УДК 663.18:579.

О. С. Багаєва[1], канд. біол. наук, доц., **О. В. Везенко**[2], ст. наук. співроб., **О. К. Багаєв**[1], пров. інж. , **Т. О. Бєляєва**[1], наук. співроб., **О. М. Полтавський**[1], асп., **В. Г. Коритнянська**[1], асп., **Т. В. Гудзенко**[1], канд. біол. наук, доц.
[1]Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна,
[2]Інженерно-технологічний інститут "Біотехника"

ОПТИМІЗАЦІЯ УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ САЛЬМОНЕЛ В ФЕРМЕНТЕРАХ БАРБОТАЖНОГО КОМПЛЕКСУ

Оптимізований режим культивування бактерій *Salmonella enteritidis* в розроблених ферментерах, який забезпечує досягнення концентрації бактеріальних клітин 1-2 млрд. кл/мл за 5-6 годин вирощування на МПБ та за 5-7 годин на гороховому середовищі. Для іммобілізації сальмонел на зерні необхідно 8-13 годин. Використання даних дає можливість суттєво скоротити термін виробництва біопрепарату бактороденциду, дія якого зумовлена *Salmonella enteritidis*.
Ключові слова: барботаж, культивування, оптимізація, сальмонела, ферментер.

Бактерії *Salmonella enteritidis* var. *Isatschenko 18/1* — діючий інгредієнт біопрепарату для знищення мишоподібних гризунів, зернового бактороденциду. Бактерії, які спричиняють мишачий тиф, знаходяться всередині та на поверхні зерна пшениці, ячменю, вівса. Бактороденцид призначений для використання в агрогосподарському виробництві. Біопрепарат користується попитом, але обсяги його одержання та застосування в останні роки помітно зменшилися [1-3]. Одна з основних причин — відсутність сучасних технологій виробництва. На сьогодні в біолабораторіях одержують бактороденцид згідно регламенту, який був розроблений в 1988 році [4].

Щонайменш три чинника гальмують налагодження виробництва бактороденциду. По-перше, понад 6 діб в великому об'ємі термостатованого приміщення необхідно підтримувати температуру 37 °С, що веде до надмірних енерговитрат. По-друге, трьохлітрові скляні банки, в яких переважно культивують сальмонели на зерні, не призначені до багаторазових автоклавувань. Велика кількість відходів внаслідок пошкоджень скла зменшує рентабельність виробництва. По-третє, для одержання гарантовано якісної продукції в багатьох місткостях необхідно визначати чистоту мікробної культури та титр сальмонел. Великий обсяг мікробіологічних аналізів також негативно впливає на собівартість біопрепарату.

Мета нашої роботи полягала в подоланні цих недоліків шляхом оптимізації умов культивування *S. enteritidis 18/1* в розроблених нами ферменте-

© О. С. Багаєва, О. В. Везенко, О. К. Багаєв, Т. О. Бєляєва, О. М. Полтавський, В. Г. Коритнянська, Т. В. Гудзенко, 2005

рах барботажного комплексу, пристосованих для виробництва біопрепаратів в умовах регіональних біолабораторій [5-8].

Матеріали та методи

У роботі був використаний штам *Salmonella enteritidis* var. *Isatschenko 18/1*, одержаний з ВНДІ сільськогосподарської мікробіології (Санкт-Петербург).

Вирощування бактерій здійснювали в термостатованому приміщенні при температурі від 36 °С до 38 °С.

На першій стадії виробництва бактороденциду одержували вихідний посівний матеріал: вирощували сальмонели в пробірці на скошеному м'ясопептонному агарі (МПА) на протязі 24 годин.

На другій стадії здобували посівну культуру бактерій першої генерації. В трьохлітровий інокуляційний ферментер з двома літрами м'ясопептонного бульйону (МПБ) вносили 10 мл суспензії посівного матеріалу, одержаної шляхом змиву вмісту пробірки вихідного посівного матеріалу фізіологічним розчином. Культивували сальмонели при постійній подачі стерильного повітря. Інтенсивність аерації регулювали таким чином, щоб при максимальній кількості повітря не замочувалася кришка ферментеру. Концентрацію мікробних клітин визначали з використанням камери Горяєва.

На третій стадії отримували посівну культуру мікроорганізмів другої генерації. Сорокалітровий металевий ферментер заповнювали 20 літрами рідкого горохового середовища, приготованого згідно інструкцій регламенту [4] та автоклавували при 1 атм півтори години. Після охолодження засівали двома літрами культури бактерій першої генерації. Вирощування сальмонел здійснювали при постійній подачі повітря 4-5 л/хв.

На четвертій стадії вирощували сальмонели на зерновому середовищі. Використовували пшеницю, ячмінь та суміш ячменю та пшениці (1:1). Зерно готували згідно інструкціям регламенту [4]. В сорокалітровому ферментері 20 кг зернового середовища двічі автоклавували при 2 атм на протязі двох годин два дні підряд. Після охолодження в ферментер вносили 4 літри посівної культури другої генерації, яку було одержано на попередній стадії. Ріст сальмонел відбувався при безперервній подачі повітря — 20-22 л/хв. Концентрацію життєздатних мікробних клітин у зерні визначали шляхом підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 г зерна [6].

Результати та їх обговорення

Оптимізацію умов культивування *S. enteritidis 18/1* здійснювали шляхом постійної подачі стерильного повітря крізь отвори барботерів в створених нами ферментерах барботажного комплексу. Дрібні бульбашки повітря насичували киснем поживне середовище. Крім того, вони перемішували вміст культиваційних ємностей при одержанні посівної культури першої

Науково-технічна
Сільськогосподарську
ім. І. І. Мечникова

та другої генерацій, або поліпшували розповсюджування сальмонел по поверхні зерен при іммобілізації бактерій. Завдяки надлишковому тиску стерильного повітря з всіх ферментерів безперервно видалялися гази, які утворювалися в процесі росту мікроорганізмів. Ці чинники, згідно нашим припущенням, повинні були прискорювати розвиток популяції бактерій в періодичній культурі.

На другій стадії виробництва при отриманні посівної культури першої генерації (на МПБ) ми спостерігали підвищення титру до 300-500 млн. кл/мл на 4-5 годину після засіву ферментера. Згідно інструкціям регламенту [4] такий титр визнається достатнім для використання бактеріальної суспензії в якості інокуляту для подальшого засіву горохового середовища, тобто для одержання посівної культури другої генерації. Як показано в таблиці, примусова аерація, яка здійснювалася шляхом барботажу, дала можливість суттєво прискорити другу стадію виробництва.

Таблиця

Тривалість стадій технологічного процесу

	Стадії виробництва бактороденциду	Час культивування *S. enteritidis 18/1*, год	
		За регламентом	В ферментерах
1	Одержання вихідного посівного матеріалу в пробірках	24 – 48	24 – 48
2	Одержання посівної культури *S. enteritidis 18/1* першої генерації	36 – 48	5 – 6
3	Одержання посівної культури *S. enteritidis 18/1* другої генерації	36 – 48	5 – 7
4	Вирощування *S. enteritidis 18/1* на зерні	48	8 – 13

Спостереження за динамікою росту бактерій на МПБ показали, що титр поступово зростав та через 5-6 годин досягав рівня 1-2 млрд. кл/мл і більше не підвищувався. Тобто це була стаціонарна фаза розвитку культури. Розбіжність часу зростання концентрації бактерій до максимального рівня можна пояснити різною інтенсивністю воздухопостачання, яке регулювали вручну.

Два літра цієї мікробної суспензії з титром 1-2 млрд. кл/мл використовували на третій стадії виробництва бактороденциду в якості посівного матеріалу для одержання посівної культури другої генерації на гороховому середовищі в наступному, сорокалітровому ферментері.

Початковий титр сальмонел в ферментері складав 100-200 млн. кл/мл. Через дві-три години після початку культивування титр мікробних клітин досягав 300-500 млн. кл/мл. Цей показник свідчить, що концентрація бактеріальної суспензії за цей період стала достатньою для засіву зернового середовища [4]. Дві-чотири години концентрація мікробних клітин в ферментері не підвищувалася. Потім знов спостерігалося поступове зростання титру бактерій на протязі трьох-чотирьох годин до досягнення концентрації мікроорганізмів 1-2 млрд. кл/мл. Наявність першого піку росту можна пояснити утилізацією вуглеводів, а другого — білків горохового середови-

ща. При появі другого піку з'являвся характерний різкий запах сірководню. Подальшого підвищення концентрації мікробних клітин ми не спостерігали. Наступала стаціонарна фаза розвитку періодичної культури в ферментері. Розбіжність в термінах досягнення максимального титру на гороховому середовищі можна пояснити різницею вмісту компонентів живильних середовищ в різних сортах гороху, який використовували. На нашу думку для засіву зерна краще використовувати посівну культуру після досягнення нею максимального титру, 1-2 млрд/мл. Тобто третя стадія виробництва повинна тривати приблизно 5-6 годин. Цей термін значно коротший за регламентований (табл.).

На четвертій стадії виробництва бактороденциду ми помічали, що при використанні м'яких сортів пшениці спостерігається надмірне пом'якшення зернин після автоклавування (особливо на дні ферментеру). Кашоподібна маса розвареного зерна перешкоджала нормальній аерації. Через 35-40 годин культивації з барботажем спостерігали підвищення титру бактерій в зерні до 2 млрд. кл/г, який згідно технічним умовам є одним з основних показників виготовленого бактороденциду [10]. Тобто вплив аерації був незначний. Використання зерна твердих сортів пшениці для виробництва бактороденциду економічно недоцільне. Тому при проведенні подальших досліджень по оптимізації культивування сальмонел на зерновому середовищі використовували ячмінь та суміш зернових. Було встановлено, що на ячмені спостерігалося підвищення титру бактерій до рівня 2 млрд. кл/г через 22-28 годин культивування, а на суміші ячменю з пшеницею — через 8-13 годин. На наш погляд, пояснення таке: зернівки ячменю мають щільні целюлозні лусочки і сальмонели не можуть швидко подолати цю перешкоду. До того ж наявність лусочок заважає нормальній аерації вмісту зернин. Тому підвищення титру сальмонел у суміші спостерігалося в основному за рахунок іммобілізації бактерій на зернах пшениці. Через 19- 32 години постійної аерації титр сальмонел на зерновому субстраті досягав 10-20 млрд. кл/г. Використання бактороденциду з таким високим титром дозволяє не тільки зменшувати норму використання біопрепарату, але й ефективно застосовувати таку продукцію для знищення пацюків (тому що титр в 20 млрд. кл/г має амінокістковий бактороденцид, який успішно використовувався в радянські часи для боротьби з пацюками) [2] .

Таким чином, визначена можливість оптимізації росту *S. enteritidis 18/1* в ферментерах барботажного комплексу завдяки використанню безперервної подачі стерильного повітря в емкість для культивування мікроорганізмів. Одержані дані дозволяють вдосконалити процес виробництва бактороденциду.

Література

1. *Беспалов И. Н., Багаева О. С.* Возрождение микробиопрепаратов — путь к решению экологических проблем // Экологические проблемы городов рекреационных зон и природоохранных территорий. Сборник научных статей. Одесса: ОЦНТЭИ, 2000. — С. 310-312.

2. *Кандыбин Н. В.* Бактериальные средства борьбы с грызунами и вредными насекомыми. — М.: Агропромиздат, 1982. — 127 с.
3. *Чертова Т. С.* Обсуждаются проблемы малотоннажного производства биопрепаратов // Защита и карантин растений. — 1997. — № 12. — С. 40 — 41.
4. *Кандыбин Н. В., Корешкова Г. Н., Коган Н. В. и др.* Технологический регламент на производство влажного зернового бактороденцидва. — М.: Союзсельхозхимия, 1980. — 54 с.
5. *Багаева О. С , Беспалов И. Н. , Иваница В. А.* Модернизация регионального производства биопрепаратов // Защита и карантин растений. — 2000. — № 38. — С. 19-20.
6. *Багаєв О. К. , Багаєва О .С. , Беспалов І. М.* Барботажний комплекс для малотоннажного виробництва мікро біопрепаратів // Механізація та електрифікація сільського господарства. Міжвідомчий тематичний науковий збірник. Випуск 85. Глеваха: ННЦ, 2001. — С. 234 — 236.
7. *Багаева О. С., Беспалов И. Н., Везенко О. В.* Новые технологии малотоннажного производства микробиопрепаратов для экологически безопасной защиты растений // Вісник Одеського національного університету. — 2001. — Том 6, вип. 4. — С. 24 — 27.
8. *Багаєва О. С., Іваниця В. О., Багаєв О. К.* Комплект обладнання для виробництва бактороденциду вологого зернового // Наукові розробки Одеського національного університету. Одеса: Астропринт, 2004. — С. 37 — 38.
9. *Кантере В. М.* Теоретические основы технологии микробиологических производств. — М.: Агропромиздат, 1990. — 271 с.
10. *Технические* условия ТУ 10.01.27-89. Бактороденцид влажный зерновой. — М.: Союзсельхозхимия, 1989. — 17 с.

О. С. Багаева, О. В. Везенко, Т. А. Беляева, А. Н. Полтавский, В. Г. Коритнянская, Т. В. Гудзенко
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ В ФЕРМЕНТЕРАХ БАРБОТАЖНОГО КОМПЛЕКСА

Резюме

Оптимизирован режим культивирования бактерий в разработанных ферментерах, который обеспечивает достижение концентрации бактериальных клеток в культуральной жидкости 1-2 млрд. кл/мл за 5 — 6 часов культивирования на МПБ и за 5 — 7 часов на гороховой среде. Иммобилизация сальмонелл на зерновой среде происходит на протяжении 8 — 13 часов. Использование данных по оптимизации роста сальмонелл даёт возможность сократить сроки производства бактороденцида в три раза.

Ключевые слова: барботаж, культивирование, оптимизация, сальмонелла, ферментер.

O. S. Bagaeva, O. V. Vesenco, A. K. Bagaev, T. A. Belaeva, A. N. Poltavskii, V. G. Koritnyanskaya, T. V. Gudzenko
Odessa National Mechnikov University,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

OPTIMIZATION CONDITIONS OF CULTIVATION SALMONELLAS IN THE BARBOTAGE COMPLEX'S FERMENTERS

Summary

Regime of bacterial cultivation was defined in produced fermenters, wich provide achievement of the concentration of the bacterial cells in the culture broth 1 — 2 billion cells/ml for 5 — 6 hours of cultivation in the beef-extract liquid media or 5 — 7 in the pea media. Groving salmonellas in the cereal media in the fermenters continues for 8 — 13 hours. Using information for optimization of salmonellas groving gives the possibility to short down the term of producing bactorodencid for 3 times.

Key words: barbotage, cultivation, optimization, salmonellas, fermenter.