

УДК 678.555

## КОМПОЗИТ АГАР/Na-КМЦ – ЭФФЕКТИВНАЯ СРЕДА ДЛЯ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ\*

© **И.И. Осовская<sup>1\*\*</sup>, А.Е. Баранова<sup>1</sup>, А.В. Курзин<sup>1</sup>, В.И. Рощин<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Высшая школа технологии и энергетики, ул. Ивана Черных, 4, Санкт-Петербург, 198095, Россия, [iraosov@mail.ru](mailto:iraosov@mail.ru)

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет имени С.М. Кирова, Институтский пер., 5, Санкт-Петербург, 194021, Россия

Разработан способ получения композита агар/натрий-карбоксиметилцеллюлоза с целью его использования в микробиологической практике. Исследованы физико-химические и коллоидно-химические свойства полученного композита (поверхностное натяжение, растворимость, набухание, микроскопия). Изучена гелеобразующая и пленкообразующая способность композита при различных соотношениях компонентов. Для характеристики природы химических связей измерены ИК-спектры пленок композита при различных соотношениях агара и натрия карбоксиметилцеллюлозы. Изученный композит применили в качестве питательной среды в микробиологии. Оптимизированы условия создания питательной среды. Использовали поверхностный метод культивирования. Выявлено оптимальное время и температура выращивания микроорганизмов. Определено соотношение полимерных компонентов в питательной среде. Получены снимки микроорганизмов на биологическом исследовательском микроскопе МБР-3 с разрешением в 100 крат в течение всего времени выращивания. Рост микроорганизмов контролировали программой OpenCFU для подсчета колониеобразующей единицы. Максимальное количество выращенных колоний соответствует соотношению агар/натрий карбоксиметилцеллюлоза – 3 : 1. Показана целесообразность использования композита для культивирования бактериальных клеток *in vitro*. Результаты данного исследования можно рекомендовать к использованию композита в пищевой, текстильной, целлюлозно-бумажной промышленности в качестве стабилизатора, эмульгатора, полиамфолита с высокой сорбирующей способностью.

*Ключевые слова:* агар, гелеобразование, композит Агар/Na-КМЦ, ИК-спектроскопия, рост микроорганизмов.

**Для цитирования:** Осовская И.И., Баранова А.Е., Курзин А.В., Рощин В.И. Композит Агар/Na-КМЦ – эффективная среда для роста микроорганизмов // Химия растительного сырья. 2024. №3. С. 71–80. DOI: 10.14258/jcprm.20240313610.

### **Введение**

Сегодня многие инновационные технологии находятся за пределами традиционных способов выделения ценных продуктов из древесины, отходов сельскохозяйственных культур [1–3]. Учеными университетов и научных коллективов ведется активный поиск новых технологических решений в использовании морских водорослей в биотехнологии и биоинженерии. В последние годы широко разворачиваются работы по извлечению биологически активных веществ из морских водорослей. Помимо антибактериальных свойств, благодаря наличию аминокислот, витаминов, они оказывают тонизирующее воздействие на организм [4]. Можно отметить множество работ по совершенствованию и удешевлению способов выделения ценных препаратов из бурых, красных и зеленых водорослей [5–8].

Одним из важных продуктов красных морских водорослей (рис. 1) является агар [9, 10]. Агар – это высушенный, аморфный, незотистый экстракт из красных водорослей. Агар состоит из практически нейтрального полимера (агарозы) и ионизированного (агаропектина) – в массовом соотношении 7 : 3 соответственно [11]. Основное вещество агара – агароза, представляет собой кальциевую соль кислого эфира серной кислоты и углеводного комплекса [12, 13].

\* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20240313610s

\*\* Автор, с которым следует вести переписку.

Агар – это галактан из чередующихся 1,3-связанных  $\beta$ -D-галактопиранозы и 1,4-связанных 3,6-ангидро- $\alpha$ -L-галактопиранозы (рис. 2). Агар широко применяется в медицине, используется в противовоспалительных средствах, в качестве асептической повязки, перевязочных средств и гидрогелевых покрытий для лечения ожоговых ран [13–15]. В фармакологии применяется для капсулирования лекарственных препаратов. Высокая стойкость агара к действию микробов позволяет применять его в бактериологической практике при изготовлении полужидких и плотных питательных сред для культивирования микроорганизмов при диагностике болезней животных и человека, а также для контроля микробиологического заражения нефтепродуктов, лесохимических продуктов [16]. В настоящей работе получали плотную питательную среду для культивирования микроорганизмов при 1.0 масс.% концентрации раствора агара, обеспечивающей устойчивое гелеобразование. В литературе описаны способы использования различных полисахаридов в качестве закрепляющей основы [17, 18]. Разработка методов культивирования микроорганизмов предполагает доступность и низкую стоимость используемых материалов [19]. В данной работе в качестве закрепляющей основы используется натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ) в различных соотношениях с агаром. Опыт использования Na-КМЦ в качестве компонента питательной среды практически отсутствует. Использование коммерчески доступного Na-КМЦ, хорошо зарекомендовавшего себя как биоинертный, нетоксичный и биodeградируемый материал, применяемый в различных сферах лечебной деятельности, представляет научную и практическую значимость.

В связи с этим целью данной работы является оптимизация условий создания эффективного композита агар/Na-КМЦ для его применения в бактериологической практике.



Рис. 1. Красная водоросль семейства ламинариевых Белого моря

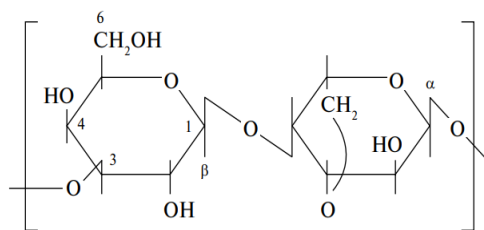


Рис. 2. Структурная формула агара

### Экспериментальная часть

**Реактивы и материалы.** В работе использовали агар (Sigma-Aldrich, Индия), водорастворимый эфир целлюлозы – натрий-карбоксиметилцеллюлозу (Na-КМЦ) (ООО «Завод Карбоцел», Россия). Для приготовления растворов применяли свежekiпяченую и охлажденную дистиллированную воду.

**Получение пленок.** Исследуемые пленки готовили из растворов агара и Na-КМЦ. Для этого помещали 1 г агара и 1 г Na-КМЦ (в соотношении 1 : 1) в термостойкий стакан с дистиллированной водой объемом 100 мл. Растворяли на водяной бане при постоянном перемешивании в течение 40 мин. Была установлена температура растворения, которая составила 85 °С. Полноту растворения контролировали по отсутствию набухших частиц полимера на стенках колбы при ее наклоне. Аналогично готовили растворы при соотношении Агар/Na-КМЦ 3 : 1, 6 : 1 и 9 : 1 соответственно. 25 мл готового раствора наливали в форму из фторопласта размером 8×8 см, высотой 0.5 мм. Образующиеся пузырьки воздуха удаляли прокалыванием. Раствор оставляли на воздухе на 48 ч для удаления растворителя и образования пленки.

ИК-спектры пленок толщиной 0.4 мм получены на Фурье-спектрометре FTIR 8400S (Shimadzu) на приставке нарушенного полного внутреннего отражения с алмазной призмой. Важным показателем для пленкообразующих веществ являются их коллоидно-химические свойства. Определение поверхностного натяжения проводили на приборе Дю-Нуи при температуре 25 °С по методике [20]. По зависимости поверхностного натяжения от концентрации растворов определяли критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ). Из ККМ рассчитывали поверхностную активность по формуле:

$$G = \frac{\sigma_0 - \sigma_{ККМ}}{\sigma_{ККМ}},$$

где  $\sigma_0$  – поверхностное натяжение на границе с воздухом, мН/м;  $\sigma_{ККМ}$  – поверхностное натяжение растворов ПАВ на границе с воздухом при ККМ, мН/м.

*Растворимость пленок.* Образцы пленки агара массой 1 г растворяли в 100 г воды в интервале температур 25–80 °С, через каждые 5 мин взвешивали для определения растворимости.

*Набухание пленок.* Из образовавшихся пленок вырезали образцы прямоугольной формы (20×30 мм). Время набухания образцов составило от 30 до 300 мин. Степень набухания определяли весовым методом через каждые 30 мин. Результаты измерений получены из трех параллельных опытов [10].

При приготовлении питательных сред проводили контроль качества студня: прозрачность и окраску. Органолептические показатели студней соответствовали ГОСТ 31412-2010. Питательную среду при соотношении 1 : 1 готовили смешением 1 масс.% раствора агара и 1 масс.% раствора Na-КМЦ в дистиллированной воде при температуре 85±5 °С. Аналогично готовили растворы при соотношении Агар/Na-КМЦ 3 : 1, 6 : 1 и 9 : 1 соответственно. Чашки Петри перед использованием стерилизовали при 160 °С в муфельной электропечи ПМ-12МЗ с терморегулятором РТ-1200. Питательную среду объемом 50 мл разливали в чашки Петри. Микроорганизмы выращивали поверхностным методом культивирования [21–24]. Через сутки исследуемый материал высаживали на поверхность твердой питательной среды при температуре 25 °С. Биоматериалом для исследования являлся буккальный соскоб, который наносили кругами по всей поверхности питательной среды [25]. За образованием микроорганизмов наблюдали в течение 5 недель до прекращения их роста. Рост микроорганизмов контролировали программой OpenCFU, обеспечивающей подсчет колониеобразующих единиц (КОЕ). Программа включает ручные и автоматические фильтры, исключающие бактерии-загрязнители и пузыри. Выбранный объект автоматически анализируется программой, выделяя выращенные колонии [26]. Средняя относительная погрешность расчета колоний микроорганизмов по программе OpenCFU – 0.2% [26]. Количество КОЕ отражает точность метода и обозначается двумя значащими цифрами. КОЕ рассчитывается по формуле:

$$КОЕ / мл = \frac{n \cdot k}{V},$$

где n – число колоний в исследуемом образце биоматериала; V – объем биоматериала, V=0.1 мл; k – коэффициент разбавления биоматериала, равный  $1 \times 10^{-2}$ .

### **Обсуждение результатов**

На основании полученных экспериментальных данных была построена зависимость поверхностного натяжения от концентрации растворов (рис. 3). В точке перехода к горизонтальному участку изотермы наступает критическая концентрация мицеллообразования, т.е. достигается такое поверхностное натяжение, после которого оно не может понижаться. Для агара поверхностное натяжение при концентрации от 0.05 масс.% остается постоянным, это связано с ассоциацией частиц с образованием мицелл. Полученные результаты представлены в таблице 1. Как следует из рисунка 3 и таблицы 1, поверхностная активность смесей агара с Na-КМЦ ухудшается при любых соотношениях. Низкая поверхностная активность улучшает диффузию и перемешивание питательных веществ внутри среды.

На рисунке 4 представлена зависимость растворимости пленки агара от времени при различных температурах. Как следует из рисунка 4, полное растворение пленки из агара происходит при 80 °С в течение 5 мин. В интервале температур 60–80 °С наблюдается частичное растворение пленки; при температуре менее 60 °С растворения не происходит.

На рисунке 5 показана зависимость степени набухания пленок в воде при различных температурах. Максимальная степень набухания для всех пленок характерна при 60 °С и с возрастанием температуры степень набухания понижается.

При температуре выше 90 °С наблюдается полное растворение пленки в воде, обусловленное термодеструкцией макромолекул, типичной для анионных полиэлектролитов (рис. 5) [10]. Зависимость степени набухания пленки в воде от времени характеризует ограниченное набухание пленки при температуре 25 °С (рис. 6). По мере уменьшения концентрации агара в пленке композита степень набухания увеличивается. Изменение степени набухания пленки в воде для соотношения 3 : 1 имеет высокие показатели, что может привести к легкому растворению компонентов и их равномерному распределению в среде.

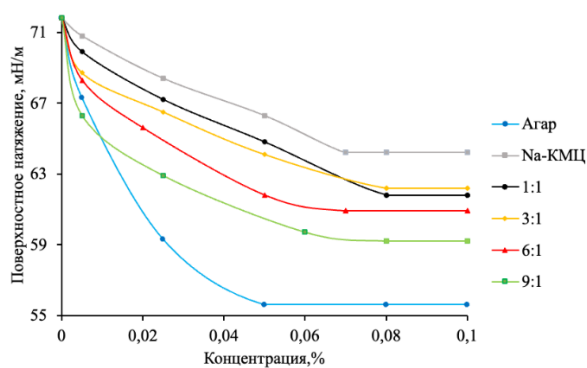


Рис. 3. Зависимость поверхностного натяжения от концентрации в растворе

Таблица 1. Критическая концентрация мицеллообразования

Состав раствора (Агар/Na-КМЦ)	ККМ, %	Поверхностная активность, Г,мН·м <sup>2</sup> /кг
Агар	0,05	32,4
Na-КМЦ	0,07	10,8
1 : 1	0,08	12,5
3 : 1	0,08	12
6 : 1	0,07	15,6
9 : 1	0,06	21

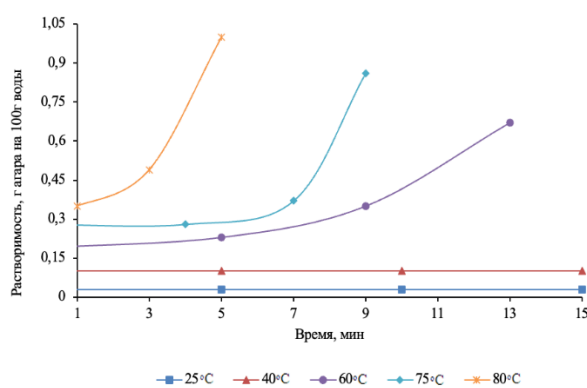
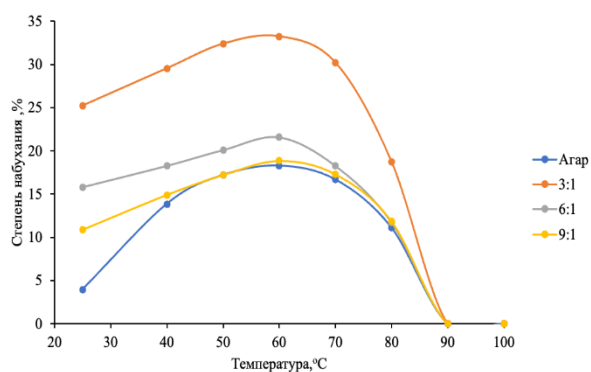
Рис. 4. Зависимость растворимости пленки агара в H<sub>2</sub>O от времени растворения при различных температурах

Рис. 5. Зависимость степени набухания пленок Агар/Na-КМЦ от температуры

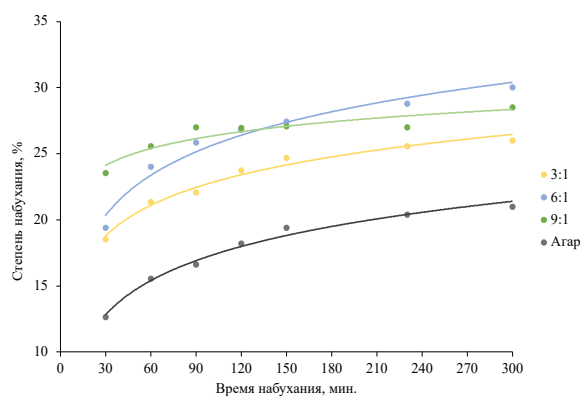


Рис. 6. Зависимость степени набухания пленок Агар/Na-КМЦ от продолжительности

Для характеристики природы химических связей измерены ИК-спектры пленок чистого агара и композита агар/NaКМЦ в различных соотношениях. На спектрах хорошо видны полосы поглощения при 1250 см<sup>-1</sup> и плечо в области 800–850 см<sup>-1</sup>, что позволяет говорить о наличии сульфатных групп, но не позволяет однозначно установить их положение. Хорошо выраженная полоса поглощения при 933 см<sup>-1</sup>, характер-

ная для колебаний С-О 3,6-ангидрогалактозы, и плечо в области  $850\text{ см}^{-1}$ , соответствующее вторичной аксиальной сульфатной группе при атоме С-4 1,3- $\beta$ -D-галактозы, позволяют предполагать присутствие дисахаридных звеньев, аналогичных каппа-карагинану. Соотношение интенсивности поглощения при  $1250\text{ см}^{-1}$  и  $2930\text{ см}^{-1}$  не изменяются для смесей агара с КМЦ по сравнению с чистым агаром, что позволяет утверждать, что сульфатные группы не изменяются при получении подобных смесей.

Отсутствие явной полосы поглощения  $805\text{ см}^{-1}$  может свидетельствовать об отсутствии вторичной аксиальной сульфатной группы при атоме С-2 3,6-ангидро-D-галактозы.

Полосы поглощения в области  $1000\text{--}1200\text{ см}^{-1}$  присущи полисахаридам, образованным пиранозными звеньями, поэтому наблюдаются на всех спектрах и не могут быть использованы для идентификации исходных соединений и продуктов взаимодействия.

Полосы в области  $3000\text{--}2750\text{ см}^{-1}$  обусловлены валентными колебаниями С-Н связей (например,  $2901$ ,  $2893$ ,  $2939\text{ см}^{-1}$ ), характерными как для КМЦ, так и для агара и их смесей. Полосы, в том числе в виде плеча (несимметричного уширения пика), вызванные деформационными колебаниями метильных и метиленовых групп, расположены в областях  $1470\text{--}1430$  ( $\text{CH}_3$ ,  $\text{CH}_2$ ),  $1404\text{--}1350$  ( $\text{CH}_3$ ) и около  $700\text{ см}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$ ). Отсутствует высокочастотная полоса с максимумом в области  $2970\text{--}2980\text{ см}^{-1}$ , наблюдаемая в других полисахаридах.

Плечо в области  $1430\text{--}1420\text{ см}^{-1}$  соответствует ножничным колебаниям метиленовой группы. Эту полосу в химии полисахаридов связывают со степенью кристалличности: чем более аморфна структура, тем слабее эта полоса. Полоса в области  $890\text{ см}^{-1}$  характерна для  $\beta$ -конфигурации у первого углеродного атома пиранозного кольца, иногда ее называют полосой аморфности, так как ее интенсивность инверсна степени кристалличности полисахарида. Эта полоса хорошо заметна у агара и его смесей с КМЦ, что свидетельствует против образования ковалентных связей между этими полисахаридами.

Наличие полосы поглощения в области  $3670\text{--}3590\text{ см}^{-1}$  в спектрах агара и его смесей с КМЦ говорит о наличии гидроксильных групп в свободном состоянии. Отсутствие уширения полосы в области  $3550\text{--}3100\text{ см}^{-1}$  в спектрах пленок смесей агара и КМЦ по сравнению со спектром пленки исходного агара говорит о том, что не происходит образования значительного количества внутри- и межмолекулярных связей.

В спектрах смесей КМЦ и агара присутствует хорошо заметная полоса в области  $1600\text{ см}^{-1}$  (валентные ассиметричные колебания ионизированной карбоксильной группы), отсутствующая в спектре исходного агара.

Несимметричность полосы  $1700\text{--}1500\text{ см}^{-1}$  может быть вызвана наличием адсорбированных молекул воды, деформационные колебания связи О-Н которой вызывают поглощение в области  $1650\text{--}1630\text{ см}^{-1}$ .

Валентные колебания моста С-О-С гликозидной связи между пиранозными единицами приводят к появлению полос в области  $1150\text{ см}^{-1}$  (ассиметричные колебания) и  $1191\text{ см}^{-1}$  (симметричные колебания), хорошо выраженных в спектре агара и его смесей с КМЦ.

Интенсивная ассиметричная полоса с экстремумом  $1020\text{ см}^{-1}$  соответствует валентным колебаниям связи С-О и включает в себя более слабые сигналы, например, в области  $1050\text{ см}^{-1}$ , соответствующие валентному колебанию С-О-связи у третьего атома углерода в цикле.

О том, что не происходит образования химических связей за счет кислотных групп, говорит тот факт, что не наблюдается смещения полос, соответствующих карбоксильным и сульфатным группам. Образование химической связи (ковалентной или водородной связи) между функциональными группами взаимодействующих полимеров приводит к тому, что требуется более высокая энергия для возбуждения валентных колебаний в связанной в комплекс функциональной группе. В таком случае частота валентных колебаний должна была бы сместиться в область более высокочастотных колебаний.

Снимки питательной среды с выращенными бактериями получали биологическим исследовательским микроскопом МБР-3, предназначенным для исследования прозрачных препаратов в проходящем свете, с разрешением в 100 крат [27]. На третьи сутки появились визуально гладкие молочно-белые, беловато-кремовые с тусклым блеском мелкие, круглые колонии, которые к 11-му дню выращивания достигли размеров  $1.0\text{--}1.5\text{ мкм}$  в диаметре и сформировали легкое помутнение. Выросшие колонии по морфологическим признакам, согласно атласу медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии, являются бактериями рода *Candida* [28]. Грибки *Candida* в норме присутствуют на слизистой. В полости рта их обнаруживают у 25–60% здоровых людей, при этом *Candida* не является патогенным для организма человека [29, 30].

На 14-е сутки культивирования на образцах появились мелкие  $0.5\text{ мм}$  в диаметре гладкие, маслянистые, розовато-белого цвета колонии. Они представляют собой мелкие кокки (бактерии шаровидной формы), рас-

положенные попарно в виде скоплений или коротких цепочек. Согласно перечисленным признакам – это бактерии рода *Veillonella* [28]. На образце питательной среды Агар/Na-КМЦ 9 : 1 бактерии *Veillonella* образовались к концу исследования. *Veillonella* являются представителями нормальной микрофлоры полости рта и верхних дыхательных путей в организме человека [25]. Для всех исследованных сред состав микрофлоры был одинаков, что свидетельствует об отсутствии специфического действия компонентов исследованных сред на микроорганизмы. На рисунке 7а представлен анализ роста колоний на агаровой пластине. При увеличении времени число микроорганизмов возрастает и с четвертой недели практически не изменяется. На рисунке 7б показан рост микроорганизмов на питательной среде различного состава при температуре 25 °С на 5 неделе.

Расчет жизнеспособных бактериальных клеток выражается в КОЕ/мл (CFU/ml) [26]. При правильном результате число колоний должно быть в интервале от 30 до 300. Результаты расчетов колоний микроорганизмов и КОЕ представлены в таблице 2.

Наиболее чувствительным композитом к росту микроорганизмов является Агар/Na-КМЦ при соотношении 3 : 1. Сорбция микроорганизмов происходит на отдельных молекулах композита, т.е. когда раствор является гомогенным. Таким образом, гетерогенный раствор, содержащий крупные мицеллы, менее предпочтителен для культивирования бактериальных клеток [31].

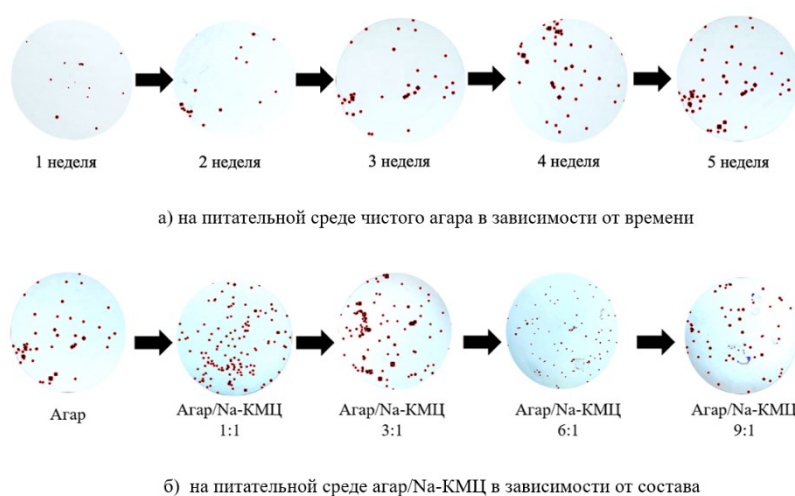


Рис. 7. Анализ роста микроорганизмов

Таблица 2. Зависимость содержания микроорганизмов от состава питательной среды

Состав питательной среды (Агар/Na-КМЦ)	Количество колоний микроорганизмов	КОЕ/мл
Агар	55	$0.55 \times 10^6$
1 : 1	112	$1.12 \times 10^6$
3 : 1	269	$2.69 \times 10^6$
6 : 1	75	$0.75 \times 10^6$
9 : 1	64	$0.64 \times 10^6$

### Выводы

Исследованы физико-химические и коллоидно-химические свойства композита Агар/Na-КМЦ (поверхностное натяжение, растворимость, набухание). При различных соотношениях агара и Na-КМЦ оптимизированы условия создания питательной среды для культивирования бактериальных клеток *in vitro*. Рассчитана колониеобразующая единица агара и композита Агар/ Na-КМЦ. Показано, что гомогенный раствор, содержащий отдельные молекулы, предпочтителен для культивирования бактериальных клеток. На основании экспериментальных данных композит Агар/Na-КМЦ может быть использован в микробиологии для качественной и количественной оценки бактериальных клеток исследуемого биоматериала. Реализация использования композита Агар/Na-КМЦ в микробиологической практике позволяет заменить долю импортного агара на недорогой коммерчески доступный Na-КМЦ. Результаты изучения композита Агар/Na-КМЦ, полученные в настоящей работе, могут быть использованы не только в микробиологической практике, но и в медицине, ветеринарии, пищевой промышленности, что позволяет значительно сократить финансовые затраты.

**Дополнительная информация**

В электронном приложении к статье (DOI: <http://www.doi.org/10.14258/jcprtm.20240313610s>) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

**Финансирование**

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Санкт-Петербургского государственного университета промышленных технологий и дизайна Высшая школа технологии и энергетики и Санкт-Петербургского государственного лесотехнического университета имени С.М. Кирова. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

**Конфликт интересов**

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Открытый доступ**

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

**Список литературы**

1. Токбаева А.А., Репнин А.Ф., Рошин В.И. Перспективы применения терпеновых углеводов, выделенных из корней борщевика (*Heracleum Sp.*) // Альманах научных работ молодых ученых университета ИТМО. 50-я научная и учебно-методическая конференция Университета ИТМО. СПб., 2021. С. 167–170.
2. Шеплякова В.Э., Рошин В.И. Групповой состав и фенольные соединения листьев борщевика сосновского // Леса России: политика, промышленность, наука, образование: материалы VII Всероссийской научно-технической конференции. СПб., 2022. С. 400–403.
3. Репнин А.Ф., Рошин В.И. Сравнение компонентного состава фенольных соединений корней борщевика сосновского осеннего и летнего сборов // Леса России: политика, промышленность, наука, образование: материалы VI Всероссийской научно-технической конференции. СПб., 2021. С. 112–114.
4. Боголицын К.Г., Каплицин П.А., Кашина Е.М., Иванченко Н.Л., Кокрятская Н.М., Овчинников Д.В. Особенности минерального состава бурых водорослей Белого и Баренцева морей // Химия растительного сырья. 2014. №1. С. 243–250. DOI: 10.14258/jcprtm.1401243.
5. Приходько А.А., Осовская И.И., Баранова А.Е. Выделение полифенольных экстрактов из биомассы бурых фукусовых водорослей рода *fucus vesiculosus* // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета технологии и дизайна. 2021. №2. С. 117–121. DOI: 10.46418/2079-8199\_2021\_2\_19.
6. Подкорытова А.В., Рошина А.Н. Морские бурые водоросли – перспективный источник БАВ для медицинского, фармацевтического и пищевого применения // Труды ВНИРО. 2021. Т. 186. С. 156–172. DOI: 10.36038/2307-3497-2021-4-156-172.
7. Муравьева Е.А. Комплексная технология получения экстрактивных бав из бурых водорослей Белого моря // Рыбпром: технологии и оборудование для переработки водных биоресурсов. 2010. №3. С. 54–57.
8. Приходько А.А., Осовская И.И., Баранова А.Е. Получение альгиновой кислоты из бурых ламинариевых водорослей // Сборник тезисов IX Межвузовской конференции-конкурса (смеждународным участием) научных работ студентов имени члена-корреспондента АН СССР А.А. Яковкина, 18 ноября 2020 года. СПб., 2020. С. 230–231.
9. Баранова А.Е., Осовская И.И. Выделение и свойства агар-агара из красных морских водорослей // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета технологии и дизайна. 2022. №3. С. 100–104. DOI: 10.46418/2079-8199\_2022\_3\_17.
10. Осовская И.И., Баранова А.Е. Оптимизация условий образования стойкого геля из агар-агара // Химия растительного сырья. 2023. №2. С. 71–78. DOI: 10.14258/jcprtm.20230211723.
11. Duckworth M., Yaphé W. The structure of agar: Part II. The use of a bacterial agarase to elucidate structural features of the charged polysaccharides in agar // Carbohydrate Research. 1971. Vol. 16, no. 2. Pp. 435–445. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)81178-7.
12. Шипунов Б.П., Маркин В.И., Коптев В.И. Особенности реологии растворов агар-агара // Химия растительного сырья. 2018. №1. С. 53–60. DOI: 10.14258/jcprtm.2018013720.
13. Маркин В.И., Шипунов Б.П. Аномальная реология растворов агар-агара, приготовленных с использованием воды, подвергнутой воздействию электромагнитного поля // Химия растительного сырья. 2020. №1. С. 73–80. DOI: 10.14258/jcprtm.2020017373.
14. Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Усов В.А. Биосовместимые и биodeградируемые раневые покрытия на основе полисахаридов из морских водорослей // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2020. Т. 179, №4. С. 109–115. DOI: 10.24884/0042-4625-2020-179-4-109-115.
15. Surender Reddy K., Abraham A., Berihu A., Biniam T., Ghebremedhin H., Teklehaimanot B. Extraction of Agar and Alginate from Marine Seaweeds in Red Sea Region // Int. J. Marine Biol. Res. 2018. Vol. 3(2). Pp. 1–8. DOI: 10.15226/24754706/3/2/00126.

16. Гончарук В.В., Дубровина Л.В. Реологические свойства и водоудерживающая способность гидрогелей агар-агара с карбоксиметилцеллюлозой // Журнал прикладной химии. 2020. Т. 93, №7. С. 980–987. DOI: 10.31857/S0044461820070087.
17. Devika C., Singhalage I.D., Seneviratne G. Modification of nutrient agar medium to culture yet-unculturable bacteria living in unsanitary landfills // Ceylon Journal of Science. 2021. Vol. 50(4). Pp. 505–512. DOI: 10.4038/cjs.v50i4.7949.
18. Косилова И.С., Домотенко Л.В., Фурсова Н.К., Дентовская С.В., Ершова М.Г., Шепелин А.П. Испытания питательной среды отечественного производства «Агар Мюллера-Хинтон II – Оболенск» // Клиническая лабораторная диагностика. 2019. Т. 64 (6). С. 360–367. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-6-360-367.
19. Шепелин А.П. Сравнительная оценка качества основных питательных сред отечественного и импортного производства // Астраханский медицинский журнал. 2013. С. 321–326.
20. Осовская И.И., Демьянцева Е.Ю., Андранович О.С. Определение поверхностного натяжения методом отрыва кольца Дю-Нуи: учебно-методическое пособие. СПб., 2016. 24 с.
21. Феофилова Е.П., Кузнецова Л.С., Сергеева Я.Э., Галанина Л.А. Видовой состав мицелиальных грибов, поражающих пищевые продукты // Микробиология. 2009. Т. 78, №1. С. 128–133.
22. Перфильева А.И., Цивилева О.М., Ибрагимов Д.Н., Кофтин О.В., Федотова О.В. Влияние селенсодержащих биокомпозитов на основе изолятов грибов *ganoderma*, выращенных в присутствии оксипропил-4-гидроксикумаринов, на бактериальные фитопатогены // Микробиология. 2017. Т. 86, №2. С. 172–181.
23. Belova S.E., Dorofeev A.G., Panikov N.S. Growth and substrate utilization by bacterial lawn on the agar surface: experiment and one-dimensional distributed model // Mikrobiologiya. 1996. Vol. 65, no. 6. Pp. 790–795.
24. Лобакова Е.С., Васильева С.Г., Шибзухова К.А., Морозов А.С., Соловченко А.Е., Орлова А.А., Бессонов И.В., Лукьянов А.А., Кирпичников М.П. Иммобилизация цианобактерий и микроводорослей на сорбентах, созданных на основе полиэтиленimina // Микробиология. 2017. Т. 86, №5. С. 609–620.
25. Правосудова Н.А., Мельников В.Л. Микробиология полости рта: учебно-методическое пособие для студентов по микробиологии, вирусологии, микробиологии полости рта. Пенза, 2013. С. 89.
26. Guozhen Zhu, Bin Yan, Mengting Xing, Chunna Tian. Automated counting of bacterial colonies on agar plates based on images captured at near-infrared light // Journal of Microbiological Methods. 2018. Vol. 153. Pp. 66–73. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.09.004.
27. ГОСТ 8284-57. Микроскопы биологические. Типы. Основные параметры и размеры. М., 1957.
28. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учебное пособие для студентов медицинских вузов / под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быкова, В.В. Зверева. М., 2022. 272 с.
29. Зеленова Е.Г., Заславская М.И., Салина Е.В., Рассанов С.П. Микрофлора полости рта: норма и патология: учебное пособие. Нижний Новгород, 2004. 158 с.
30. Микробиология, вирусология и иммунология: учеб. для студентов мед. вузов / под ред. В.Н. Царёва. М., 2009. С. 581.
31. Блажевич О.В. Культивирование клеток: курс лекций. Мн., 2004. 78 с.

*Поступила в редакцию 26 сентября 2023 г.*

*После переработки 7 февраля 2024 г.*

*Принята к публикации 24 марта 2024 г.*



Osovskaya I.I.<sup>1\*</sup>, Baranova A.E.<sup>1</sup>, Kurzin A.V.<sup>1</sup>, Roshchin V.I.<sup>2</sup> AGAR/NACMC COMPOSITE IS AN EFFECTIVE MEDIUM FOR THE GROWTH OF MICROORGANISMS

<sup>1</sup> Saint Petersburg State University of Industrial Technologies and Design, Higher School of Technology and Power Engineering, Ivana Chernykh st., 4, Saint Petersburg, 198095, Russia, iraosov@mail.ru

<sup>2</sup> Saint Petersburg State Forest Engineering University named after S.M. Kirov, Institutsky Per., 5, Saint Petersburg, 194021, Russia

A method for producing an agar/sodium carboxymethylcellulose composite has been developed for using it in microbiological practice. The physicochemical and colloidal-chemical properties of the obtained composite (surface tension, solubility, swelling, microscopy) have been studied. The gel-forming and film-forming abilities of the composite have been studied at different component ratios. IR spectra of composite films have been measured at different ratios of agar and sodium carboxymethylcellulose to characterize the nature of chemical bonds. The studied composite has been used as a nutrient medium in microbiology. The conditions for creating the nutrient medium have been optimized. The surface cultivation method has been used. The optimal time and temperature for growing microorganisms have been revealed. The ratio of polymer components in the nutrient medium has been determined. Images of microorganisms have been obtained on an MBR-3 biological research microscope with a resolution of 100 times during the entire cultivation period. Microorganism growth was controlled by the OpenCFU program for colony-forming unit counting. The maximum number of colonies grown corresponds to the agar/sodium carboxymethyl cellulose ratio of 3 : 1. The expediency of using the composite for culturing bacterial cells in vitro is shown. The results of this study can be recommended for use in the food, textile, pulp and paper industries as a stabilizer, emulsifier, and polyampholyte with high sorption capacity.

**Keywords:** agar, gelation, Agar/Na-CMC composite, IR spectroscopy, microorganism growth.

**For citing:** Osovskaya I.I., Baranova A.E., Kurzin A.V., Roshchin V.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 3, pp. 71–80. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240313610.

## References

1. Tokbayeva A.A., Repnin A.F., Roshchin V.I. *Al'manakh nauchnykh rabot molodykh uchonykh universiteta ITMO. 50-ya nauchnaya i uchebno-metodicheskaya konferentsiya Universiteta ITMO*. [Almanac of scientific works of young scientists of ITMO University. 50th scientific and educational-methodical conference of ITMO University]. St. Petersburg, 2021, pp. 167–170. (in Russ.).
2. Sheplyakova V.E., Roshchin V.I. *Lesa Rossii: politika, promyshlennost', nauka, obrazovaniye: materialy VII Vserossiyskoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii*. [Forests of Russia: policy, industry, science, education: materials of the VII All-Russian scientific and technical conference]. St. Petersburg, 2022, pp. 400–403. (in Russ.).
3. Repnin A.F., Roshchin V.I. *Lesa Rossii: politika, promyshlennost', nauka, obrazovaniye: materialy VI Vserossiyskoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii*. [Forests of Russia: policy, industry, science, education. Proceedings of the VI All-Russian scientific and technical conference]. St. Petersburg, 2021, pp. 112–114. (in Russ.).
4. Bogolitsyn K.G., Kaplitsin P.A., Kashina Ye.M., Ivanchenko N.L., Kokryatskaya N.M., Ovchinnikov D.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2014, no. 1, pp. 243–250. DOI: 10.14258/jcprm.1401243. (in Russ.).
5. Prikhod'ko A.A., Osovskaya I.I., Baranova A.Ye. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta tekhnologii i dizayna*, 2021, no. 2, pp. 117–121. DOI: 10.46418/2079-8199\_2021\_2\_19. (in Russ.).
6. Podkorytova A.V., Roshchina A.N. *Trudy VNIRO*, 2021, vol. 186, pp. 156–172. DOI: 10.36038/2307-3497-2021-4-156-172. (in Russ.).
7. Murav'yeva Ye.A. *Rybprom: tekhnologii i oborudovaniye dlya pererabotki vodnykh bioresursov*, 2010, no. 3, pp. 54–57. (in Russ.).
8. Prikhod'ko A.A., Osovskaya I.I., Baranova A.Ye. *Sbornik tezisev IX Mezhvuzovskoy konferentsii-konkursa (smezhdunarodnym uchastiyem) nauchnykh rabot studentov imeni chlena-korrespondenta AN SSSR A.A. Yakovkina, 18 noyabrya 2020 goda*. [Collection of abstracts of the IX Interuniversity conference-competition (with international participation) of scientific works of students named after Corresponding Member of the USSR Academy of Sciences A.A. Yakovkin, November 18, 2020]. St. Petersburg, 2020, pp. 230–231. (in Russ.).
9. Baranova A.Ye., Osovskaya I.I. *Vestnik Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo universiteta tekhnologii i dizayna*, 2022, no. 3, pp. 100–104. DOI: 10.46418/2079-8199\_2022\_3\_17. (in Russ.).
10. Osovskaya I.I., Baranova A.Ye. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2023, no. 2, pp. 71–78. DOI: 10.14258/jcprm.20230211723. (in Russ.).
11. Duckworth M., Yaphe W. *Carbohydrate Research*, 1971, vol. 16, no. 2, pp. 435–445. DOI: 10.1016/S0008-6215(00)81178-7.
12. Shipunov B.P., Markin V.I., Koptev V.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2018, no. 1, pp. 53–60. DOI: 10.14258/jcprm.2018013720. (in Russ.).
13. Markin V.I., Shipunov B.P. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2020, no. 1, pp. 73–80. DOI: 10.14258/jcprm.2020017373. (in Russ.).
14. Kuznetsova T.A., Besednova N.N., Usov V.A. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova*, 2020, vol. 179, no. 4, pp. 109–115. DOI: 10.24884/0042-4625-2020-179-4-109-115. (in Russ.).
15. Surender Reddy K., Abraham A., Berihu A., Biniam T., Ghebremedhin H., Teklehaimanot B. *Int. J. Marine Biol. Res.*, 2018, vol. 3(2), pp. 1–8. DOI: 10.15226/24754706/3/2/00126.

\* Corresponding author.

16. Goncharuk V.V., Dubrovina L.V. *Zhurnal prikladnoy khimii*, 2020, vol. 93, no. 7, pp. 980–987. DOI: 10.31857/S0044461820070087. (in Russ.).
17. Devika C., Singhalage I.D., Seneviratne G. *Ceylon Journal of Science*, 2021, vol. 50(4), pp. 505–512. DOI: 10.4038/cjs.v50i4.7949.
18. Kosilova I.S., Domotenko L.V., Fursova N.K., Dentovskaya S.V., Yershova M.G., Shepelin A.P. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, 2019, vol. 64 (6), pp. 360–367. DOI: 10.18821/0869-2084-2019-64-6-360-367. (in Russ.).
19. Shepelin A.P. *Astrakhanskiy meditsinskiy zhurnal*, 2013, pp. 321–326. (in Russ.).
20. Osovskaya I.I., Dem'yantseva Ye.Yu., Andranovich O.S. *Opredeleniye poverkhnostnogo natyazheniya metodom otryva kol'tsa Dyu-Nui: uchebno-metodicheskoye posobiye*. [Determination of surface tension by the Du Nouy ring separation method: a teaching aid]. St. Petersburg, 2016, 24 p. (in Russ.).
21. Feofilova Ye.P., Kuznetsova L.S., Sergeeva Ya.E., Galanina L.A. *Mikrobiologiya*, 2009, vol. 78, no. 1, pp. 128–133. (in Russ.).
22. Perfil'yeva A.I., Tsivileva O.M., Ibragimova D.N., Koftin O.V., Fedotova O.V. *Mikrobiologiya*, 2017, vol. 86, no. 2, pp. 172–181. (in Russ.).
23. Belova S.E., Dorofeev A.G., Panikov N.S. *Mikrobiologiya*, 1996, vol. 65, no. 6, pp. 790–795.
24. Lobakova Ye.S., Vasil'yeva S.G., Shibzukhova K.A., Morozov A.S., Solovchenko A.Ye., Orlova A.A., Bessonov I.V., Luk'yanov A.A., Kirpichnikov M.P. *Mikrobiologiya*, 2017, vol. 86, no. 5, pp. 609–620. (in Russ.).
25. Pravosudova N.A., Mel'nikov V.L. *Mikrobiologiya polosti rta: uchebno-metodicheskoye posobiye dlya studentov po mikrobiologii, virusologii, mikrobiologii polosti rta*. [Microbiology of the oral cavity: a teaching aid for students in microbiology, virology, and microbiology of the oral cavity]. Penza, 2013, p. 89. (in Russ.).
26. Guozhen Zhu, Bin Yan, Mengting Xing, Chunna Tian. *Journal of Microbiological Methods*, 2018, vol. 153, pp. 66–73. DOI: 10.1016/j.mimet.2018.09.004.
27. *GOST 8284-57. Mikroskopy biologicheskoye. Tipy. Osnovnyye parametry i razmery*. [GOST 8284-57. Biological microscopes. Types. Main parameters and dimensions]. Moscow, 1957. (in Russ.).
28. *Atlas po meditsinskoj mikrobiologii, virusologii i immunologii: uchebnoye posobiye dlya studentov meditsinskikh vuzov* [Atlas of Medical Microbiology, Virology and Immunology: a textbook for students of medical universities], ed. A.A. Vorob'yev, A.S. Bykov, V.V. Zverev. Moscow, 2022, 272 p. (in Russ.).
29. Zelenova Ye.G., Zaslavskaya M.I., Salina Ye.V., Rassanov S.P. *Mikroflora polosti rta: norma i patologiya: uchebnoye posobiye*. [Microflora of the oral cavity: norm and pathology: a textbook]. Nizhniy Novgorod, 2004, 158 p. (in Russ.).
30. *Mikrobiologiya, virusologiya i immunologiya: ucheb. dlya studentov med. vuzov* [Microbiology, virology and immunology: textbook for students of medical universities], ed. V.N. Tsarov. Moscow, 2009, p. 581. (in Russ.).
31. Blazhevich O.V. *Kul'tivirovaniye kletok: kurs lektsiy*. [Cell culturing: a course of lectures]. Minsk, 2004, 78 p. (in Russ.).

Received September 26, 2023

Revised February 7, 2024

Accepted March 24, 2024

#### Сведения об авторах

Осовская Ираида Ивановна – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры физической и коллоидной химии, iraosov@mail.ru

Баранова Анна Евгеньевна – магистрант, barya9309@mail.ru

Курзин Александр Вячеславович – кандидат химических наук, доцент, доцент кафедры органической химии, zakora@mail.ru

Рощин Виктор Иванович – доктор химических наук, заведующий кафедрой технологии лесохимических продуктов, химии древесины и биотехнологии, kaf.chemdrev@mail.ru

#### Information about authors

Osovskaya Iraida Ivanovna – candidate of chemical sciences, associate professor, associate professor of the Department of Physical and Colloid Chemistry, iraosov@mail.ru

Baranova Anna Evgenievna – master's student, barya9309@mail.ru

Kurzin Aleksandr Vyacheslavovich – candidate of chemical sciences, associate professor, associate professor of the Department of Organic Chemistry, zakora@mail.ru

Roshchin Viktor Ivanovich – doctor of chemical sciences, head of the Department of Technology of Forest Chemical Products, Wood Chemistry and Biotechnology, kaf.chemdrev@mail.ru