УДК 579.62

СИСТЕМНЫЙ ПОДХОД К КУЛЬТИВИРОВАНИЮ, ХРАНЕНИЮ И ИССЛЕДОВАНИЮ МЕЖВИДОВОГО АНТАГОНИМА ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ

Суворова А.В., студентка 4 курса факультета ветеринарной медицины и биотехнологии
Научные руководители: Васильев Д.А., доктор биологических наук, профессор;
Шестаков А.Г., кандидат биологических наук, с.н.с.
ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА.

Ключевые слова: концентрирование штаммов, микробная масса, бактериальный концентрат, коагуляция, центрифугирование.

Работа посвящена поиску оптимального метода концентрирования штаммов для ветеринарного пробиотика. Разработан способ концентрирования бактериальной массы штаммов консорциума с помощью центрифуги и режимов культивирования бактериальной массы. Исследованы параметры соотношения бактериальных штаммов.

Процесс выделения и очистки бактериальных штаммов и их продуктов представляет собой ряд последовательных технологических операций, количество которых возрастает с повышением желаемой чистоты конечного продукта.

Бактериальная масса весьма чувствительна к различным воздействиям, поэтому наблюдается снижение титра бактерий при неправильном культивировании. Культуральная жидкость представляет собой сложную многофазную систему, содержащую от 10 до 50% и более сухого вещества. Как правило, выделение бактериальных клеток связано с определенными трудностями и в основном зависит от предварительной очистки культуральной жидкости. Отмечено что наибольший биологический эффект присущ бактериальным штаммам в форме биоплен-

ки (1,2,3,4). Однако в процессе формирования биопленки возникает ряд факторов, в том числе и образование экзополимерного матрикса, придающего вязкость бульонным культурам (2).

Первой стадией подготовки культуральной жидкости для дальнейшей переработки является отделение взвешенной фазы или микробной массы, в состав которой входят микроорганизмы, продукты их жизнедеятельности, а также остатки неиспользованной питательной среды. Разделение твердой и жидких фаз проводят с предварительной коагуляцией высокомолекулярных веществ с последующим естественным (отстаивание и фильтрация) или принудительным осаждением центрифугах.

Эффективным методом коагуляции дисперсных систем является обработка их высокомолекулярными полиэлектролитами – флокулянтами. При этом в отличие от обычной коагуляции образуются флокулы или осадки рыхлой структуры, что значительно улучшает процесс фильтрации. (4)

Основное преимущество центрифугирования по сравнению с другими методами обработки неоднородных систем, например, отстаиванием и фильтрованием заключается в увеличении производительности разделения. Производительность современных центрифуг непрерывного действия достигает сотен $м^3$/ч. С помощью центрифугирования удается выделить из суспензий частицы размером до сотых долей микрометра. Центрифугирование широко применяется в биотехнологических процессах, прежде всего для выделения из культуральной жидкости биомассы бактерий отделения различных продуктов микробиологического синтеза (антибиотиков, ферментов, витаминов и т.п.), переведенных предварительно в твердую фазу, а также для разделения эмульсий, образующихся при экстракции. Разработанные нами режимы центрифугирования предполагают проведение центрифугирования малых объемов культуральных взвесей при низких оборотах в течении длительной экспозиции с применением сукцинатов в качестве флокулянтов.

Бактериальный концентрат мы готовили путем культивирования штаммов бактерий консорциума в питательной среде, их концентрирования (центрифужным способом) и смешивания полученной биомассы с защитной средой. Сухой бактериальный концентрат вырабатывали из жидкого препарата (с защитной глицеро-желатиновой средой) путем его сублимационной сушки. Способ сублимационной сушки заключается в высушивании бактериального препарата в замороженном со-

стоянии при глубоком вакууме. При этом содержание клеток штаммов консорциума в 1 г сухого бактериального препарата повысилось до сотен миллиардов клеток, а срок хранения увеличился до 4 мес. При сублимационном способе сушки выживаемость живых клеток достигала 90 % в течение пяти месяцев. Сухой бактериальный концентрат активизировали путем растворения его в стерилизованной питательной среде специфичной для каждого исследуемого штамма и выдерживали в течение 1,5–5 ч при оптимальной температуре для развития бактериальных клеток. После активации бактериальный препарат направляли непосредственно для получения первичной закваски, приготовленной на средах для культивирования молочнокислых бактерий.

В процессе производства бактериальных препаратов важным этапом является культивирование микроорганизмов. Основными факторами, ограничивающим рост микроорганизмов в периодических процессах являются исчерпание питательных сред и накопление в культуральной среде токсических продуктов метаболизма. (4) Поэтому мы оптимизировали время культивирования штаммов пробиотика не более 96 часов. Цикл развития культуры начинается с засева среды. Засев осуществляется в таком количестве, которое обеспечивает начало роста микроорганизмов с минимальной задержкой. Мы вносили посевной материал в количестве 5 % от объема среды. Посевной материал, попав в свежую полноценную среду, постепенно начинает размножаться. Через определенное время в стационарной фазе масса клеток в питательной среде достигает максимального уровня. Немаловажную роль для роста бактерий играют буферные свойства среды. Для поддержания оптимальной для роста буферной емкости среды мы использовали натриевые и калиевые соли лимонной, фосфорной и уксусной кислот. Мы отделяли клетки в конце логарифмической, перед началом стационарной фазы роста, что обеспечивает максимальный выход клеток и их стойкость, при этом накапливая максимальную массу в течение 96 часов. Таким образом, мы разработали способ концентрирования бактериальной массы штаммов консорциума с помощью центрифуги и режимов культивирования бактериальной массы.

С целью получения посевного материала мы использовали культуры бактериальных штаммов, которые выдавались из музея кафедры МВЭ и ВСЭ Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.

Каждая культура имела паспорт, в котором указаны продуцент и его коллекционный номер, серия и дата изготовления, средняя актив-

ность серии и срок годности. В паспорте представлена характеристика среды для выращивания и хранения культуры. Полученный посевной материал подвергали микробиологическому и биохимическому контролю, так как от его активности и чистоты зависит дальнейший производственный цикл.

Приготовление посевного материала проходит в несколько этапов:

1. исходная культура;
2. скошенная агаровая среда;
3. выращивание в колбах на жидкой питательной среде (в течение 96 часов);
4. центрифуга (осаждение бактериальной массы);
5. сублимационная сушка.

Исходную культуру при оптимальных температурах для каждого штамма выращивали в пробирках и переносили на скошенную агаровую среду.

Каждую выращенную культуру (5% от объема) с поверхности скошенной агаровой среды стерильно смывали физ.раствором и переносили в колбы на 1000 мл, содержащие 500 мл жидкой питательной среды. Засеянные колбы культивировали при температуре 30-37°С в течение 96 часов, т.е. глубинным способом, что увеличивает скорость роста культуры. Все стадии роста продуцента контролировали по морфологическим показателям микроорганизмов. При этом установлено, что наилучшие результаты дает культура, которая находится в стадии физиологической зрелости, то есть в конце логарифмической фазы.

Готовую культуру каждого штамма центрифугировали и сушили в сублимационной сушке.

Отмечено, что масштабирование при получении инокулята желательно осуществлять тогда, когда рост популяции происходит с максимальной скоростью, т.е. в экспоненциальной фазе.

Далее в 2 колбы объемом 1000 мл вносили по 100 мл каждого штамма из литровых колб, полученных ранее, и добавляли питательного ГРМ бульона до 1000 мл. Колбы культивировали в аэробных и анаэробных условиях соответственно при 33°С в течение 72 часов. Спустя указанное время определяли количество колониеобразующих единиц каждого штамма на селективных средах. Установлено увеличение каждого штамма бактерий *Bacillus coagulans, Bacillus subtilis, Wiesella thailandensis. Bifidobacterium animalis, Propionibacterium freud-*

enreichii, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium на два порядка в сравнении с первоначальной концентрацией. По итогам работы был сделан вывод, что штаммы между собой не конкурируют и не ингибируют друг друга. Так же в результате полученных данных установлено, что бактерии видов *Bacillus coagulans, Bacillus subtilis, Wiesella thailandensis. Bifidobacterium animalis, Propionibacterium freudenreichii, Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium* внесенные в питательную среду в логарифмической фазе роста увеличивают свою концентрацию равномерно и могут быть использованы при разработке пробиотика в соотношении 1:1 в максимальном титре.

Библиографический список

1. Батраков В.В., Шестаков А.Г., Малинов Е.С., Васильев Д.А. Влияние L-аргинина на формирование внеклеточного полимерного матрикса бактериями *Pseudomonas aeruginosa* // Любищевские чтения – 2014. Современные проблемы эволюции и экологии. Сборник материалов международной конференции. – 2014 – с. 267-270.
2. Малинов Е.С., Шестаков А.Г., Васильев Д.А. Бактериальные биопленки и методы их получения // Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – 2013 г. – с. 201-203.
3. Садртдинова Г.Р., Ляшенко Е.А., Шестаков А.Г., Васильев Д.А. Детекция биопленок, образованных бактериями рода *Klebsiella*, при помощи агаризованной среды // Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животный. Материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 55-летию ВНИИВВиМ. – 2014 г. – с.106-111.
4. Садртдинова Г.Р., Ляшенко Е.А., Шестаков А.Г., Васильев Д.А. Оценка CRA-метода в обнаружении биопленок, образованных бактериями рода *Klebsiella* // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. Материалы VI Международной научно-практической конференции. – 2015 г. – с. 122-124.
5. Шестаков А.Г., Молофеева Н.И., Пульчеровская Л.П., Мерчина С.В., Калдыркаев А.И., Васильев Д.А. Проявление антагонистических свойств бактерий Lactobacillus acidophilus в отношении бактерий *Serratia marcescens* и *Klebsiella pneumonia* // Актуальные вопросы ветеринарной науки. Материалы Международной научно-практической конференции. – 2015 г. – с. 114-116

A SYSTEMATIC APPROACH TO THE CULTIVATION, STORAGE AND STUDY OF INTERSPECIFIC ANTAGONISM PERIODICHESKIH STRAINS

Suvorova A. V., Vasiliev A. D., Shestakov A. G.

Keywords: concentration of strains, microbial mass, bacterial concentrate, coagulation, centrifugation.

The work is devoted to the search for the optimal method of concentration of strains for veterinary probiotics. Developed a method for concentrating bacterial mass of strains of the consortium with the help of a centrifuge and of modes of cultivation of the bacterial mass. Investigated parameters of the ratio of bacterial strains.