



УДК: 574:579.(575.1)

Нодирахон САЙДИВАЛИЕВА,
Студентка НВУз имени Мирзо Улугбека
Email: saydivaliyevanodira277@gmail.com
Семора САМАДИЙ,
PhD, биотехнолог

На основании отзыва старшего преподавателя кафедры биотехнологии и микробиологии, доцента Абдусаматова Сохиба Абдусаматовича.

ECO-FRIENDLY ALTERNATIVE: NUTRIENT BROTH BASED ON APPLE AND POTATO WASTE FOR THE GROWTH OF *BACILLUS SUBTILIS*

Annotation

Recently, there has been growing interest in environmentally friendly methods in microbiology using agro-food waste. The aim of the study was to develop a nutrient medium based on apple-potato waste for cultivating *Bacillus subtilis*. Products from fruit and vegetable processing were used, which were treated thermally and enzymatically. The growth of the culture was evaluated using spectrophotometry, and the results were compared with the traditional LB medium.

Key words: agri-food waste, *Bacillus subtilis*, alternative medium, biotechnology, apple pomace, potato peel, OD₆₀₀, CFU/mL, biomass, eco-friendly medium.

EKOLOGIK TOZA ALTERNATIVA: *BACILLUS SUBTILIS* O'STIRISH UCHUN OLMA VA KARTOSHKA CHIQINDILARI ASOSIDA TAYYORLANGAN OZUQA MUHIT

Annotatsiya

So'nggi paytlarda agrooziq-ovqat chiqindilaridan foydalanadigan ekologik toza mikrobiologik usullarga qiziqish ortmoqda. Tadqiqotning maqsadi *Bacillus subtilis* bakteriyasini yetishtirish uchun olma-kartoshka chiqindilariga asoslangan oziq-ovqat muhitini ishlab chiqish edi. Meva va sabzavotlarni qayta ishlashdan olingan mahsulotlar termik va fermentativ usullarga duchor bo'lgan. Bakteriya o'sishi spektrofotometriya yordamida baholandiki, natijalar an'anavy LB muhitiga taqqoslandi.

Kalit so'zlar: agrooziq-ovqat chiqindilar, *Bacillus subtilis*, alternativ muhit, biotexnologiya, olma qoldiqlari, kartoshka pochog'i, OD₆₀₀, KOE/mL, biomassa, ekologik toza muhit.

ЭКОЛОГИЧЕСКИ ЧИСТАЯ АЛЬТЕРНАТИВА: ПИТАТЕЛЬНЫЙ БУЛЬОН НА ОСНОВЕ ЯБЛОЧНО-КАРТОФЕЛЬНЫХ ОТХОДОВ ДЛЯ РОСТА *BACILLUS SUBTILIS*

Аннотация

В последнее время растёт интерес к экологически чистым методам микробиологии с использованием агропищевых отходов. Целью исследования было разработать питательную среду на основе яблочно-картофельных отходов для культивирования *Bacillus subtilis*. Использованы продукты переработки фруктов и овощей, обработанные термически и ферментативно. Оценка роста культуры проводилась с помощью спектрофотометрии, а результаты сравнивались с традиционной LB-средой.

Ключевые слова: Агропищевые отходы, *Bacillus subtilis*, альтернативная среда, биотехнология, яблочный жмыж, картофельная кожура, OD₆₀₀ (оптическая плотность), Число КОЕ/мл, Биомасса (г/л), экологически чистая среда.

Введение. В условиях глобального внимания к экологической устойчивости проблема пищевых отходов приобретает всё большую актуальность. По данным Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН, ежегодные потери продуктов питания в мире достигают 1,3 млрд тонн, при этом значительную долю составляют фрукты и овощи. Только в переработке картофеля до 25 % сырья теряется в виде кожуры, выжимок и крахмальных стоков, а при производстве яблочного сока до 30 % массы переходит в жмыж. Эти побочные продукты обладают высоким содержанием углеводов, клетчатки, органических кислот и азотсодержащих соединений, что делает их потенциально пригодными для использования в микробиологическом производстве.

Критический анализ литературы показывает, что большинство работ ориентировано на ферментационные процессы с участием молочнокислых бактерий и грибов, в то время как *Bacillus subtilis* - один из наиболее значимых промышленно применяемых микроорганизмов - в контексте альтернативных питательных сред на основе пищевых отходов исследован ограниченно. В частности, отсутствуют систематизированные данные о влиянии комплексных субстратов из яблочно-картофельного сырья на рост, скорость размножения и стабильность метаболической активности *B. subtilis*.

С учётом данных Европейской комиссии, ежегодно в ЕС образуется более 50 млн тонн отходов от переработки сельхозпродукции, из которых лишь около 30 % перерабатываются устойчивыми методами. Это указывает на значительный нереализованный потенциал повторного использования побочных продуктов в биотехнологических целях. Кроме того, использование отходов в качестве основы питательной среды позволяет снизить себестоимость производства микробной биомассы до 60–70 % по сравнению с коммерческими средами, такими как *LB*.

Таким образом, научная ниша настоящего исследования заключается в разработке и оптимизации питательной среды для *Bacillus subtilis* на основе комбинированных яблочно-картофельных отходов с сохранением продуктивности на уровне стандартных сред. Это позволит не только утилизировать значительные объемы биоотходов, но и расширить возможности устойчивого микробиологического производства.

Цель исследования: определить эффективность и экономическую целесообразность использования яблочно-картофельных отходов в качестве питательной среды для *Bacillus subtilis*.

Материалы и методы исследования. В качестве основного сырья использовались яблочные и картофельные отходы, полученные с предприятий пищевой промышленности Республики Узбекистан. Яблочный жмых предоставлен заводом по производству соков ООО «Bliss» (г. Ташкент), образующийся в процессе отжима и включающий до 20 % остаточных сахаров, органических кислот и клетчатки. Картофельные отходы (кожура, обрезки и выжимки) были получены с предприятия ООО «Zarafshan Potato Processing» (Наманганская область), богатые крахмалом и клетчаткой.

Объектом культивирования являлся бактериальный штамм *Bacillus subtilis* SBK-309, хранящийся в коллекции микробиологии Национального университета Узбекистана имени Мирзо Улугбека. Штамм SBK-309 характеризуется стабильным ростом на средах растительного происхождения и рекомендован для исследований в области микробиологической переработки [3].

Каждый вид отходов предварительно промывался холодной проточной водой в течение 3–5 минут для удаления загрязнений, затем отцеживался и измельчался в блендере до получения полужидкой массы. Смесь готовилась в соотношении 1:1 по массе (яблочные:картофельные отходы), и для повышения экстракции питательных веществ разбавлялась дистilledированной водой до соотношения 1:3 (сырье:вода).

Полученная смесь подвергалась термической обработке в водяной бане при температуре 80 °C в течение 20 минут для инактивации нежелательной микрофлоры и частичного разрушения клеточных структур, что способствует высвобождению нутриентов [2]. После остывания до комнатной температуры масса фильтровалась через четыре слоя марли. Жидкая фракция (фильтрат) использовалась в дальнейшем как основа для питательной среды.

На её основе была приготовлена альтернативная питательная среда (АПС), содержащая:

- 80 % жидкого экстракта отходов,
- 0,5 % хлорида натрия (NaCl),
- 0,2 % фосфата калия однозамещенного (K₂HPO₄),
- pH среды корректировался до 7,2 с помощью раствора NaOH (1 M)

Среда стерилизовалась при 121 °C в автоклаве в течение 15 минут (давление 1 атм). Для контроля использовалась стандартная питательная среда LB (Luria-Bertani), приготовленная по классической методике [4].

Каждый этап подготовки сырья и среды повторялся трижды ($n = 3$) для оценки стабильности состава и воспроизводимости условий культивирования.

Таблица № 1.

Сравнительный состав и стоимость альтернативной питательной среды и LB-среды

Компонент	Альтернативная среда (АПС)	LB-среда
Основное сырье	Яблочный жмых, картофельные отходы	Триптона, дрожжевой экстракт
Источник углеводов	Яблочный жмых, картофель	Глюкоза, лактоза
Натрий хлорид (NaCl)	0,5 %	0,5 %
Фосфат калия (K ₂ HPO ₄)	0,2 %	0,25 %
pH среды	7,2	7,2
Процесс стерилизации	Автоклавирование при 121 °C, 20 мин	Автоклавирование при 121 °C, 20 мин
Тип среды	Жидкая среда (без агар-агара)	Жидкая среда (без агар-агара)
Стоимость на 100 мл	0,18 USD (около 1 950 UZS)	0,50 USD (около 5 300 UZS)

Примечание: Данная таблица позволяет наглядно увидеть, что альтернативная питательная среда (АПС), приготовленная на основе агропищевых отходов (яблочный жмых и картофельные выжимки), существенно дешевле традиционной LB-среды. Сравнение состава показывает, что оба типа среды содержат основные компоненты, необходимые для роста *Bacillus subtilis*, но с заметным отличием в стоимости, что делает использование АПС не только экологически устойчивым, но и экономически оправданным.

Культивирование бактериальной культуры *Bacillus subtilis* SBK-309 проводилось в альтернативной питательной среде (АПС), приготовленной на основе яблочно-картофельных отходов, как указано в разделе 2.2. Для инокуляции использовалась культура, предварительно выращенная в LB-среде при 37 °C в течение 16 часов. Затем инокулят в количестве 5 % от общего объема среды добавлялся в стерильные колбы с 100 мл экспериментальной среды. Это количество инокулята было выбрано на основе предыдущих исследований, показывающих оптимальный стартовый титр для достижения интенсивного роста *Bacillus subtilis* [2].

Культивирование осуществлялось при температуре 37 °C, что является оптимальной температурой для роста штамма *B. subtilis* SBK-309 согласно рекомендациям из научной литературы [3]. Инкубация проводилась на шейкере с аэрацией при скорости вращения 180 об/мин для обеспечения достаточного кислородного обмена и равномерного распределения бактерий по среде. Эти условия являются стандартными для культивирования аэробных бактерий и были использованы в исследовательских работах по аналогичной теме [6].

Отбор проб из культуры проводился через каждые 6 часов (0, 6, 12, 18 и 24 часа) для мониторинга динамики роста. Такой интервал отбора был выбран на основе результатов, показывающих наибольшие изменения в росте бактериальной биомассы в первые 24 часа [5]. Таким образом, пробы были отобраны в ключевых точках, отражающих процесс роста и деления бактерий.

Каждое экспериментальное исследование проводилось в трёх независимых биологических повторностях для обеспечения достоверности и повторяемости полученных результатов [7]. В каждой биологической повторности было проведено три технических повторения, что позволило минимизировать погрешности при анализе и повысить статистическую значимость данных.

Результаты: Для оценки роста бактерий *Bacillus subtilis* на альтернативной (АПС) и контрольной (LB) средах были использованы два основных метода: измерение оптической плотности (OD600) и подсчёт количества

колониеобразующих единиц (КОЕ/мл). Дополнительно, для более точной оценки биомассы, в конце эксперимента проводилось взвешивание сухой клеточной массы. Оценка роста и биомассы позволила провести сравнительный анализ эффективности использования яблочно-картофельных отходов как питательной среды.

Таблица № 2.**Динамика роста *Bacillus subtilis* на альтернативной и контрольной средах по данным OD600**

Время инкубации, ч	OD600 (АПС)	OD600 (LB)
0	0,053 ± 0,004	0,050 ± 0,005
6	0,328 ± 0,021	0,342 ± 0,018
12	0,794 ± 0,037	0,825 ± 0,033
18	1,205 ± 0,052	1,243 ± 0,045
24	1,372 ± 0,046	1,410 ± 0,041

Примечание: результаты представлены как средние значения из трёх биологических повторов ± стандартное отклонение. Данная таблица демонстрирует динамику роста *Bacillus subtilis* на альтернативной (АПС) и контрольной средах (LB) на основе измерений оптической плотности (OD600). Результаты показывают, что рост на яблочно-картофельных отходах (АПС) не уступает росту на традиционной LB-среде.

Таблица № 3.**Динамика роста *Bacillus subtilis* по данным подсчёта КОЕ/мл**

Время инкубации, ч	КОЕ/мл (АПС)	КОЕ/мл (LB)
0	(2,1 ± 0,3) × 10 ⁴	(2,0 ± 0,2) × 10 ⁴
6	(1,9 ± 0,2) × 10 ⁶	(2,1 ± 0,3) × 10 ⁶
12	(6,3 ± 0,5) × 10 ⁷	(6,7 ± 0,4) × 10 ⁷
18	(2,5 ± 0,3) × 10 ⁸	(2,6 ± 0,2) × 10 ⁸
24	(3,1 ± 0,4) × 10 ⁸	(3,2 ± 0,3) × 10 ⁸

Примечание: результаты представлены как средние значения из трёх биологических повторов ± стандартное отклонение. Результаты подсчёта КОЕ/мл на альтернативной и контрольной средах показали схожую динамику роста. Это подтверждает, что яблочно-картофельные отходы являются подходящей альтернативой стандартной LB-среде для роста *Bacillus subtilis*.

Таблица № 4.**Оценка биомассы *Bacillus subtilis* после 24 часов инкубации**

Среда	Масса сухой биомассы, мг
АПС	1,42 ± 0,03
LB	1,47 ± 0,02

Примечание: Результаты взвешивания сухой биомассы подтверждают, что яблочно-картофельные отходы обеспечивают сопоставимый рост *Bacillus subtilis* с традиционной LB-средой. Это подтверждает возможность использования альтернативных источников питательных веществ, что может значительно снизить стоимость производственных процессов в биотехнологии.

Обсуждение результатов. Полученные данные демонстрируют, что альтернатива на основе яблочно-картофельных отходов (АПС) может эффективно поддерживать рост *Bacillus subtilis* SBK-309. Максимальная оптическая плотность среды (OD600) в условиях культивирования на АПС достигала 1.372, в то время как в LB-среде - 1.410, что составляет менее 3% отклонения. Аналогично, масса сухой биомассы к 24 ч составила 1.42 ± 0.03 мг в АПС и 1.47 ± 0.02 мг в LB-среде. Указанные значения находятся в пределах допустимых отклонений, что указывает на полноценное питание и адаптацию бактерии к новому субстрату.

Сравнение с данными других исследований подтверждает полученные результаты. Например, в работе Кузнецовой и др. [8] сообщается о снижении OD600 на 10–12% при замене LB-среды на картофельно-овощную гидролизатную среду, тогда как в нашем исследовании снижение составило лишь 2.7%. В работе Турсунова и соавт. [9] указывается, что при использовании фруктовых жмыхов наблюдалось неустойчивое накопление биомассы и изменение морфологии клеток, чего в нашем случае не зафиксировано.

Экономическая эффективность АПС заключается в снижении затрат на 60–70% по сравнению с LB-средой, что также подтверждается экономическими расчётами в литературе [10]. Биотехнологическое применение отходов переработки сельхозпродуктов также соответствует актуальным направлениям экологической устойчивости и сокращения пищевых потерь [11].

Аналогичные подходы к использованию пищевых отходов в микробиологии были представлены в работе Исламова и соавт. [12], где использовались тыквенные выжимки в составе среды для *Bacillus cereus* - однако снижение продуктивности достигало 15%. Также в исследовании Ким и Чой [14] показано, что использование яблочного жмыха в среде для *Lactobacillus plantarum* обеспечивает рост, но требует ферментативной предобработки для повышения доступности субстрата.

В отличие от вышеуказанных работ, предложенная в настоящем исследовании среда не требует ферментативной или кислотной обработки и при этом сохраняет высокий уровень питательной доступности. Это выгодно отличает её в технологическом и экономическом аспектах. Таким образом, предложенная альтернатива может быть рекомендована для применения в лабораторной и промышленной практике, особенно в условиях ограниченного доступа к дорогим коммерческим средам.

Вывод. Альтернативная питательная среда (АПС), созданная на основе яблочно-картофельных отходов, показала высокую эффективность в поддержании роста *Bacillus subtilis* штамма SBK-309. Рост клеточной массы, определённый по OD600, в АПС был сопоставим с таковым в стандартной LB-среде: 1.372 против 1.410 к 24 часу культивирования, что свидетельствует об активном метаболизме в условиях альтернативной среды. Количество жизнеспособных клеток

(КОЕ/мл) в АПС достигало уровней, практически идентичных контрольной среде, подтверждая отсутствие токсичности или дефицита ключевых питательных веществ. Масса сухой биомассы после 24 часов инкубации в АПС составила 1.42 ± 0.03 мг, что лишь немногого уступает LB-среде (1.47 ± 0.02 мг), и укладывается в допустимую экспериментальную погрешность. Полученные результаты подтверждают, что использование пищевых отходов в качестве основы для микробиологических питательных сред возможно без потери эффективности, обеспечивая при этом снижение затрат и экологическую устойчивость. Разработка данной среды представляет практический интерес для биотехнологических производств и научных лабораторий, особенно в контексте политики рационального природопользования и сокращения пищевых отходов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Smith J., Patel R., Huang L. Valorization of potato processing by-products: A review // *J. of Food Processing and Preservation*. - 2018. - Vol. 42, № 3. - e13567. - С. 6-7.
2. Мещеряков Б. И., Федорова О. В. Биотехнологическое использование органических отходов. - М.: Колос, 2017. - 160 с. - С. 112.
3. Ахмедов У. Х., Нурматова Ш. Р. Исследование штаммов *Bacillus subtilis*, выделенных из почв Узбекистана // *Микробиология и биотехнология*. - 2020. - № 2. - С. 12–16.
4. Sambrook J., Russell D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. - 3rd ed. - Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. - Vol. 1. - С. 117.
5. Кузнецова Л. А., Карпунина Н. В. Практикум по микробиологии. - М.: Академкнига, 2018. - 248 с. - С. 122.
6. Садовская Е. Н., Васильева М. Л. Микробиологические методы в биотехнологии. - М.: Наука, 2018. - 160 с. - С. 99.
7. Гладкий Ю. Н., Кузьмин Н. П. Основы статистической обработки экспериментальных данных. - СПб.: Лань, 2016. - 216 с. - С. 94.
8. Кузнецова С. А., Иванова Л. Н., Петров И. В. Использование аграрных отходов в микробиологии // *Биотехнология*. - 2020. - №2. - С. 88-93.
9. Турсунов Ф. А., Абдурахманов М. И., Салимова Н. Д. Применение плодовых отходов для роста *Bacillus spp.* // Аграрная наука Узбекистана. - 2022. - №3. - С. 98–104.
10. Шарипов Ж. Б., Юнусов Х. Р. Экономика альтернативных питательных сред // *Микробиологические исследования*. - 2021. - №1. - С. 86–89.
11. FAO. The State of Food and Agriculture 2019: Moving forward on food loss and waste reduction. - Rome: FAO, 2019. - 180 с.
12. Исламов К. Ф., Каримова Ж. У., Сайдов Д. А. Использование тыквенных отходов в микробиологических средах // Узбекистанский журнал биотехнологий. - 2021. - №2. - С. 60–64.
13. Мирзаева З. И., Нуралиев А. Ш. Сравнительная оценка стоимости питательных сред // *Технологии устойчивого развития*. - 2022. - №4. - С. 40–46.
14. Kim H. J., Choi J. S. Apple pomace-based fermentation substrate for *Lactobacillus plantarum*: nutrient analysis and bioconversion // *Journal of Food Processing and Preservation*. - 2020. - Vol. 44, №2. - P. 243–248.