуче, однорідне, має світло-фіолетовий колір. Приготоване середовище набуває рожевого кольору. Після автоклавування $\text{pH} = 7,5 \pm 0,2$ при 25°C . Ендо агар має такий склад: пептон (10,0 г), лактоза (10,0 г), двозамісний фосфат калію (3,5 г), агар (15,0 г), сульфід натрію (2,5 г), основний фуксин (0,5 г). Пептон є джерелом амінокислот, нітрогену, карбону, вітамінів та мінералів, необхідних для росту бактерій; лактоза є джерелом вуглеводів; двозамісний фосфат калію – буферна система, яка стабілізує pH середовища під час росту бактерій; агар – солідуючий агент, забезпечує щільну поверхню для росту колоній; сульфід натрію реагує з основним фуксином для створення безбарвного комплексу (лейкофуксину): у присутності кислот (які виділяються при ферментації лактози) комплекс розпадається $\rightarrow$ фуксин вивільняється і забарвлює колонії в темно-червоний колір.

Агар з глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтральним червоним – це селективне середовище, що використовується для виявлення та підрахунку жовчностійких грамнегативних бактерій у зразках харчових продуктів, води та інших об'єктів санітарного контролю. Сприяє виявленню ентеробактерій та інших жовчностійких грамнегативних мікроорганізмів.

Зневоднене середовище: сипкий, однорідний порошок від бежевого до червонувато-бежевого кольору. Готове середовище: злегка опалесцююче, червоного кольору. Після автоклавування значення pH дорівнює $7,4 \pm 0,2$ при 25°C . У складі має: дріжджовий екстракт (3,0 г), панкреатичний гідролізат желатину (7,0 г), солі жовчних кислот (1,5 г), натрію хлорид (5,0 г), глюкози моногідрат (10,0 г), агар (15,0 г), нейтральний червоний (30 мг), кристалічний фіолетовий (2 мг). Панкреатичний гідролізат желатину забезпечує середовище амінокислотами, вітамінами та мінералами, які необхідні для росту мікроорганізмів; екстракт дріжджів є джерелом вітамінів, зокрема вітамінів

групи В; глюкоза слугує ферментованим джерелом вуглеводів; хлорид натрію підтримує осмотичну рівновагу середовища; жовчні солі та кристалічний фіолетовий є селективними агентами, ефективними проти грампозитивних коків; нейтральний червоний – це індикатор рН; агар виконує роль твердого агента [51].

Манітно-сольовий агар – це середовище для селективної ізоляції стафілококів, яке також дозволяє диференціювати манітолоферментуючі та неманітолоферментуючі стафілококи. Застосовується для виявлення *S. aureus* у нестерильних фармацевтичних продуктах. Зовнішній вигляд зневодненого середовища: сипкий, однорідний, бежево-рожевий. Зовнішній вигляд готового середовища: злегка опалесцюючий, рожево-червоний. Після стерилізації рН сягає $7,4 \pm 0,2$ при 25°C . У складі має панкреатичний гідролізат казеїну (5,0 г), пептичний гідролізат тваринних тканин (5,0 г), яловичий екстракт (1,0 г), D-маніт (10,0 г), натрію хлорид (75,0 г), агар (15,0 г), феноловий червоний (0,025 г). Панкреатичний гідролізат казеїну, пептичний гідролізат тваринних тканин та екстракт яловичини забезпечують середовище амінокислотами, вітамінами та мінералами, які необхідні для росту мікроорганізмів; манітол є ферментованим вуглеводом; високий вміст солі (7,5%) пригнічує більшість бактерій, за винятком стафілококів; феноловий червоний є індикатором рН; агар виступає як тверда основа середовища.

Цетримідний агар – є селективним середовищем для виділення та ідентифікації *Pseudomonas aeruginosa* зі зразків різного походження, таких як клінічні зразки та фармацевтичні продукти. Виявлення бактерій на цьому середовищі ґрунтується на посиленому виробленні ряду водорозчинних хелаторів заліза, включаючи піоціанін та піовердин. Зовнішній вигляд зневодненого середовища: сипкий, однорідний, світло-бежевий. Зовнішній вигляд готового середовища: злегка опалесцюючий, світло-янтарний з осадом. Після стерилізації значення рН стає $7,2 \pm 0,2$ при 25°C [6]. Містить панкреатичний гідролізат желатину (20,0 г), магнію хлорид (1,4 г), дикалію сульфат (10,0 г), цетримід (0,3 г), агар (13,6 г), гліцерин (10,0 мл).

Панкреатичний гідролізат желатину є джерелом амінокислот, вітамінів та мінералів, які необхідні для росту мікроорганізмів; хлорид магнію та сульфат калію стимулюють утворення водорозчинних пігментів, зокрема піовердину (флуоресцеїну) та піоціаніну, які в комбінації утворюють яскраво-зелений колір, характерний для *Pseudomonas aeruginosa*; цетримід (цетилтриметиламоній бромід) є селективним агентом з бактерицидною активністю проти широкого спектра грампозитивних організмів і деяких грамнегативних бактерій; агар виступає як згущувач середовища; гліцерин є джерелом вуглецю [12].

Триптон-соєвий бульйон – це поживне середовище, яке використовується для виявлення, ізоляції та культивування вимогливих і невимогливих мікроорганізмів, включаючи бактерії та гриби з клінічних зразків, об'єктів навколишнього середовища та інших матеріалів. Сухе середовище: сипке, однорідне, світло-бежевого кольору. Готове середовище: прозоре або злегка опалесцююче, світло-бурштинове до бурштинового кольору. Після стерилізації рН сягає $7,3 \pm 0,2$ при 25°C . Містить панкреатичний гідролізат казеїну (17,0 г), папаїновий гідролізат соєвих бобів (3,0 г), натрію хлорид (5,0 г), дикалій гідроген фосфат (2,5 г), глюкоза моногідрат (2,5 г). Панкреатичний гідролізат казеїну та папаїновий гідролізат соєвих бобів забезпечують середовище амінокислотами, вітамінами та мінералами, які необхідні для росту мікроорганізмів; хлорид натрію підтримує осмотичну рівновагу в середовищі; дифосфат калію виконує функцію буферної речовини; глюкоза є джерелом енергії [6].

Рідке тіогліколеве середовище – це універсальне рідке збагачувальне середовище, яке застосовується для контролю стерильності фармацевтичної продукції, вирощування та ізоляції вибагливих анаеробних і аеробних мікроорганізмів. Зовнішній вигляд зневодненого середовища: сипкий, однорідний порошок світло-бежевого кольору. Зовнішній вигляд готового середовища: злегка опалесцюючий, світло-бурштиновий розчин (до 20% верхнього шару може бути рожевим). Після стерилізації значення рН дорівнює

$7,1 \pm 0,2$ при 25°C . Тіогліколеве середовище включає наступні компоненти: L-Цистин (0,5 г), агар (0,75 г), натрію хлорид (2,5 г), глюкоза моногідрат/безводна (5,5 г/5,0 г), дріжджовий екстракт (водорозчинний) (5,0 г), панкреатичний гідролізат казеїну (15,0 г), натрію тіогліколят або кислота тіогліколева (0,5 г/0,3 г), розчин резазурину натрію (розчин 1 г/л резазурину натрію) свіжоприготований (1,0 мл). Панкреатичний гідролізат казеїну є джерелом амінокислот, вітамінів та мінералів, які необхідні для росту мікроорганізмів; екстракт дріжджів є джерелом вітамінів, особливо вітамінів групи В; глюкоза слугує джерелом енергії; хлорид натрію підтримує осмотичний баланс середовища; тіогліколят натрію та L-цистин додають для зниження окисно-відновного потенціалу середовища за допомогою видалення кисню для підтримки низького значення E_h (редокс-потенціал). Резазурин є індикатором окисно-відновних процесів, він має рожевий колір в окисленому стані. Невелика кількість агару допомагає підтримувати низький редокс-потенціал, стабілізуючи середовище проти конвекційних потоків, тим самим забезпечуючи анаеробні умови в нижніх шарах середовища. Таким чином створюється градієнт кисню: аероби ростуть у верхньому шарі середовища, мікроаерофіли – у середній частині середовища, факультативні анаероби – по всій товщі, анаероби – лише у нижніх шарах [30].

Нагромаджувальний бульйон Мозеля – це селективне рідке поживне середовище, яке призначене для накопичення (збагачення) ентеробактерій (зокрема, родина Enterobacteriaceae) перед подальшим висівом на селективно-діагностичні середовища. ЕЕ-бульйон Мозеля широко використовується у харчовій, клінічній та фармацевтичній мікробіології для виявлення бактерій навіть за їх низької концентрації в аналізованому матеріалі. Дегідратоване середовище: сипуче, однорідне, від світло-бежевого до світло-зеленого. Приготовлене середовище: прозоре, смарагдово-зелене. Після стерилізації значення рН: $7,2 \pm 0,2$ при 25°C . Середовище складається з панкреатичного гідролізату желатину (10,0 г), глюкози моногідрат (5,0 г), бичачої жовчі зневодненої (20,0 г), калію дигідрофосфат (2,0 г), динатрію гідрофосфат

дигідрату (8,0 г), діамантового зеленого (15 мг). Панкреатичний гідролізат желатину забезпечує амінокислотами, вітамінами та мінералами для росту; глюкоза сприяє зростанню всіх ентеробактерій; жовч та діамантовий зелений є селективними агентами, ефективними проти небажаної супутньої грампозитивної мікробіоти; фосфат калію та фосфат натрію діють як буфер: велика буферна здатність середовища допомагає підтримувати стабільний рН для кращих умов росту ентеробактерій.

Бульйон Мак-Конки – це селективно-диференційне рідке середовище, яке використовують для попереднього відбору та якісної оцінки коліформних бактерій, (зокрема *Escherichia coli*) у контрольованих зразках води, фармацевтичних препаратів та інших зразків. Зовнішній вигляд зневодненого середовища: сипкий, однорідний порошок світло-бежевого кольору. Зовнішній вигляд готового середовища: прозоре, фіолетового кольору. Після стерилізації значення рН дорівнює $7,4 \pm 0,2$ при 25°C . Середовище містить панкреатичний гідролізат желатину (20,0 г), лактози моногідрат (10,0 г), бичача жовч зневоднена (5,0 г), бромкрезоловий пурпуровий (10 мг). Пептон є джерелом амінокислот і ростових факторів, які необхідні для росту мікроорганізмів. Лактоза ферментується коліформами, з утворенням кислоти (зміна кольору середовища) і газу; хлорид натрію підтримує осмотичну рівновагу середовища; жовчні солі пригнічують ріст грампозитивних бактерій; бромкрезол пурпурний використовується як рН-індикатор: зміна кольору з фіолетового на жовтий при зниженні рН, що відображає лактозну ферментацію.

Гісса з глюкозою – це диференційно-діагностичне поживне середовище, яке використовується для визначення здатності мікроорганізмів до ферментації вуглеводів, зокрема глюкози. Середовище застосовують для визначення здатності бактерій до ферментації глюкози з утворенням кислоти та/або газу; диференціації бактерій, переважно ентеробактерій (родина Enterobacteriaceae); у деяких випадках використовують для первинної ідентифікації умовно-патогенних мікрорганізмів. Колір порошку: світло-жовтий. Зовнішній вигляд готового середовища: прозоре, фіолетового кольору. Після стерилізації

значення рН дорівнює $8,2 \pm 0,2$ при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Принцип дії середовища Гісса з глюкозою базується на здатності мікроорганізмів ферментувати глюкозу з утворенням органічних кислот та, у деяких випадках, газу. Утворення кислот призводить до зниження рН середовища, що супроводжується зміною забарвлення індикатора з рожево-фіолетового на жовтий, також може відбутися утворення бульбашок газу в глибині або на поверхні середовища. Газ, що утворюється при бродінні, накопичується у трубці Дюргема, вміщеній у пробірку. Якщо колір середовища не змінюється, то реакція вважається негативною [6]. Середовище містить глюкозу (3,78 г), пептон ферментативний (3,7 г), агар (2,5 г), натрій хлорид (3,0 г), натрій гідрофосфат (0,5 г), бромкрезоловий пурпурний (0,02 г). Глюкоза служить джерелом енергії для бактерій; пептон є джерелом амінокислот та вітамінів, забезпечує базову поживність середовища; агар надає середовищу напіврідкої консистенції, полегшує візуалізацію газоутворення в трубці Дюргема, зменшує розтікання колоній та рух бактерій; натрій хлорид підтримує осмотичний баланс для росту клітин; натрій гідрофосфат виконує функцію буферного агенту, підтримуючи стабільний рН середовища при зміні кислотності, яка може негативно вплинути на ріст мікроорганізмів та чіткість індикаторної реакції; бромкрезоловий пурпурний є індикатором середовища [16].

2.2. Умови підготовки та контроль ефективності стерильності живильних середовищ

Підготовка живильних середовищ та контроль їх стерильності є критично важливими етапами в мікробіологічних дослідженнях, оскільки навіть незначна контамінація може спотворити результати. При отриманні живильних середовищ, лаборант перевіряє: наявність супровідної документації та її зміст, цілісність пакування, відповідність маркування, термін придатності. Після отримання середовищ лаборант реєструє дату отримання, найменування середовища і код партії, дату закінчення терміну придатності. Кожен контейнер із середовищем маркують етикеткою, на якому вказують усю перелічену вище

інформацію, а також номер, який відповідає номеру в переліку, що знаходиться на дверцятах шафи, де зберігають середовища [32]. При зберіганні дотримуються інструкцій виробника, де є дані про умови зберігання та термін придатності. При відкритті нового контейнера перевіряють його герметичність, записують дату першого відкриття і візуально оцінюють вміст. Колір та консистенція повинні бути типовими для даного продукту і відповідати опису виробника. На якість середовища може вплинути навколишнє середовище: втрата якості сухих (зневоднених) середовищ проявляється в зміні плинності порошку, гомогенності, виникнення грудок, зміні кольору і т. д.; будь-яке сухе середовище, яке стало вологим або проявляє очевидні зміни фізичних властивостей, не використовувати; до використання або перед нагріванням рекомендується доводити середовища до температури навколишнього середовища.

Згідно з інструкцією виробника зважують за допомогою ваги визначену кількість сухого середовища, необхідного для приготування конкретної серії живильного середовища.

Сухі середовища потребують швидкої дисперсії шляхом постійного перемішування з нагріванням. Середовища, що містять агар, потрібно дати кілька хвилин для вбирання води з перемішуванням до нагрівання [46]. Для середовищ, що готуються з окремих компонентів, кожен компонент додають окремо і повністю розчиняють, а тоді додають до загального об'єму. Середовище вважають розчинним, якщо в розчині при візуальному огляді не виявляють частинки компонентів [26]. рН середовища вимірюють перед стерилізацією та після неї. Після завершення приготування живильного середовища відібрати приблизно 15 мл у чистий скляний стакан і дати йому охолонути до температури +25 °С. Температуру перевірити за допомогою термометра. Визначити показник рН за допомогою рН-метра РНТ 004ТА (див. Додаток Д). Отримане значення рН зафіксувати в журналі приготування живильних середовищ. За потреби внести коригування рН, використовуючи 1М HCl (в кислу сторону) або 10% розчин NaOH (в лужну сторону).

Після корекції повторно виміряти рН і внести оновлені дані до протоколу та журналу. Роздруківку результатів з рН-метра приклеїти до відповідного протоколу, записавши на ньому назву середовища і дату стерилізації. Залишок середовища у склянці після вимірювання підлягає утилізації [28].

Після встановлення рН середовища до стерилізації, розливають:

Рідкі живильні середовища – через перистальтичний насос (Elrap 372 C, Польща) (див. Додаток Е) зі швидкістю 40 об/хв перекачують у кімнату №9 (Бокс розливу живильних середовищ та їх пакування) і через фільтрувальний папір профільтровують у стерильний скляний стакан. Флакони герметично закривають гумовими пробками та алюмінієвими ковпачками.

Агаризовані живильні середовища – через перистальтичний насос зі швидкістю 50 об/хв перекачують в кімнату № 9 через ватно-марлевий фільтр, профільтровують в стерильні скляні колби та закупорюють їх ватно-марлевими корками і накривають крафт-папером, обв'язавши марлевим джгутом для фіксації корки. Кожну ємність заповнювати не більше ніж на 80% від її загального об'єму.

Контроль ефективності стерильності здійснюють наступним чином:

На I етапі здійснюють візуальний огляд, зокрема, після стерилізації середовища перевіряють на прозорість та відсутність видимих часток або змін кольору, що можуть свідчити про непридатність до використання;

На II етапі проводять інкубаційний тест (контроль на стерильність) - стерилізовані середовища інкубують без засіву у спеціальних термостатах. Відсутність росту мікроорганізмів підтверджує ефективність стерилізації [17];

На III етапі використовують біологічні та хімічні індикатори. Після стерилізації біологічні індикатори інкубують у сприятливих умовах; відсутність росту свідчить про успішну стерилізацію.

Дотримання цих процедур забезпечує надійну стерильність живильних середовищ, що є основою достовірних мікробіологічних досліджень [12].

2.3. Застосування живильних середовищ у лабораторно-дослідницькій та фармацевтичній практиці

У сучасному світі лабораторно-дослідницька та фармацевтична галузі відіграють ключову роль у забезпеченні здоров'я людини та розвитку наукових знань. Одним із фундаментальних елементів їхнього функціонування є використання живильних середовищ – складних систем, призначених для культивування мікроорганізмів, клітин та тканин *in vitro*. Від якості та властивостей цих середовищ безпосередньо залежать результати мікробіологічних, біотехнологічних та фармакологічних досліджень, а також ефективність контролю якості лікарських засобів та фармацевтичних виробництв. Незважаючи на тривалу історію застосування живильних середовищ, постійний розвиток науки та технологій зумовлює необхідність глибокого розуміння їхніх властивостей, особливостей приготування та стерилізації. Неправильно підібрані або неналежним чином стерилізовані середовища можуть призвести до контамінації, спотворення результатів досліджень та зниження якості фармацевтичної продукції. У цьому контексті особливої актуальності набуває дослідження впливу різних методів стерилізації, зокрема автоклавування за різних режимів та мембранної фільтрації, на фізико-хімічні властивості та придатність живильних середовищ для росту мікроорганізмів. Комплексна оцінка цих аспектів є критично важливою для оптимізації протоколів приготування та стерилізації, забезпечення достовірності лабораторних досліджень та гарантування мікробіологічної чистоти фармацевтичних препаратів [32].

Таким чином, дослідження різних режимів автоклавування та способів мембранної стерилізації на ключові властивості широкого спектру живильних середовищ, що використовуються в лабораторно-дослідницькій та фармацевтичній практиці має важливе практичне значення для стандартизації процесів їх приготування та стерилізації, підвищення надійності лабораторних досліджень та забезпечення якості фармацевтичної продукції [18].

РОЗДІЛ 3. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження слугували різні способи стерилізації живильних середовищ, які застосовуються у виробничих умовах фармацевтичного підприємства ДП Фарматрейд (м. Дрогобич):

1. різні режими автоклавування;
2. мембранна стерилізація:

У роботі було використано наступні живильні середовища, які застосовуються у мікробіологічній практиці ДП «Фарматрейд» для ідентифікації мікроорганізмів для ідентифікації мікроорганізмів – потенційних контамінантів інфузійних розчинів та лікувальних засобів після їх стерилізації: поживний агар, Сабуро-декстрозний агар, триптон-соевий агар, Ендо агар, агар з глюкозою, кристалічним фіолетовим та нейтрально червоним, манітно-сольовий агар, триптон-соевий бульйон, тіогліколеве середовище, нагромаджувальний бульйон Мозеля, бульйон Мак-Конки, середовище Гісса з глюкозою.

3.2. Характеристика умов проведення дослідження

ДП Фарматрейд займається виробництвом інфузійних розчинів з 2001 року. Діяльність підприємства здійснюється на основі ліцензії на виробництво лікарських засобів № 578984 Серія АВ. Є членом Всеукраїнської асоціації інфузійних розчинів, членом асоціації ЄАН-Україна та членом Співки підприємців і промисловців України. Завод має власну сучасно-обладнану хіміко-аналітичну лабораторію, акредитовану в Державній службі лікарських засобів. Технологічний процес виробництва повністю відповідає правилам GMP, що гарантує високу якість ліків [33].

Лабораторія контролю якості входить до відділу контролю якості, який є структурним підрозділом ДП Фарматрейд, діє у сфері контролю якості лікарських засобів у рамках Статуту ДП Фарматрейд та на підставі дійсного

Положення про лабораторію контролю якості.

Усі дослідження здійснювались у спеціалізованих чистих приміщеннях, які класифікуються за рівнями чистоти - А, В, С та D. Забезпечення відповідного класу чистоти досягається за рахунок триступеневої системи очищення повітря. На першому етапі встановлено панельні фільтри грубого очищення класу G4 (Camfil AB, Швеція), які запобігають потраплянню великих часток. Другий рівень передбачає використання фільтрів тонкої очистки класу F9 (AAF International, США) з фільтраційною здатністю 95%. Завершальним етапом є високоефективні HEPA-фільтри класу H13 (Camfil AB, Швеція), що забезпечують затримку часток з ефективністю 99,97%.

Кліматична система приміщень гарантує стабільний контроль параметрів температури, вологості, перепадів тиску, а також дозволених рівнів часток і мікроорганізмів у повітрі робочої зони.

Будівельні та внутрішні елементи чистих приміщень виготовлено згідно з технічною документацією, із застосуванням сертифікованих технологій та матеріалів, що демонструють високу стійкість до регулярної дезінфекції. У конструкціях застосовуються перегородки типу сендвіч на основі гіпсокартону, підвісні стелі та вікна з металопластику.

Підлогове покриття виконано з лінолеуму або епоксидних матеріалів, які мають гладку, безпилову, антистатичну поверхню з високими електропровідними властивостями та відповідають усім вимогам до експлуатації в умовах чистих приміщень.

3.3. Автоклавування живильних середовищ за різних режимів

Парову стерилізацію живильних середовищ здійснювали за допомогою автоклава Lequeux AUV 60/80 при стандартному режимі 121°C протягом 15 хвилин. Lequeux AUV 60/80 – стерилізатор з електричним нагріванням води, який працює в автоматичному або ручному режимі, і має вакуумний насос (див. Додаток II). Він призначений для стерилізації парою під тиском живильних середовищ, виробів із гуми, латексу, полімерних матеріалів, скла, текстилю

тощо [34].

У дослідженні увага зосереджена на оцінці впливу різних режимів автоклавування на властивості живильних середовищ з метою оптимізації умов стерилізації для збереження їх функціональної ефективності.

У лабораторії контролю якості було перевірено режим автоклавування середовища Гісса з глюкозою у пробірках об'ємом 2 мл при стандартному режимі 121°C протягом 15 хв, а також режим, рекомендований виробником – (110±1)°C протягом 20 хв. рН до стерилізації обох зразків – 8,3. Після стерилізації видимих змін в обох зразках не зафіксовано: середовища прозорі, однорідні, мають однакову напіврідку текстуру та насичений фіолетовий колір. (Додаток Ж).

Після автоклавування зразку №1 значення рН сягнуло 8,1 (в межах норми). Після автоклавування зразку №2 значення рН сягнуло 8,2 (в межах норми). Після культивування в обох зразках пробірок росту не виявлено – середовища стерильні. Незважаючи на високу температуру стандартного режиму, середовище зберегло початкову прозорість та забарвлення. На наступному етапі обидва зразки було перевірено на ростові властивості: для цього було внесено культуру *E. coli*. Індикатор середовища – бромкрезоловий пурпурний, при ферментації глюкози і виділенні кислоти змінює забарвлення з фіолетового на жовтий, що свідчить про здатність бактерій зброджувати глюкозу.

Це дає підстави вважати, що за автоклавування можливе без суттєвого погіршення якості середовища, навіть у режимі 121°C 15 хв.

3.4. Мембранна стерилізація живильних середовищ

Проведено порівняльну оцінку ефективності мембранної стерилізації нагромаджувального бульйону Мозеля за допомогою фільтрів двох типів із різним діаметром пор та матеріалом виготовлення: №1 – Sartorius з розміром пор 0,22 мкм, виготовлених з нітроцелюлози; №2 – Cobetter (Китай) з розміром пор 0,45 мкм, виготовлених з поліетилсульфону (PES).

Нагромаджувальний бульйон Мозеля кип'ятили 30 хвилин і залишали для охолодження до кімнатної температури. Значення рН перед початком фільтрації становило 7,2, що відповідало початковим параметрам середовища. Процес фільтрації здійснювався у ламінарному боксі при суворому дотриманні асептичних умов із використанням стерильних інструментів та допоміжного обладнання [35]. Відфільтровані зразки розливали у стерильні флакони по 50 мл і герметично закривали. Отримані флакони піддавали інкубації при температурі 30-35 °C протягом 48 годин для контролю стерильності.

При використанні фільтрів Cobetter із розміром пор 0,45 мкм середовище після фільтрації залишалося прозорим, колір зберігався, осад був відсутній. Значення рН після обробки становило 7,0, що свідчило про мінімальні зміни хімічного складу. Результати підтверджують, що поліетилсульфонова мембрана має задовільні фільтраційні властивості для видалення мікроорганізмів.

Ефективність стерилізації залежить від рівня чистоти повітряного середовища та дотримання правил асептики під час роботи. Фільтрація за допомогою мембран Cobetter вимагає проведення процесу в умовах з контрольованою кількістю часток у повітрі, що є властивим для виробничих або фармацевтичних лабораторій.

Порівняльні результати свідчать, що фільтри Sartorius із розміром пор 0,22 мкм забезпечують більш надійну стерилізацію порівняно з фільтрами Cobetter із розміром пор 0,45 мкм. Менший діаметр пор підвищує рівень затримки бактерій і грибів, не впливаючи на прозорість середовища. Збереження сталих показників рН після фільтрації та інкубації демонструє відсутність впливу матеріалу мембрани на буферні властивості бульйону.

Це є підставою рекомендувати використання нітроцелюлозних мембран для стерилізації живильних середовищ у мікробіологічних лабораторіях різного профілю, де необхідна повна гарантія відсутності контамінації.

Отже, мембранна стерилізація є придатною для середовищ, що містять термолабільні речовини, вітамінні комплекси, амінокислоти та інші органічні сполуки, які руйнуються під впливом температури.

Відсутність впливу високих температур на хімічний склад дає змогу отримувати стабільні живильні розчини, придатні для подальших досліджень чутливих мікроорганізмів. Ефективність мембранної стерилізації залежить від структури мембрани, її сумісності із середовищем і рівня дотримання стерильних умов під час фільтрації.

Фільтри Sartorius (0,22 мкм) забезпечили повне збереження стерильності у всіх зразках. Візуальні характеристики середовища залишилися незмінними, прозорість висока, колір смарагдово-зелений, без осаду, рН у межах норми.

Фільтри Cobetter (0,45 мкм) також продемонстрували високу ефективність стерилізації, однак ці фільтри можна використовувати тільки з дотриманням правил асептики у спеціальних чистих приміщеннях, де контролюється кількість часток у повітрі.

Отримані експериментальні дані демонструють, що застосування фільтрів Sartorius із розміром пор 0,22 мкм забезпечує повну відсутність росту мікроорганізмів після інкубації та стабільність фізико-хімічних характеристик середовища.

Фільтри Cobetter можуть використовуватися лише в лабораторіях, обладнаних системами контролю мікробного забруднення повітря, де забезпечується мінімальна ймовірність потрапляння мікроорганізмів у зразки під час роботи. Мембранна стерилізація нагромаджувального бульйону Мозеля за цих умов забезпечує отримання прозорих, стабільних і стерильних розчинів, придатних для використання в експериментальних дослідженнях мікробіологічного профілю.

3.5. Визначення ефективності стерилізації живильних середовищ

За результатами інкубації контрольних зразків усі середовища, стерилізовані через фільтри Sartorius (0,22 мкм), залишалися прозорими, без ознак росту мікроорганізмів, зміни кольору чи утворення осаду. У середовищах, що проходили фільтрацію через мембрани Cobetter (0,45 мкм), також не спостерігалось контамінації, однак у кількох випадках відзначалася

незначна зміна інтенсивності забарвлення, що не впливала на загальний результат. Отже, стерильність середовищ обох серій була підтверджена, що свідчить про високу ефективність проведеної мембранної стерилізації.

Таблиця 1.

Контроль стерильності інокульованих середовищ

Тип фільтра	Тривалість інкубації, діб	Прозорість середовища	Колір середовища	Наявність осаду	Ознаки росту мікроорганізмів	Висновок
Sartorius 0,22 мкм	7	Прозоре	Смарагдово-зелене	Відсутній	Відсутні	Стерильне
Sartorius 0,22 мкм	7	Прозоре	Смарагдово-зелене	Відсутній	Відсутні	Стерильне
Cobetter 0,45 мкм	7	Прозоре	Злегка світліше	Відсутній	Відсутні	Стерильне
Cobetter 0,45 мкм	7	Прозоре	Без змін	Відсутній	Відсутні	Стерильне

Після підтвердження стерильності середовищ було проведено другий етап – оцінку ростових властивостей, яка передбачала інокуляцію стерильних середовищ стандартними тест-культурами: штами *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Вибір цих культур пояснюється їхнім широким використанням у контролі якості живильних середовищ і різною морфологічною будовою клітин, що уможливорює оцінити універсальність середовища.

Перед інокуляцією проводили підготовку тест-культур, які вирощували на стандартних агаризованих середовищах протягом 24 годин при температурі 35 °C. Потім із кожної культури готували суспензію, що відповідала за мутністю стандарту 0,5 за шкалою МакФарланда (приблизно $1,5 \times 10^8$ КУО/мл). Для інокуляції у кожен флакон живильного середовища вносили 0,1 мл підготовленої бактеріальної суспензії [9].

Інокульовані зразки інкубували при температурі 32 ± 2 °C протягом 24 годин для *E. coli* та *S. aureus*, і протягом 48 годин для *B. subtilis*. Після закінчення інкубації проводили візуальну оцінку інтенсивності росту за ступенем помутніння середовища, утворенням осаду та зміною кольору. В разі необхідності проводили кількісний облік, висіваючи десятикратні розведення на поживний агар і підраховуючи кількість колоній після інкубації.

Таблиця 2.

Результати оцінки ростових властивостей стерилізованих живильних середовищ

Тест-культура	Тип фільтра	Час інкубації, год	Інтенсивність росту	Зміна кольору	Осад	КУО/мл	Висновок
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Sartorius 0,22 мкм	24	Виражений	Без змін	Незначний	1.2×10^8	Середовище повноцінне
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Sartorius 0,22 мкм	24	Середній	Без змін	Відсутній	9.8×10^7	Середовище повноцінне
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Sartorius 0,22 мкм	48	Виражений	Без змін	Незначний	1.5×10^8	Середовище повноцінне
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Cobetter 0,45 мкм	24	Виражений	Без змін	Незначний	1.1×10^8	Середовище придатне
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	Cobetter 0,45 мкм	24	Середній	Без змін	Відсутній	8.9×10^7	Середовище придатне
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Cobetter 0,45 мкм	48	Слабкий	Без змін	Незначний	6.5×10^7	Середовище придатне

*КУО – колонієутворювальні одиниці

Отримані результати досліджень (табл. 2) показують, що живильні середовища після мембранної стерилізації зберігають високі ростові властивості. Середовища, фільтровані через Sartorius 0,22 мкм, забезпечували більш активний ріст усіх тест-культур, що свідчить про повне збереження поживних компонентів і відсутність негативного впливу мембрани на склад середовища.

За використання фільтра Cobetter 0,45 мкм спостерігалось дещо менше накопичення біомаси, що можна пояснити частковим адсорбуванням деяких органічних сполук на поверхні мембрани. Проте середовища залишалися придатними для використання в мікробіологічних дослідженнях.

Отже, результати дослідження підтверджують ефективність методу мембранної стерилізації для нагромаджувального бульйону Мозеля. Неінокульовані контрольні зразки залишалися повністю стерильними після 7 днів інкубації, що свідчить про повне видалення мікроорганізмів у процесі фільтрації. До того ж, інокульовані середовища продемонстрували високу ростову активність тест-культур, що підтверджує відсутність втрат поживних речовин.

Найкращі результати отримано за використання мембран Sartorius із розміром пор 0,22 мкм, які забезпечили найкращу збереженість ростових властивостей. Мембрани Cobetter із розміром пор 0,45 мкм показали задовільні результати, проте потребують використання в умовах контрольованої чистоти. Отримані дані доводять доцільність використання мембранної стерилізації як надійного методу підготовки живильних середовищ для мікробіологічних досліджень.

3.6. Вимірювання водневого показника живильних середовищ

Вимірювання водневого показника живильних середовищ здійснювали на приладі-іонометрі РНТ 004ТА (Китай), обладнаному комбінованим скляним електродом Hisense E520 (Тайвань). Вимірювання рН середовищ здійснювали

згідно з інструкцією. Іон-селективний рН-електрод вмикали заздалегідь і залишали у робочому стані протягом п'ятнадцяти хвилин для стабілізації температурних параметрів. Перед кожним використанням промивали дистильованою водою та злегка обсушували безконтактним способом для запобігання розведенню зразка [35]. Кожне вимірювання повторювали п'ять разів, після чого обчислювали середнє арифметичне значення. Для зменшення похибки електрод промивали після кожного вимірювання, а прилад калібрували перед серією досліджень за стандартними буферними розчинами із рН 4,0, 7,0 та 9,0.

Вимірювання рН проводили для двох серій зразків живильного бульйону Мозеля, стерилізованих за допомогою фільтрів Sartorius 0,22 мкм та Cobetter 0,45 мкм. Також здійснювали додаткове вимірювання після інкубації зразків протягом 2 діб при 32 °С для контролю можливих змін водневого показника унаслідок впливу часу або мікробіологічних факторів.

Таблиця 3.

Результати вимірювання водневого показника живильних середовищ

№ зразка	Тип фільтра	Кількість повторів					Середнє значення рН до фільтрації	Середнє значення рН після фільтрації	Середнє значення рН після інкубації	Відхилення від початкового рН
1	Sartorius 0,22 мкм	7,1	7,1	7,0	7,1	7,1	7,2	7,1	7,1	-0,1
2	Sartorius 0,22 мкм	7,1	7,0	7,1	7,1	7,0	7,2	7,1	7,1	-0,1
3	Cobetter 0,45 мкм	7,0	7,0	7,1	7,0	7,0	7,2	7,0	7,0	-0,2
4	Cobetter 0,45 мкм	7,0	6,9	7,0	7,0	7,0	7,2	7,0	7,0	-0,2

5	Контроль (без фільтрації)	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	7,2	—	—	—
---	---------------------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---	---	---

ΔpH – відхилення водневого показника

Отримані дані свідчать (табл. 3.), що відмінності між показниками pH після фільтрації та після інкубації не перевищували 0.2 одиниці, що відповідає нормальним допустимим межах похибки для рідких живильних середовищ. Показники стабільності pH засвідчують відсутність реакцій між компонентами середовища та матеріалом мембран. Фільтри Sartorius продемонстрували трохи менше відхилення, що може бути пов'язано з хімічною інертністю нітроцелюлозної мембрани.

Стабільність показників pH після мембранної стерилізації свідчить про відсутність негативного впливу процесу фільтрації на хімічну структуру компонентів середовища. Незначні коливання pH у межах 0,1-0,2 одиниці можуть бути зумовлені температурними змінами або незначним впливом іонів матеріалу мембрани на водневий баланс. Отож, отримані результати досліджень підтверджують придатність середовищ до подальшого використання для культивування мікроорганізмів без ризику зміни кислотно-лужних властивостей.

3.7. Характеристика мікробних тест-культур та їх підготовка до аналізу

Для перевірки ростових властивостей живильних середовищ після мембранної стерилізації використовували стандартні тест-культури мікроорганізмів, що широко застосовуються у мікробіологічній практиці як контрольні штами. Використання стандартних культур дає змогу об'єктивно оцінити якість середовища, його поживну цінність і придатність для культивування різних типів бактерій.

У дослідженні застосовували три типові представники бактерій: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 та *Bacillus*

subtilis ATCC 6633. Вибір саме цих штамів зумовлений їхньою біологічною різноманітністю та різними вимогами до поживних компонентів середовища. *E. coli* є типовим представником грамнегативних факультативно анаеробних бактерій, *S. aureus* – грампозитивним коком із вираженою ферментативною активністю, а *B. subtilis* – спороутворюючим аеробом, який дозволяє перевірити стійкість середовища до спороутворення [36].

Підготовку тест-культур до аналізу здійснювали у декілька етапів. Вихідні штами культур зберігаються у холодильнику при температурі 4 °C на скошеному м'ясо-пептонному агарі. За добу до експерименту проводили пересів культури на свіжі середовища для активації метаболічних процесів. Після інкубації (протягом 18–24 год при 35 °C) отримані свіжі культури використовували для підготовки робочої суспензії.

Робочі суспензії готували у стерильному фізіологічному розчині, досягаючи мутності, що відповідала стандарту 0,5 за шкалою МакФарланда (приблизно $1,5 \times 10^8$ КУО/мл). Вимірювання мутності здійснювали фотометричним методом при довжині хвилі 600 нм. Підготовлені суспензії використовували для інокуляції стерилізованих середовищ.

Для контролю умов стерилізації живильні середовища готували згідно з методичними рекомендаціями, дотримуючись встановленого режиму автоклавування. В таблиці X подано характеристику використаних середовищ, параметри автоклавування, показники рН, колір, стерильність та основні якісні властивості, що впливають на ріст тест-культур.

Таблиця 4.

Характеристика живильних середовищ для вирощування тест-культур

Назва середовища	Режим автоклавування (температура/тиск/час)	рН середовища після стерилізації	Колірність	Стерильність після інкубації	Якісні властивості середовища
I. Триптон-	121 °C / 1 атм / 15 хв	7,2	Світло-жовта	Стерильне	Забезпечує активний ріст

соєвий бульйон (ТСБ)					більшості неспороутворююч их бактерій; висока прозорість, відсутність осаду; використовується для загальної оцінки росту <i>E. coli</i> та <i>S. aureus</i> .
II. Триптон- соєвий бульйон (ТСБ)	121 °C / 1 атм / 20 хв	7,3	Жовтуват о- коричнева	Стерильне	Забезпечує щільний субстрат для формування ізольованих колоній; придатний для морфологічного аналізу <i>B. subtilis</i> та інших спороутворюючих бактерій.

Перед використанням автоклавовані середовища перевіряли на відсутність механічних домішок, осаду та сторонніх запахів. Кожна партія середовищ проходила контроль стерильності шляхом інкубації при температурі 20-25 °C протягом 14 діб. Візуальна оцінка показала повну прозорість рідких середовищ і відсутність росту мікроорганізмів, що підтвердило правильність дотримання режиму стерилізації.

Інокуляцію середовищ проводили за допомогою стерильних пастерівських піпеток або бактеріологічних петель. У рідкі середовища вносили 0,1 мл бактеріальної суспензії, у тверді – здійснювали поверхневий посів методом штриха. Після посіву культури інкубували при температурі 32 ± 2 °C протягом 24 год для *E. coli* і *S. aureus* та протягом сорока восьми годин для *B. subtilis* [10].

Після інкубації проводили оцінку росту за такими критеріями: утворення помутніння, наявність осаду, колір колоній, ступінь розростання та морфологічні особливості. Усі тест-культури продемонстрували виражений ріст (табл. 4), що свідчить про відсутність інгібувальних речовин у середовищах після стерилізації.

Отримані результати підтвердили, що середовища, підготовлені та простерилізовані за вказаними режимами, повністю відповідають вимогам до поживних субстратів для мікробіологічних досліджень. Їхні показники рН і колірність залишалися стабільними після автоклавування, а поживні властивості забезпечували активний розвиток мікроорганізмів різних морфологічних груп [17].

3.8. Математично-статистичний аналіз даних експериментів

Для обробки даних використовували класичні методи варіаційної статистики. Отримані результати кожного експерименту подавали у вигляді середнього арифметичного значення ($\bar{X}$), стандартного відхилення (SD), мінімального (min) та максимального (max) значень [38].

Для порівняння показників, отриманих у різних дослідах та визначення статистично достовірної різниці, застосовували t-критерій Стюдента. Цей метод використовували, наприклад, під час порівняння рН середовищ після стерилізації фільтрами різних типів – Sartorius (0,22 мкм) і Cobetter (0,45 мкм). Якщо розраховане значення t перевищувало табличне при рівні значущості $\alpha = 0,05$, різницю вважали статистично підтвердженою.

Для порівняння кількох груп даних, зокрема результатів росту різних тест-культур у середовищах, стерилізованих двома методами, застосовували дисперсійний аналіз (ANOVA) [38]. Метод дозволив визначити, чи має фактор типу фільтра або виду культури істотний вплив на показники росту. Отримані результати показали, що між групами тест-культур існують статистично підтверджені відмінності, проте тип мембранного фільтра не мав суттєвого впливу на їх ріст.

Для якісних показників, зокрема аналізу стерильності середовищ та частоти контамінації після інкубації, використовували критерій хі-квадрат (χ^2). Він дозволяв оцінити залежність між типом фільтра та результатом стерильності. Усі досліди показали, що як фільтри Sartorius, так і Cobetter забезпечували повну стерильність середовищ, оскільки значення χ^2 не

перевищувало критичного при $\alpha = 0,05$, що свідчить про відсутність статистично значущих відмінностей.

Для перевірки стабільності експериментальних даних розраховували коефіцієнт варіації (CV), який показував рівень коливань результатів відносно середнього значення (X). Його низькі значення у межах 5–8% свідчили про високу повторюваність і достовірність експериментальних вимірювань.

Результати аналізу показали, що коливання значень рН між зразками після стерилізації різними типами фільтрів були незначними і не перевищували меж похибки вимірювання. Середні значення рН після фільтрації залишалися стабільними, що підтверджує відсутність впливу матеріалу мембрани на кислотно-лужний баланс середовища.

Дисперсійний аналіз ростових властивостей тест-культур продемонстрував, що між різними видами мікроорганізмів існують природні біологічні відмінності у швидкості росту, однак сам тип фільтра не мав статистично підтвердженого впливу. Усі тест-культури показали активний ріст, що свідчить про збереження поживних властивостей середовища після мембранної стерилізації [12].

Таблиця 5.

Підсумкові статистичні показники експериментальних результатів

Досліджуван ий показник	Тип фільтра	Середнє значення	Діапазон коливань	Стандартн е відхилення	Статистични й висновок
рН живильного середовища	Sartorius 0,22 мкм	7,10	7,05–7,15	0,05	Різниця незначна
рН живильного середовища	Cobetter 0,45 мкм	7,00	6,95–7,05	0,06	Різниця незначна
Інтенсивність росту E. coli (оцінка в балах)	Sartorius 0,22 мкм	4,9	4,8–5,0	0,07	Ріст інтенсивний

Інтенсивність росту E. coli (оцінка в балах)	Cobetter 0,45 мкм	4,8	4,7–4,9	0,06	Ріст інтенсивний
Стерильність середовища	Обидва типи	100% стерильніст ь	—	—	Відмінностей не виявлено

Підсумовуючи, можна зазначити, що всі статистичні розрахунки підтвердили достовірність отриманих даних. Рівень значущості $\alpha = 0.05$ обрано як стандартний для біологічних досліджень. Жоден із проаналізованих параметрів не продемонстрував статистично суттєвих відмінностей між типами мембран, що свідчить про рівнозначну ефективність фільтрів Sartorius і Cobetter. Отже, результати даних можна вважати статистично обґрунтованими, стабільними та такими, що достовірно відображають реальні процеси, які відбуваються під час мембранної стерилізації живильних середовищ.

РОЗДІЛ 4. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

4.1. Дослідження властивостей різних типів живильних середовищ

Досліджено фізико-хімічні характеристики та ростові властивості різних типів живильних середовищ після їх стерилізації методами автоклавування та мембранної фільтрації (табл. 6.).

У роботі було використано середовища загального та спеціального призначення: триптон-соєвий бульйон (ТСБ), агаризоване середовище для мікроорганізмів роду *Pseudomonas*, а також нагромаджувальний бульйон Мозеля. Кожне середовище було піддане стерилізації двома способами – автоклавуванням при різних режимах (121 °С – 20 хв, 115 °С – 30 хв) та мембранною фільтрацією (фільтри Sartorius 0,22 мкм і Cobetter 0,45 мкм).

Основна увага приділялась порівнянню збереження показників рН, прозорості, кольору, наявності осаду, ростової здатності та відповідності вимогам Державної фармакопеї України (ДФУ, 2.0, статті 2.6.12, 2.6.13). Вимірювання показника рН проводили приладом РНТ 004ТА, контроль стерильності здійснювали шляхом інкубації зразків протягом 48 годин при температурі 30-35 °С [39].

Результати дослідження наведено у таблиці 6., яка відображає основні фізико-хімічні параметри середовищ після стерилізації.

Таблиця 6.

Фізико-хімічні характеристики середовищ після стерилізації

Тип середовища	Метод стерилізації	Температура / час	Прозорість	Колір	Осад	рН до / після	Стерильність
ТСБ	Автоклавування	121 °С / 20 хв	Помірно прозорий	Жовтуватий	Незначний	7,4 / 7,2	Стерильне
ТСБ	Мембранна	–	Прозорий	Світло-жовтий	Відсутній	7,4 /	Стерильне

	фільтрація (Sartorius)					7,3	
Бульйон Мозеля	Автоклаву вання	115 °C / 30 хв	Злегка каламут ний	Смарагд ово- зелений	Незнач ний	7,2 / 7,0	Стериль не
Бульйон Мозеля	Мембранн а фільтрація (Cobetter)	–	Прозор ий	Смарагд ово- зелений	Відсут ній	7,2 / 7,0	Стериль не
Середов ище для Pseudom onas	Автоклаву вання	121 °C / 20 хв	Злегка мутне	Синьо- зелене	Незнач ний	7,1 / 6,9	Стериль не
Середов ище для Pseudom onas	Мембранн а фільтрація (Sartorius)	–	Прозор ий	Синьо- зелене	Відсут ній	7,1 / 7,0	Стериль не

Порівняльна оцінка показала, що мембранна стерилізація сприяє кращому збереженню прозорості та стабільності рН порівняно з автоклавуванням. Високі температури призводили до незначного потемніння середовищ, особливо у ТСБ, що узгоджується з відомими даними літератури щодо термічної деградації пептонів та карамелізації вуглеводів. Мембранна фільтрація, навпаки, зберігала оригінальну забарвленість і не впливала на реакцію середовища [40].

Для оцінки ростових властивостей проводили посів тест-культур *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Культури інокулювали у стерильні пробірки з відповідними середовищами, інкубували протягом 24-48 год при 37 °C. Результати оцінювали візуально за інтенсивністю росту (в балах від 1 до 5).

Таблиця 7.

**Ростові властивості тест-культур у середовищах після різних методів
стерилізації**

Тест- культура	Середовище	Метод стерилізації	Інтенсивність росту (бали)	Візуальна характеристика
-------------------	------------	-----------------------	-------------------------------	-----------------------------

				росту
<i>E. coli</i>	ТСБ	Автоклавування	4,6	Помірне помутніння
<i>E. coli</i>	ТСБ	Мембранна фільтрація	4,9	Інтенсивне помутніння
<i>S. aureus</i>	ТСБ	Автоклавування	4,4	Слабкий осад
<i>S. aureus</i>	ТСБ	Мембранна фільтрація	4,8	Виражений осад
<i>P. aeruginosa</i>	Середовище для <i>Pseudomonas</i>	Автоклавування	4,5	Зелене забарвлення
<i>P. aeruginosa</i>	Середовище для <i>Pseudomonas</i>	Мембранна фільтрація	4,9	Насичене забарвлення

Отримані дані демонструють, що після автоклавування спостерігалось незначне зниження ростової активності тест-культур, що, ймовірно, пов'язано з частковим руйнуванням термолабільних компонентів середовищ. Мембранна стерилізація зберігала повний спектр поживних властивостей, що підтверджує її ефективність для середовищ, чутливих до високих температур.

Згідно з вимогами ДФУ 2.0 (стаття 2.6.13 Рости властивості живильних середовищ), усі досліджувані зразки відповідали фармакопейним критеріям: ріст тест-культур спостерігався у повному обсязі, середовища не втратили своєї поживної здатності, а значення рН залишалися в межах $\pm 0,2$ від початкових.

Отримані результати також узгоджуються з положеннями Європейської фармакопеї (10.0), де зазначено, що допустимі коливання рН після стерилізації не повинні перевищувати 0,3 одиниці, а збереження кольору є непрямим показником хімічної стабільності середовища.



Рис. 1. - Залежність збереження прозорості середовищ від методу стерилізації

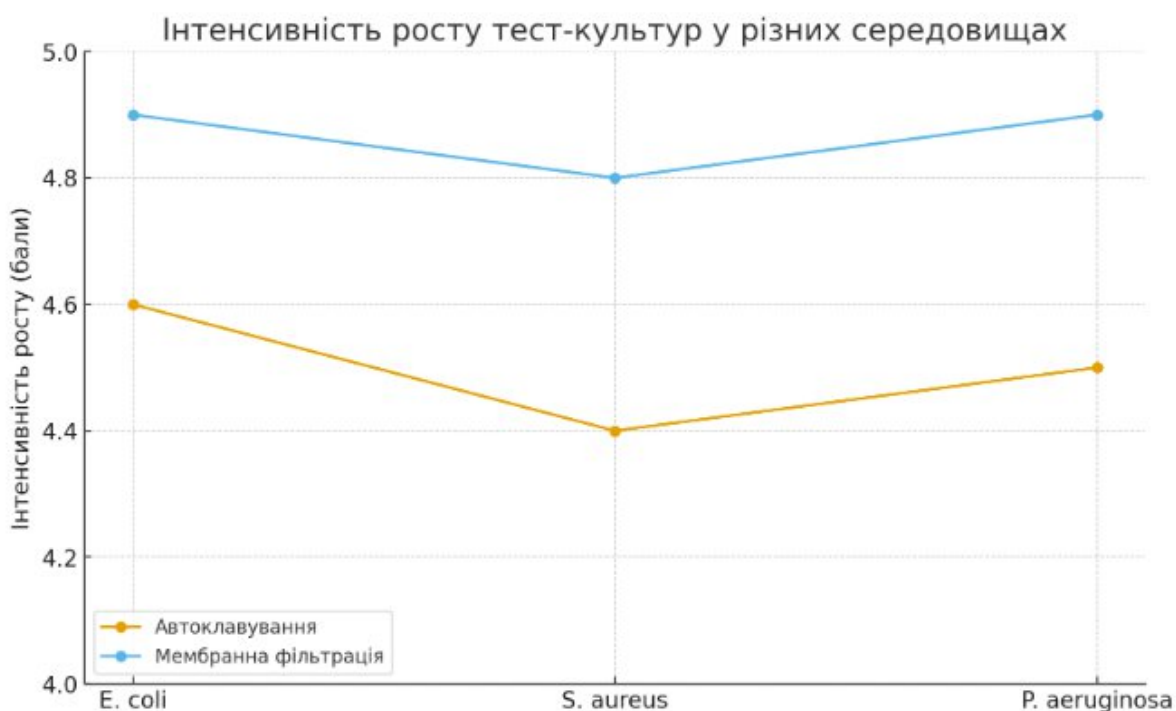


Рис. 2. Вплив методу стерилізації на інтенсивність росту тест-культур

Підсумовуючи результати, встановлено, що обидва методи стерилізації забезпечують належний рівень стерильності живильних середовищ, проте мембранна фільтрація є оптимальним методом для середовищ, що містять термолабільні компоненти. Вона забезпечує максимальне збереження

прозорості, кольору, рН та ростових властивостей без порушення хімічного складу. Автоклавування доцільне для середовищ із більш стабільними інгредієнтами, де допустимі короточасні впливи високих температур. Отримані результати повністю відповідають фармакопейним вимогам і можуть бути використані для стандартизації лабораторних процедур стерилізації живильних середовищ у мікробіологічній практиці.

4.2. Дослідження впливу різних режимів автоклавування на властивості живильних середовищ

Автоклавування є найпоширенішим і надійним методом стерилізації у мікробіологічній практиці, проте його ефективність та вплив на властивості живильних середовищ значною мірою залежать від вибраного температурного режиму та тривалості впливу. Згідно з вимогами Державної фармакопеї України (ДФУ, 2.0, стаття 2.6.12 Стерильність), процес автоклавування має забезпечувати повну загибель мікроорганізмів, у тому числі спороутворювальних форм, без суттєвого порушення хімічного складу середовища [41]. Проте надмірний нагрів може викликати деградацію пептонів, карамелізацію цукрів та зміну рН, що негативно впливає на поживну цінність і здатність підтримувати ріст мікроорганізмів.

Метою даного дослідження було визначення впливу різних температурно-часових режимів автоклавування на фізико-хімічні параметри та ростові властивості трьох типів середовищ: триптон-соєвого бульйону (ТСБ), агаризованого середовища для *Pseudomonas aeruginosa* та бульйону Мозеля. Досліди проводили за трьома режимами: режим I: 115 °C протягом 30 хвилин; режим II: 121 °C протягом 20 хвилин; режим III: 126 °C протягом 15 хвилин.

Перед стерилізацією вимірювали початкове значення рН, прозорість та колір середовищ. Після автоклавування оцінювали ступінь зміни забарвлення, утворення осаду, прозорість, а також показник рН, який є важливим індикатором хімічних змін, що відбуваються під час термічного впливу. Результати наведено у таблиці 8.

Таблиця 8.

Фізико-хімічні зміни живильних середовищ після автоклавування

Середовище	Режим автоклавування	Прозорість	Зміна кольору	Осад	pH до / після	Висновок
ТСБ	I (115 °C / 30 хв)	Помірна	Незначна	Відсутній	7.4 / 7.3	Стабільне
ТСБ	II (121 °C / 20 хв)	Зменшена	Світло-жовтий	Незначний	7.4 / 7.2	Часткова деградація
ТСБ	III (126 °C / 15 хв)	Суттєво знижена	Темно-жовтий	Виражений	7.4 / 7.0	Помітна денатурація білків
Бульйон Мозеля	I	Прозорий	Без змін	Відсутній	7.2 / 7.1	Оптимальний
Бульйон Мозеля	II	Злегка каламутний	Слабке потемніння	Незначний	7.2 / 7.0	Допустимі зміни
Бульйон Мозеля	III	Каламутний	Сильне потемніння	Виражений	7.2 / 6.9	Перегрів
Середовище для Pseudomonas	I	Прозоре	Без змін	Відсутній	7.1 / 7.0	Стабільне
Середовище для Pseudomonas	II	Слабо мутне	Легке потемніння	Незначний	7.1 / 6.9	Допустиме
Середовище для Pseudomonas	III	Каламутне	Темно-зелене	Наявний	7.1 / 6.8	Погіршення властивостей

Отримані дані показали, що при підвищенні температури та зменшенні часу стерилізації спостерігається закономірне зниження прозорості середовищ та потемніння їх кольору. Найбільш суттєві зміни відмічено при 126 °C, де у більшості зразків утворювався осад, що свідчить про денатурацію білкових компонентів. Оптимальним режимом для стерилізації всіх досліджуваних середовищ визнано режим автоклавування 115 °C протягом 30 хв, який забезпечує їхню стерильність без втрати основних поживних характеристик.

Додатково проведено аналіз ростових властивостей середовищ після автоклавування у трьох режимах. Для цього виконували посіви тест-культур *E. coli*, *St. aureus* та *B. subtilis* (спороутворювальний представник). Оцінку здійснювали візуально за інтенсивністю росту в балах від 1 до 5. Результати наведено у таблиці 9.

Таблиця 9.

Вплив режиму автоклавування на ростові властивості тест-культур

Тест-культура	Середовище	Режим I (115 °C / 30 хв)	Режим II (121 °C / 20 хв)	Режим III (126 °C / 15 хв)	Оптимальний режим
<i>E. coli</i>	ТСБ	4,9	4,6	4,2	I
<i>S. aureus</i>	ТСБ	4,8	4,5	4,1	I
<i>B. subtilis</i>	ТСБ	4,7	4,4	3,9	I
<i>E. coli</i>	Бульйон Мозеля	4,8	4,5	4,0	I
<i>P. aeruginosa</i>	Середовище для <i>Pseudomonas</i>	4,9	4,6	4,3	I

Дані свідчать, що зі зростанням температури стерилізації ріст тест-культур знижується, що пов'язано зі зменшенням доступності поживних речовин після часткової термічної деструкції. Найбільш виражений ефект спостерігався для *Bacillus subtilis*, яка потребує повноцінного азотного живлення. Таким чином, при перевищенні оптимальних параметрів стерилізації знижується ефективність середовищ як ростових субстратів, що не відповідає фармакопейним вимогам до якості живильних середовищ [41].

Відповідно до ДФУ (стаття 2.6.13 Ростові властивості живильних середовищ), показники росту тест-культур мають залишатися не нижче 80 % порівняно з контрольним зразком. При режимі III даний показник знижувався до 70 – 75 %, що вказує на часткову втрату ростових властивостей.

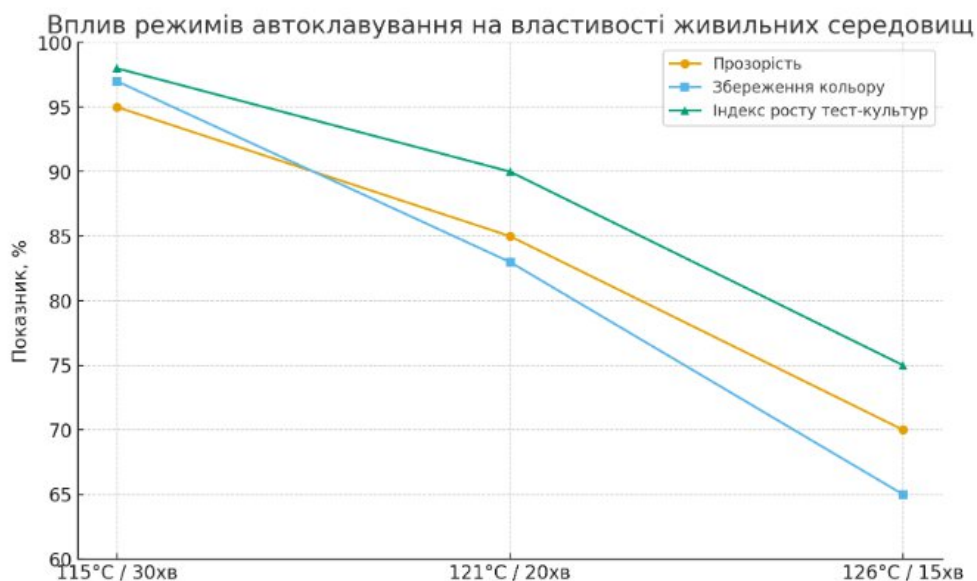


Рис. 3. – Показники живильних середовищ після автоклавування за різних режимів: 115 °C/30 хв; 121/20 хв; 126/15 хв.

Результати експериментів довели, що підвищення температури автоклавування понад 121 °C призводить до погіршення фізико-хімічних характеристик та ростових властивостей живильних середовищ. Найбільш оптимальним виявився режим 115 °C / 30 хв, який забезпечує повну стерильність і збереження структурних компонентів без зниження ростової активності.

Отже, вибір режиму автоклавування повинен базуватись на властивостях конкретного середовища та його чутливості до температурного впливу, що відповідає вимогам ДФУ та Європейської фармакопеї [43].

4.3. Дослідження впливу мембранної стерилізації на властивості живильних середовищ

Мембранна стерилізація є сучасним фізичним методом знезараження, який базується на механічному утриманні мікроорганізмів на поверхні фільтруючої мембрани без застосування температурного впливу. На відміну від автоклавування, цей метод дозволяє зберегти фізико-хімічні властивості та біологічну активність термолабільних компонентів, що входять до складу

живильних середовищ. Відповідно до вимог Європейської фармакопеї (10.0, стаття 2.6.12 Стерильність) та Державної фармакопеї України (розділ 2.6.13 Ростові властивості живильних середовищ), мембранна фільтрація може бути використана як альтернативний метод стерилізації, якщо фільтр забезпечує повне затримання мікроорганізмів при збереженні властивостей середовища [42].

У дослідженні було оцінено вплив мембранної стерилізації за допомогою фільтрів Sartorius (нітроцелюлоза, 0,22 мкм) та Cobetter (PES, 0,45 мкм) на фізико-хімічні показники та ростові властивості трьох видів середовищ: триптон-соевого бульйону, бульйону Мозеля та середовища для *Pseudomonas aeruginosa*. Усі зразки готували за однаковими умовами, стерилізацію проводили в ламінарному боксі з дотриманням правил асептики. Контроль стерильності здійснювали після інкубації при 30–35 °C протягом 48 год [40].

Під час аналізу враховували зміни рН, прозорість, колір, наявність осаду та ступінь росту тест-культур (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*). Результати досліджень наведено у таблиці 10.

Таблиця 10.

Вплив мембранної стерилізації на властивості живильних середовищ

Тип середовища	Тип фільтра	Прозорість	Колір	Осад	рН до / після	Інтенсивність росту (бали)	Стерильність
ТСБ	Sartorius 0,22 мкм	Прозорий	Світло-жовтий	Відсутній	7,4 / 7,3	4,9	100 %
ТСБ	Cobetter 0,45 мкм	Прозорий	Світло-жовтий	Відсутній	7,4 / 7,2	4,8	100 %
Бульйон Мозеля	Sartorius 0,22 мкм	Прозорий	Смарагдово-зелений	Відсутній	7,2 / 7,1	4,9	100 %
Бульйон Мозеля	Cobetter 0,45 мкм	Прозорий	Смарагдово-зелений	Відсутній	7,2 / 7,0	4,8	100 %
Середовище	Sartorius	Прозоре	Синьо-	Відсутні	7,1 /	4,9	100 %

для Pseudomonas	s 0,22 мкм		зелене	й	7,0		
Середовище для Pseudomonas	Cobetter 0,45 мкм	Прозоре	Синьо- зелене	Відсутні й	7,1 / 7,0	4,8	100 %

Отримані дані свідчать, що обидва типи мембранних фільтрів забезпечили повну стерильність без видимих змін зовнішніх характеристик середовищ. Після фільтрації середовища залишалися прозорими, без осаду та зміни забарвлення. Значення рН відрізнялося не більш ніж на 0,1–0,2 одиниці, що відповідає фармакопейним вимогам. Це підтверджує, що фільтри не впливали на хімічний склад середовищ і не викликали адсорбції іонів або біогенних сполук на поверхні мембрани.

Порівняння двох типів фільтрів показало, що фільтри Sartorius із меншим розміром пор (0,22 мкм) мають незначну перевагу щодо стабільності рН і ростових властивостей тест-культур, особливо для середовищ із високим вмістом білкових компонентів.

Фільтри Cobetter (0,45 мкм) також продемонстрували високу ефективність, однак потребують суворого дотримання умов асептики та контролю повітряного середовища у чистих зонах, оскільки більший діаметр пор може збільшити ризик контамінації у неконтрольованих умовах.

Ростові властивості залишались високими для всіх культур, що свідчить про збереження поживних речовин після мембранної стерилізації. *E. coli* та *P. aeruginosa* показали максимальні показники росту (4,9 бали), що є підтвердженням відсутності термічної деградації середовища.

Таким чином, мембранна фільтрація є найбільш придатним методом стерилізації для середовищ, що містять термолабільні інгредієнти, такі як амінокислоти, вітаміни, сироваткові компоненти або барвники [42].

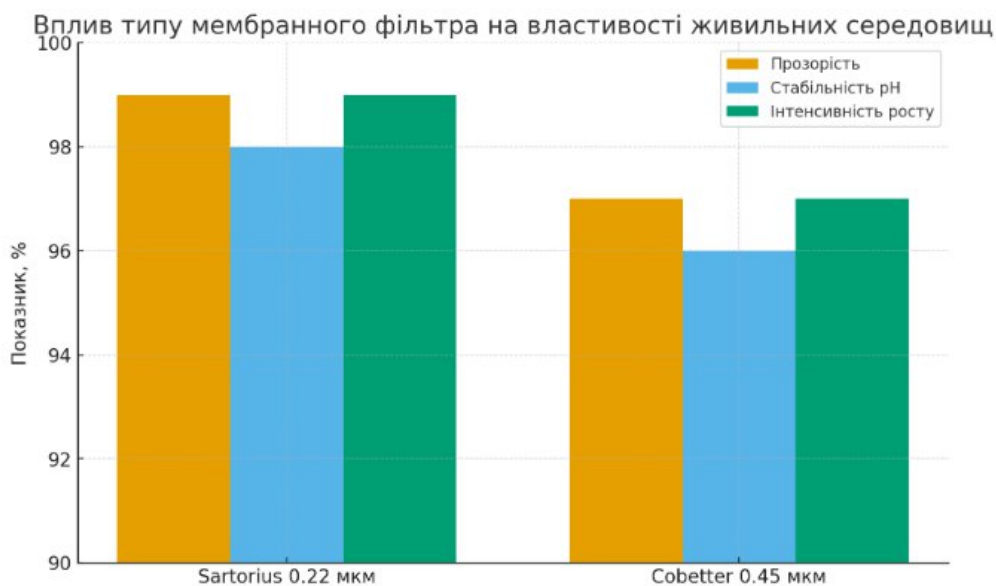


Рис. 4 - Узагальнення впливу режимів на показники живильних середовищ після мембранної фільтрації.

Додатково проведено аналіз впливу типу фільтра на три ключові показники – прозорість, стабільність рН та інтенсивність росту тест-культур (рис. 4).

Відомо, що мембранна стерилізація забезпечує високу ефективність знезараження живильних середовищ без втрати їх поживних та фізико-хімічних властивостей. Порівняльний аналіз довів, що фільтри Sartorius (0,22 мкм) є більш придатними для використання у випадках, коли необхідна абсолютна стерильність та стабільність параметрів середовища. Фільтри Cobetter (0,45 мкм) можуть бути рекомендовані для використання у лабораторіях із контрольованими умовами чистоти повітря. Збереження прозорості, рН і ростових властивостей після мембранної стерилізації свідчить про високу якість методу, який відповідає вимогам ДФУ та Європейської фармакопеї [41].

ВИСНОВКИ

У результаті досліджень, спрямованих на вивчення впливу різних режимів автоклавування та мембранної стерилізації на властивості живильних середовищ, було зроблено такі висновки:

1. Обидва способи стерилізації є ефективними та надійними, придатними для знезараження живильних середовищ, що підтверджується відсутністю контамінації у всіх контрольних зразках. Статистично значущих відмінностей між показниками стерильності при використанні автоклавування та мембранної фільтрації не виявлено ($p \leq 0,05$), що свідчить про рівнозначну ефективність методів за умови дотримання технологічних параметрів.

2. Встановлено, що автоклавування при температурі 121 °C протягом 15–20 хв є оптимальним режимом для більшості стандартних живильних середовищ, таких як поживний агар, триптон-соєвий агар, Сабуро-декстрозний агар. Зазначений режим забезпечує повне знезараження середовища при збереженні його фізико-хімічних властивостей, рН, кольору та прозорості в межах допустимих фармакопейних норм.

3. З'ясовано, що мембранна стерилізація забезпечує високу якість очищення середовищ, не спричиняючи термічних або хімічних змін у складі. Фільтри Sartorius із розміром пор 0,22 мкм виявили кращу стабільність показників рН та ростових властивостей у порівнянні з фільтрами Cobetter (0,45 мкм), що підтверджує їх придатність для роботи з термолабільними компонентами, зокрема з білковими та вітамінними добавками.

4. Виявлено, що у разі автоклавування деяких складних або забарвлених середовищ (зокрема бульйону Мозеля) спостерігалось незначне зниження прозорості та часткове потемніння кольору, що пов'язано з термічними змінами компонентів. Мембранна фільтрація не викликала подібних ефектів, що дозволяє вважати її методом вибору для таких типів середовищ.

5. Показано, що рН середовищ після мембранної стерилізації залишався стабільним (зміна не перевищувала 0,1–0,2 одиниці), тоді як після

автоклавування у частині зразків спостерігалось незначне зниження рН на 0,2–0,3 одиниці.

6. Доведено, що комбіноване застосування короткочасного кип'ятіння та подальшої мембранної фільтрації є ефективним підходом для стерилізації середовищ, які містять нестабільні органічні компоненти. Така комбінація забезпечує повну стерильність за одночасного збереження ростових властивостей і фізико-хімічної стабільності середовища.

7. Узагальнено, що вибір методу стерилізації має ґрунтуватися на хімічному складі середовища, термостійкості його компонентів і призначенні у мікробіологічному аналізі. Для рутинних середовищ доцільним є автоклавування, для спеціальних діагностичних – мембранна фільтрація у стерильних умовах.

8. Отримані результати підтверджують відповідність випробуваних методів вимогам Державної фармакопеї України та Європейської фармакопеї щодо стерильності та ростових властивостей поживних середовищ, що дає підстави рекомендувати зазначені режими для лабораторної та виробничої практики у фармацевтичній і мікробіологічній галузях.

9. ДСП 9.9.5-080-02 «Правила влаштування і безпеки роботи в лабораторіях (відділах, відділеннях) мікробіологічного профілю». URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0001588-02#Text>

10. ДСП «Дезінфекція, передстерилізаційне очищення та стерилізація медичних виробів в закладах охорони здоров'я» – наказ МОЗ № 552 від 11.08.2014 р. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z1067-14/conv#n361>

11. ДСТУ 1.5:2015 Національна стандартизація. Правила розроблення, викладання та оформлення національних нормативних документів. – Київ, ДП «УкрНДНЦ», 2016. С. I–IV, 1–61. URL: https://udhtu.edu.ua/wp-content/uploads/2018/03/DSTY_1_5_2015.pdf

12. ДСТУ EN ISO 11140-1 – «Хімічні індикатори стерилізації. Частина 1. Загальні вимоги». URL: https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page.html?id_doc=86878

13. ДСТУ EN ISO 17665-1:2014 Стерилізація медичних виробів. Вологий жар. Частина 1. Вимоги до розробки, валідації та поточного контролю процесу стерилізації медичних виробів (EN ISO 17665-1:2006, IDT). URL: https://online.budstandart.com/ua/catalog/doc-page?id_doc=89765

14. ДСТУ EN-285:2019 Стерилізація. Стерилізатори парові. Стерилізатори великогабаритні. URL: <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0409774-19#Text>

15. ДСТУ ISO 13683 – «Стерилізація виробів медичного призначення. Вологий жар. Вимоги до валідації та контролю процесу стерилізації». URL: <https://redmedua.com/uk/article/272-dstu-ISO-136832003-sterilizaciya-medicinskih-izdeliy-trebovaniya-k-validacii-i-tekuschemu-kontrolyu-sterilizovanie-vlaghnym-teplom-v-medicinskih-uchrehdeniyah>

16. ДФУ 2.0, монографія «Вода для ін'єкцій» – вимоги до води, що застосовується у стерильних системах. URL: <https://mgmedkoledg.kl.com.ua/wp-content/uploads/2024/02/Kosyachenko-N.-M.-Navchalnyj-posibnyk-z-tehnologiyi-likiv.pdf>

17. ДФУ 2.0, монографія «Вода очищена» – стандарти для води, що використовують при приготуванні поживних середовищ. URL: <https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2019/02.pdf>

18. ДФУ 2.0, стаття 2.6.12 «Стерильність» – методики контролю стерильності живильних середовищ. URL: https://sphu.org/wp-content/uploads/2021/12/8_zhemerova.pdf

19. ДФУ 2.0, стаття 2.6.13 «Живильні середовища. Ростові властивості та перевірка стерильності». URL: <https://resource.odmu.edu.ua/chair/download/133396/8e5jKO8jRTCQxgSpdmmaBA/%D0%94%D0%A4%D0%A3%20%D1%874.pdf>

20. ДФУ Доповнення 1 (до ДФУ 2-го видання) – оновлені методики стерильної обробки та контрольних випробувань. URL: <https://sphu.org/napryamky-diyalnosti/viddil-dfu/zmist-proektu-dopovnennya-2-1>

21. ДФУ Доповнення 2 (до ДФУ 2-го видання) – доповнення до технологій стерилізації, вимог до стерильності лікарських засобів. URL: <https://sphu.org/napryamky-diyalnosti/viddil-dfu/zmist-2-go-dopovnennya-do-derzhavnoyi-farmakopeyi-ukrayiny-2-go-vydannya-dfu-2-2>

22. ДФУ Доповнення 5 – актуалізація фармакопейних статей і методик, зокрема тих, що стосуються стерильних препаратів. URL: https://sphu.org/wp-content/uploads/2024/09/dopolnenye_5_prikaz_2021.pdf

23. Е. Ю. Куліков, О. С. Чернишова, Н. О. Нікітіна. Електрофоретичні методи аналізу: ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2013. – 68 с. URL: <https://ekhnuir.karazin.ua/server/api/core/bitstreams/341a42b5-2eaf-4c04-a9c7-5cacbbd325fe/content>

24. Клепач Г., Паньків С., Деревянчук Г. Оцінка якості інфузійного лікарського засобу методами мікробіологічного контролю в умовах виробництва. Пріоритетні напрями досліджень в науковій та освітній діяльності: проблеми та перспективи: збірник матеріалів (тез) V Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю (23-24 жовтня 2025 року, Рівне, Україна). Рівне, 2025. С. 154-156. URL:

https://drive.google.com/file/d/1EeThDg1KCEKLiV0UwjRgS56HbjCcCFo6/view?usp=drive_link

25. Матеріали науково-практичної конференції «Актуальні питання ветеринарної медицини» URL: https://vetpharm.nuph.edu.ua/wp-content/uploads/2021/03/materiali_konferenciyi_17_03_2021_tom_2.pdf

26. Методи стерилізації. URL: <https://studfile.net/preview/1582556/page:2/>

27. Методи стерилізації. Принципи приготування середовищ для культивування мікроорганізмів URL: <https://studfile.net/preview/7781484/page:13/>

28. Мікробіологічний контроль у технології харчових виробництв. URL: <https://dspace.nuft.edu.ua/server/api/core/bitstreams/7c70366b-d8db-4e50-9a9b-e6797314b1d5/content>

29. Мікробіологічний практикум. Методичні вказівки URL: <https://ela.kpi.ua/server/api/core/bitstreams/1e99dc7d-33a1-48a3-8cbf-9f5747564b2b/content>

30. Наказ МОЗ України № 812 від 17.10.2012 «Про затвердження Правил виробництва та контролю якості лікарських засобів в аптеках».

31. Основи біотехнології. Тема 2. Мікроорганізми у біотехнології URL: <https://studfile.net/preview/5280072/page:3/>

32. Основи мікробіології: методи визначення рН середовища URL: <https://studfile.net/preview/8764349/page:9/>

33. Основи мікробіології: стерилізація та дезінфекція URL: <https://studfile.net/preview/5280407/page:4/>

34. Перевірка стерилізації за використанням біологічних індикаторів. URL: https://www.uwindsor.ca/chemical-control-centre/sites/uwindsor.ca.chemicalcontrolcentre/files/biological_indicator_testing_procedures_ver_1_biosafety_program.pdf

35. «Посібник. Основи виробництва лікарських засобів» – опис технологічних підходів, включно зі стерилізацією та контролем якості. URL: <https://resource.odmu.edu.ua/chair/download/133395/yUzNuQD6P7GCg2Y873.pdf>

36. Ракс В.А., Єсауленко А.М. Сучасна хроматографія на гребні хвилі прогресу. Навчальний посібник. К.: Аванпост, 2014. – 168 с. URL: https://library.kpi.kharkov.ua/files/new_postupleniya/cuhrng.pdf

37. «Способи стерилізації живильних середовищ, посуду й інших лабораторних матеріалів». URL: <https://studfile.net/preview/7077821/page:37/>

38. Стерилізація в харчовій промисловості. URL: <https://www.c3n.info/registration/content/ua1622/pages/fl9797.html>

39. Стерильність URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/article/645/sterilnist>

40. СТ-Н МОЗУ 42-4.0:2020 Лікарські засоби. Належна виробнича практика. URL: <https://compendium.com.ua/uk/clinical-guidelines-uk/standartizatsiya-farmatsevtichnoyi-produktsiyi-tom-3/st-n-mozu-42-4-0-2020/>

41. СТ-Н МОЗУ 42-4.0/1:2023. Лікарські засоби. Належна виробнича практика. Додаток 1. Виробництво стерильних лікарських засобів. URL: <https://www.dls.gov.ua/wp-content/uploads/2023/08%BA%D0%B8%D1%85..pdf>

42. Фактори, що впливають на розвиток мікроорганізмів URL: <https://studfile.net/preview/9731715/page:4/>

43. «Фармацевтична технологія. Інтерактор» (навчальний посібник) – огляд методів стерилізації, їх вплив на речовини, приклади застосування у фармації. URL: <https://dspace.mphu.edu.ua/bitstream.pdf>

44. Хімічні властивості розчинів. Кислотність та pH URL: <https://studfile.net/preview/5063244/page:28/>

45. Що таке pH та навіщо його вимірюють URL: https://nanomarket.ua/shcho-take-ph-ta-navishcho-yogo-vimiruut/?srsltid=AfmBOop6ci_jQ6TmC5OemcTPUBwvLKW08E3iwx-eLIP6qE2PsoRtwDOi

46. A Review of Foodborne Illness in America from 2002–2011. Washington: Center for Science in the Public Interest. 2014. pp. 23-67. URL: <https://www.cspi.org/sites/default/files/media/documents/resource/outbreakalert2014.pdf>.

47. Aitio A., Riihimäki V. «Management of biomedical waste in Ontario. New Delhi: Ministry of Health and Family Welfare», 1990. P.82 URL: https://www.uwo.ca/humanresources/biosafetycom/biosafety/June_24_09/MOE_2008_C4_Revisions_DRAFT.pdf
48. Anderson R.L., Carr J.H., Bond W.W., Favero M.S. Susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to environmental disinfectants. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997. Vol. 18, N. 3. P. 195–199. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9090548/>
49. Avalos K., Marsellés-Fontanet A., Martín-Belloso O., Soliva-Fortuny R. Impact of pulsed light treatments on antioxidant characteristics and quality attributes of fresh-cut apples. *Innov Food Sci Emerg Tech.* 2016. Vol. 33. pp.6–15. URL: https://www.researchgate.net/publication/284132537_Impact_of_pulsed_light_treatments_on_antioxidant_characteristics_and_quality_attributes_of_fresh-cut_apples
50. Baqai R., Saleem H. Microwave oven in microbiology laboratory. *JPMIA.* 1992. P. 42-46. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1545479/>
51. Barz, D.P.J., Ehrhard. P., Model and verification of electrokinetic flow and transport in a micro-electrophoresis device, *Lab Chip*, 2005, 5, 949-958. URL: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2005/lc/b503696h>
52. Baskin E.F., Bukshpan S, Zilberstein G. V. (2006). pH-induced intracellular protein transport. *Physical Biology.* 3 (2): pp. 101-106. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16829696/>
53. Bhattacharjee M.K., Sugawara K., Ayandegi O.T. Microwave sterilization of growth medium alleviates inhibition of *aggregatibacter actinomycetemcomitans* by maillard reaction products. *J. Microbiol. Meth.* 2009. Vol. 78, N.2. pp. 227–230. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19524624/>
54. Bhowmik G. Introduction to the Laboratory. Analytical techniques in biotechnology. New Delhi: Tata McGraw-Hill Education, 2011. pp. 27–28. URL: <https://www.scribd.com/document/961492826/Analytical-Techniques-in-Biotechnology-A-Complete-Laboratory-Manual-1st-Edition-Goutam-Bhowmik-ebook-legacy-edition>

55. Buszewski, B., Dziubakiewicz, E., Szumski, M. Electromigration Techniques: Theory and Practice. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. 357 p. ISBN 978-3-642-35043-6. DOI: 10.1007/978-3-642-35043-6.

56. Cholak J. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. 89 p. URL: https://www.cdc.gov/labs/pdf/SF__19_308133-A_BMBL6_00-BOOK-WEB-final-3.pdf

57. Elizabeth L., Machado P., Lawrence M. Ultra-processed foods and health outcomes: A narrative review. *Nutrients*. 2020. N.12. P. 55–87. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32630022/>

58. Everaerts, Frans M., Beckers, Jo L., Verheggen, Theo P. E. M. Isotachophoresis: Theory, Instrumentation and Application. — Amsterdam : Elsevier Scientific Publication Company, 1976. — 418 p. DOI: 978-0444414304.

59. Experimental Mycology. Laboratory manual 2017–2018 URL: https://mycology.univer.kharkov.ua/wp-content/uploads/2018/02/Experimental_mycology_2017-2018.pdf

60. Forbes B. A., Sahm D. F., Weissfeld A. S. Indian Pharmacopeia. New Delhi: Ministry of Health and Family Welfare, 2018. 343 p. URL: <https://www.himedialabs.com/media/TD/M2115.pdf>

61. Glass R.T., Conrad R.S., Bullard J.W., Goodson L.B. Evaluation of cleansing methods for previously worn prostheses. *Compend. Contin. Educ. Dent*. 2011. Vol. 32, N.71. P. 68-73. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21560745/>

62. Grandjean P. Non-Incineration Technologies for Treatment of Biomedical Waste (Procedures for Microbiological Testing). Baltimore: Williams & Wilkins, 1990. 144 p. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/367/836/peg-and-peo-for-medical-devices-mk-br9359en-mk.pdf>

63. Hussain M.A., Gooneratne R. Understanding the fresh produce safety challenges. *Foods*. 2017. N.6. P. 23–24. URL: <https://www.mdpi.com/2304-8158/6/3/23>

64. Isenberg H.D. Clinical Microbiology Procedures Handbook: 2nd Edition. Baltimore: Williams & Wilkins, 1995. 145 p. URL: <https://en-microb.iiums.ac.ir/uploads/550/2023/Jul/15/Isenberg.pdf>

65. Jahn, G. C., Hall, D.W., and Zam, S. G. 1986. A comparison of the life cycles of two *Amblyospora* (Microspora: Amblyosporidae) in the mosquitoes *Culex salinarius* and *Culex tarsalis* Coquillett. *J. Florida Anti-Mosquito Assoc.* 57, 24-27. URL:

https://www.researchgate.net/publication/229691889_Life_Cycle_and_Epizootiology_of_Amblyospora_sp_Microspora_Amblyosporidae_in_the_Mosquito_Aedes_cantator1

66. Jankovic S.M., Milorad Z., Milosev Milan, Novakovic L.J. The effects of microwave radiation on microbial cultures. *HOPH.* 2014. Vol. 1, N.2. P. 102-108. URL:

https://www.researchgate.net/publication/311551549_The_effects_of_microwave_radiation_on_microbial_cultures

67. Jorgensen J.H., Pfaller M.A., Carroll K.C. Manual of Clinical Microbiology, *J Appl Bact.* 2015. Vol. 1. P. 45-87. URL: <https://archive.org/details/carroll-karen-c.-jorgensen-james-h.-pfaller-michael-a-manual-of-clinical-microbi>

68. Khattak MN, Matthews RC. Genetic relatedness of *Bordetella* species as determined by macrorestriction digests resolved by pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Syst Bacteriol.* 1993 Oct;43(4):659-64. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8240949/>

69. MacFaddin J. F. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins, 1985. 267 p. URL: <https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/9781420005462/handbook-media-clinical-microbiology-ronald-atlas-james-snyder>

70. National Outbreak Reporting System. URL: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>.

71. Procedure for preparation of soy casein medium for testing sterility. URL: https://exodocientifica.com.br/_technical-data/M011.pdf

72. Prijana C., Yanti M., Basuki H. Roles of microwave oven in preparation of microbiological growth media. *AMJ*. 2016. Vol. 3, N.1. P. 1-3. URL: <https://journal.fk.unpad.ac.id/index.php/amj/article/view/469>

73. Rock M. Ultraviolet and ultrasonic sterilization methods. *Med Tech (Stuttg)*. 1952. Vol. 72, N.11. P. 249-250. URL: <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/4/2202>

74. Rutala W.A., Weber D.J. New disinfection and sterilization methods. *Emerg Infect Dis*. 2001. Vol. 7, №2. P. 348-353. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2631727/>

75. Schmidt H.J., Rand R.E. «Biological Monitoring: Does your system tell you all you need to know? Infection Control Rounds», 1987. N.3. P. 1-4. URL: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/4/1050>

76. Shim, J., Dutta, P., Ivory, C. F., Modeling and simulation of IEF in 2-D microgeometries, *Electrophoresis*, 2007, 28, 527-586. URL: <https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/elps.200600402>

77. Spencers R.C., Hafiz C.C. Effect of microwave energy on the metabolism of enterobacteriaceae. *J. Med. Microbil*. 1985. N.19. P. 269-272. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852402001694>

78. Tarek A.R., Rasco B.A., Sablani S.S. Ultraviolet-C light sanitization of English cucumber (*Cucumis sativus*) packaged in polyethylene film. *J Food Sci*. 2016. Vol. 81. P. 14–30. URL: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1750-3841.13314>

79. The United States Pharmacopeia. The United States Pharmacopeial Convention. Rockville: MD, 2018. 345 p. URL: <https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=zNr3YaoNZvQC&oi=fnd&pg=PR5&dq=80.%09The+United+States+Pharmacopeia.+The+United+States+Pharmacop eial+Convention.+Rockville&ots>

80. Touchstone, J. C. (1992). Practice of Thin Layer Chromatography. 3rd Edition. New York: John Wiley & Sons. URL:

<https://books.google.com.ua/books?hl=uk&lr=&id=DP2UhvuR5cwC&oi=fnd&pg=PA1&dq=81>

81. Vaid A., Bishop A.H. The destruction by microwave radiation of bacterial endospores and amplification of the released DNA. *J. Appl. Microbiol.* 1998. Vol. 85. P. 115-122. URL: https://www.google.com.ua/books/edition/Review_of_Medical_and_Veterinary_Entomol/tweT2ThE4fIC?hl=uk&gbpv=1&dq=82.%09Vaid+A.,+Bishop+A.H.+The+destruction+by+microwave+radiation+of+bacterial+endospores+and+amplification+of+the+released+DNA&pg=PA702&printsec=frontcover

82. Vesterberg, O. History of Electrophoretic Methods // *Journal of Chromatography*. 1989. T. 480. C. 8-19. DOI:10.1016/S0021-9673(01)84276-X.

83. Walsh S.E., Maillard J.Y., Russell A.D. Ortho-phthalaldehyde: a possible alternative to glutaraldehyde for high level disinfection. *J Appl Microbiol.* 1999. Vol. 86, N.6. P. 1039–1046. URL: https://www.google.com.ua/books/edition/Handbook_of_Isoelectric_Focusing_and_Pro/nKINDSnVOMAC?hl=uk&gbpv=1&dq=83.%09Vesterberg,+O.+History+of+Electrophoretic+Methods+//+Journal+of+Chromatography&pg=PA35&printsec=frontcover

84. Wedum A.G., Hanel E. Jr., Phillips G.B. Ultraviolet sterilization in microbiological laboratories. *Public Health Rep.* 1956. Vol. 71, N.4. P. 331-336. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC2031103/>

85. Westermeier, R. Electrophoresis in Practice. 4th edition. Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005. 426 p. DOI: 978-3-527-31181-5.

86. Woo I.S., Rhee I.K., Park H.D. Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure. *Appl. and Environmental Microbiol.* 2000. Vol. 66. P. 2243–2247. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC101483/>

87. Yoo J.H. Review of Disinfection and Sterilization - Back to the Basics. *Infect Chemother.* 2018. Vol. 50, N.2. P. 101-109. URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29968977/>