

УДК 619.615.37.012

МАСШТАБИРОВАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ РОЖИ СВИНЕЙ

THE SCALING AND OPTIMIZATION TECHNOLOGICAL PROCESSES OF CULTIVATION OF SWINE ERYSIPELAS BACTERIA

Е. В. СУССКИЙ, доктор биологич. наук, директор ФКП «Армавирская биофабрика»

Ю. А. ГЛУШЕНКОВА, микробиолог ФКП «Армавирская биофабрика»

В. Т. НОЧЕВНЫЙ, доктор биологич. наук, профессор ФГБНУ Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт

А. А. РАЕВСКИЙ, кандидат технических наук, зам. директора по научно-техническим вопросам ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности

E. V. SUSSKIY, doctor of biological sciences, head FFE «Armavirskaya biofactory»

Yu. A. GLUSHENKOVA, microbiologist FFE «Armavirskaya biofactory»

V. T. NOCHEVNY, doctor of biological sciences, professor FGBNU Saratov NIVI

A. A. RAEVSKIY, candidate of technical sciences, deputy director for science and technology FGBNU All-Russian research and technology institute of biological industry

Возрастающие потребности практики в активном антигене определило экономическую значимость и актуальность проблемы масштабирования серийного производства стандартного по активности антигена бактерий рожки свиней. При решении этой задачи проводили исследования по совершенствованию средств и методов стационарного и периодического культивирования микроорганизма. Представлены данные о потребности *Erysipelothrix rhusiopathiae* в бульоне Хоттингера, содержащем более 150 мг% аминного азота и полипептидной фракции с *Mm* 1000 D и внесении в состав питательной среды органической формы двухвалентного железа, стимулирующих рост и уровень накопления микроорганизма стационарным и периодическим способом культивирования. Доказана возможность и эффективность масштабирования условий и технологических процессов размножения бактерий рожки свиней стационарным и периодическим способами с использованием статистических методов контроля показателей в соответствии с требованиями национальных и международных стандартов.

Ключевые слова: микроорганизмы, органические соединения железа, посевной материал, параметры культивирования бактерий.

The increased needs in the practice of the active antigen identified the economic importance and urgency of the problem of scaling serial production standard by the activity of the antigen of the bacteria of swine erysipelas. In solution these problems the research was conducted on

improvement the means and methods of stationary and periodic cultivation the microorganism. The presented data on the needs of *Erysipelothrix rhusiopathiae* Hottinger's broth containing more than 150 mg% of amine nitrogen and the polypeptide fraction of *Mm* 10,000 D and introduction into the nutrient medium organic form of ferrous iron stimulating growth and the level of accumulation of microorganisms fixed and periodic cultivation ability. It proved the feasibility and effectiveness of scaling conditions and technological processes of breeding bacteria swine erysipelas stationary and periodic processes using statistical methods for monitoring indicators in accordance with the requirements of national and international standards.

Key words: microorganism, organic ferrous compounds, sowing material, parameters of bacteria cultivation.

Среди инфекционных заболеваний рожа свиней (РС) широко распространена в мире, небезопасна для человека и причиняет свиноводству значительный экономический ущерб. Для профилактики и лечения заболевания разработан широкий спектр иммунобиологических (ИБП) и химиотерапевтических препаратов, а также гипериммунные сыворотки, которые не утратили своей значимости и востребованы практикой.

Масштабирование объемов производства биопрепаратов требует применения современного оборудования, питательных сред (ПС) с высоким ростовым потенциалом и методов крупномасштабного культивирования микроорганизма. Решение указанных проблем имеет чрезвычайно большое

значение для практики, особенно при серийном производстве биопрепаратов, отвечающих требованиям отечественных и международных стандартов [1—4].

Для получения рожистых антигенов традиционно используют стационарный метод культивирования микроорганизма на МПА и в МПБ в бутылках. Этот метод применяется, в основном, для поддержания селекции и изучения биологических свойств штаммов бактерий РС.

Наиболее перспективный и экономически оправданный — метод периодического культивирования микроорганизмов, эффективность которого зависит от качества ПС и технологических процессов изготовления антигена.

Следует также указать на необходимость поиска высокоэффективных биодобавок, в том числе железосодержащих препаратов, оказывающих существенное влияние на рост, масштабирование и экономичность производства антигенов бактерии РС стационарным и периодическим способами [5—8].

Цель работы — оптимизировать условия культивирования и масштабировать объемы производства антигена бактерий рожи свиней.

В работе использовали штаммы бактерий рожи свиней — *Erysipelothrix rhusiopathiae* 1689 A (серовар 1а), 1329 A (серовар 1в), 1933 B (серовар 2а) и вакцинный штамм ВР-2. Производственные штаммы РС, аттестованные в ВГНКИ, обладали характерными культуральными, морфологическими, биохимическими, антигенными и вирулентными свойствами.

Изготовление посевного материала (ПМ).

Лиофилизированные штаммы микроорганизмов главного (Master seed) и рабочего (Working seed) банков готовили и хранили в течение двух лет при температуре 6 ± 2 °С. Штаммы бактерий освежали в бульоне Хоттингера (БХ) и на МПА и контролировали по ростовым свойствам, морфологическим и вирулентным показателям. Культуры бактерий ПМ, выросшие на полужидком агаре (ПЖА), фасовали в пастеровские пипетки, герметизировали, хранили при температуре 6 ± 2 °С и использовали в производстве для получения рабочих расплодок (Production seed).

Культивирование микроорганизмов. Штаммы бактерий РС культивировали стационарным методом в стеклянных бутылках объемом 10–20 л и периодическим способом в модернизированном реакторе объемом 600 л и биореакторе «Торнадо» объемом 200 л, оснащенном герметичным приводом и пультом автоматического управления технологическими процессами (ТП): регулирование температуры (t °С), концентрации водородных ионов (рН среды), парциального давления растворенного в среде кислорода (pO_2) и контроля окислительно-восстановительного потенциала (еН).

Сосуды заполняли на 2/3 объема БХ с концентрацией аминного азота (АА) не ниже 160 мг% и полипептидной фракции с молекулярной массой Мм более 1000 D. Затем вносили посевной материал (ПМ) микроорганизмов из расчета 5—10% к объему среды ($200\text{—}300$ млн/см³) и выращивали при регламентированных ТП в течение 12—14 ч при постоянном перемешивании ($100\text{—}150$ мин⁻¹), температуре $36 \pm 0,5$ °С, рабочем давлении 0,3 мПа и дробной подаче раствора глюкозы.

Ростовой потенциал ПС и физиологическую активность бактерий оценивали графическим методом по продолжительности фаз приспособления ($t_{\text{лог}}$), максимальной удельной скорости роста (μ_{max}) бактерий, длительности времени одной генерации (q min) в процессе культивирования и по уровню накопления микроорганизмов [9].

В качестве железосодержащего соединения использовали комплексный препарат «Пептофер» производства ООО «А-БИО», содержащий в своем составе 3% двухвалентного металла с пептидами. Препарат вносили в ПС в виде стерильного раствора с концентрацией 1% и оценивали стимулирующее действие и ростовой потенциал микроорганизмов в сравнении с контролем [7, 8].

Биохимические показатели исходного БХ оценивали общепринятыми методами. Концентрацию бактерий РС оценивали соответственно турбодиметрически на КРК-1-ХЛ-42 или по стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича, а морфологию — микроскопией мазков, окрашенных по Граму, а также чистоту и ферментативные свойства [10].

Статистическую обработку показателей качества ПС и накопление БР свиней осуществляли с помощью программы «Статистика 6S» фирмы Stat Soft (USA).

Определяющими факторами успешного производства бактериальных антигенов служат ростовой потенциал гидролизатных ПС, метод и условия культивирования микроорганизмов, применение биологически активных препаратов, стимулирующих размножение бактерий, в том числе рожи свиней, а также обеспечение оптимальных технологических процессов (ТП) современным оборудованием.

Предварительные исследования показали, что максимальное накопление бактерии РС достигается периодическим способом в стандартных сериях БХ с АА не ниже 160 мг% и пептидной фракцией с Мм более 1000 D. Доказано также стимулирующее влияние железосодержащего препарата «Пептофер» в концентрации 1% на интенсивность размножения микроорганизма [6].

С учетом полученных данных оценивали кинетику роста бактерий РС в биореакторе «Торнадо» при оптимальных технологических параметрах без добавления (контроль) и с внесением в БХ железосодержащего препарата «Пептофер» в концен-

трации 1,0%. В процессе периодического культивирования штамма 1933 бактерий РС была установлена общая закономерность в динамике размножения микроорганизма.

После инфицирования БХ в течение 1—2 ч в опыте и контроле происходит адаптация микроорганизмов к ПС практически без изменения pH среды (лаг фаза). В течение последующих 8—9 ч наблюдается интенсивный рост микроорганизмов и снижение pH среды (лог фаза). На заключительном этапе (стационарная фаза) регистрируется прекращение роста, снижение жизнеспособности и лизис клеток бактерий РС (рис.).

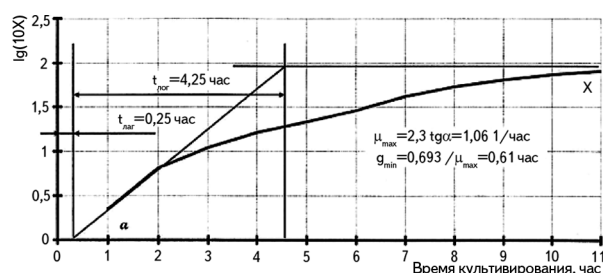
Анализ динамики роста бактерий РС в биореакторе «Торнадо» свидетельствует (по сравнению с контролем) о более высоком уровне физиологической и метаболической активности микроорганизмов при дополнительном внесении в состав БХ железосодержащего препарата «Пептофер».

Расчеты показывают, что при периодическом культивировании наблюдается сокращение време-

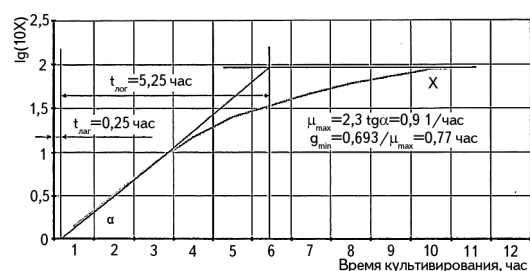
ни максимальной удельной скорости роста ($\mu_{\max}$) и незначительное увеличение минимального времени регенерации ($q \min$) и продолжительности логарифмической фазы роста ($t_{\log}$) микроорганизма в сравнении с показателями контроля.

Окончание процесса периодического культивирования и сроки сбора бакмассы целесообразно проводить в начале стационарной фазы роста микроорганизма, что позволяет повысить уровень накопления и сохранить жизнеспособность бактерий РС в опыте и контроле соответственно на уровне $9,06 \pm 0,54$ и $8,40 \pm 0,80$ млрд/см³ и 94—96% (табл. 1).

Возрастающие потребности практики в антигене бактерий РС послужили основанием для масштабирования производства бакмассы. С этой целью использовали культуральные сосуды различного объема (от 10 до 600 л), стандартные по биохимическим показателям и ростовым свойствам промышленные серии БХ и оптимальные условия стационарного и периодического культивирования



А



В

Рис. Кинетика роста штамма 1933 бактерий рожы свиней при использовании железосодержащего препарата «Пептофер» (А) и контроле (В) в биореакторе «Торнадо»

1. Влияние железосодержащего препарата «Пептофер» на показатели ростового потенциала бактерий рожы свиней в процессе периодического культивирования микроорганизма

Штамм БРС	Концентрация «Пептофера», %	Показатель			
		Продолжительность фазы приспособления ($t_{\text{лаг}}$), ч	Максимальная удельная скорость роста ($\mu_{\max}$), 1/час	Минимальное время регенерации ($q \min$), ч	Продолжительность логарифмической фазы роста ($t_{\log}$), ч
1933	1,0	0,25	0,91	0,77	5,25
	—	0,25	1,0	0,61	4,25

2. Масштабирование производства антигена бактерий рожы свиней стационарным и периодическим способами

Показатель	Накопление БРС (млрд/мл)		
	Метод культивирования		
	стационарный бутыли	периодический модернизированный реактор	биореактор «Торнадо»
Объем сосудов, л	10—20	600	200
Время культивирования, ч	24	15—16	10—12
Расход раствора глюкозы, л	0,4—0,5	7—10	4—5
Концентрация железосодержащего препарата «Пептофер», %:			
—	1,26 ± 0,15	4,1 ± 0,50	8,40 ± 0,7
1,0	2,85 ± 0,21	5,8 ± 0,32	9,06 ± 0,5

бактерий РС. В сравнительном аспекте оценивали также эффективность и перспективность железосодержащего препарата «Пептофер» на размножение микроорганизма в сосудах различного объема (табл. 2).

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что только замена стационарного способа культивирования на периодический в биореакторе «Торнадо» (с использованием стандартного по ростовым свойствам БХ) позволила масштабировать объемы производства, сократить сроки культивирования и повысить уровень накопления бактерий РС соответственно в 10; 2,1 и 6,6 раза.

Показано также, что дополнительное внесение в состав БХ железосодержащего препарата «Пептофер» стимулирует процессы размножения и обеспечивает достоверно более высокое накопление ($9,06 \pm 0,5$ млрд/мл) бактерий РС, чем в контроле ($8,4 \pm 0,07$ млрд/мл) при сохранении микроорганизмами исходных ростовых свойств, морфологических и биохимических показателей.

Следует отметить, что данные технологические решения дали возможность существенно уменьшить потребность производства в РС и снизить затраты на изготовление стандартного антигена для гипериммунизации животных-продуцентов СК против рожи свиней.

● ЛИТЕРАТУРА

1. *Медведев А. П.* Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки. Витебск: УО ВГАВМ, 2007. — 294 с.
2. *Рубан Е. А.* Промышленная технология производства противобактериальных препаратов / Е. А. Рубан, Н. В. Мельник, Е. А. Непоклонов и др.; Под ред. А. Я. Самуйленко — М.: Академкнига, 2006. — 267 с.
3. *Панин А. Н.* Рожа (эризипеллоид) итоги работы и задачи исследования / А. Н. Панин, Р. В. Душук, Л. И. Тихонов // Сборник научн. трудов ВГНКИ — Центр качества ветеринарных препаратов и кормов. — М., 2001. — Т. 2. — С. 44—62.
4. *Ярцев М. Я.* Разработать технологии производства живых сухих вакцин против пастереллеза птиц, рожи свиней и бруцеллеза животных: Дис... д. б. н. — М., 1990. — 397 с.
5. *Телишевская Л. Я., Караваев Б. Е., Аверьянов Е. Г.* Содержание аминокислот и пептидов гидролизата белоксодержащего сырья — Труды ВГНКИ, 1989. — С. 59—65.
6. *Телишевская Л. Я.* Влияние пептидов из белковых панкреатических гидролизатов на рост микроорганизмов / Л. Я. Телишевская, Н. Н. Максимюк, З. Ф. Богаутдинов // Труды ВГНКИ, 1995. — Т. 58. — С. 3—10.
7. *Телишевская Л. Я.* Влияние железосодержащего препарата на эффективность культивирования бактерий рожи свиней / Л. Я. Телишевская, В. Т. Ночевный, Н. Ю. Басова, Е. В. Сусский, Ф. Г. Нагиева, А. П. Плетень // Аграрная наука, 2015. — № 8. — С. 25—28.
8. *Питание и метаболизм патогенных микроорганизмов / Л. Я. Телишевская, Н. К. Букова, А. А. Комаров, В. Т. Ночевный — М.: Научная библиотека, 2016. — 155 с.*
9. *Исаева З. А., Баснакьян И. Я., Запорожцев П. Н.* Методические рекомендации к контролю питательных сред по параметрам роста микроорганизмов в процессе культивирования. — М., 1980. — 27 с.
10. *Досон Р., Элиот Д., Элиот У., Джонс К.* Справочник биохимика. — М: Мир, 1991. — 543 с.

e-mail: arm_bio@mail.kuban.ru,
raevskyaa@mail.ru

НОВОСТИ ЦНСХБ

Шмаков П. Ф. Интенсификация производства и повышение качества говядины на основе рационального использования кормов и генетического потенциала животных: монография / П. Ф. Шмаков. — Омск: ЛИТЕРА, 2016. — 544 с. Шифр ЦНСХБ 17-1207.

В монографии изложены научные основы интенсификации производства говядины. Кратко описаны закономерности роста и развития молодняка крупного рогатого скота, примерные планы роста при выращивании и откорме на мясо молодняка крупного рогатого скота молочных пород. Представлены данные о мясной продуктивности и влиянии уровня кормления на интенсивность роста и формирование мясной продуктивности молодняка крупного рогатого скота. Отмечено, что только повышенный (интенсивный) уровень кормления молодняка от рождения до убоя дает возможность формировать полномясных животных с низкой затратой кормов и высокой рентабельностью производства мяса. Представлены новые данные об использовании в рационах высокопротеиновых кормов (сенажа, искусственно обезвожен-

ных кормов и жмыхов из семян масличных культур сибирской селекции), а также биологически активных веществ в составе зональных (адресных) премиксов. Важным резервом увеличения производства говядины является интенсивное выращивание некастрированных бычков на мясо.

Особо выделены и научно обоснованы вопросы увеличения производства говядины при интенсивном выращивании помесного молодняка, полученного от скрещиваний молочных коров с быками мясных пород, созданию в регионе стад специализированного мясного скота. Уделено внимание откорму выбракованного взрослого поголовья как дополнительному источнику пополнения ресурсов мяса.

Монография содержит 18 иллюстраций, 351 таблицу, глоссарий и библиографический список из 320 отечественных и иностранных источников.

Предназначена для руководителей, специалистов хозяйств АПК, студентов, магистров, аспирантов, преподавателей вузов и сотрудников НИИ, фермеров и слушателей ФПК сельскохозяйственных специальностей.

Обзор подготовлен **ТИМОФЕЕВСКОЙ С. А.**