

*Results of researches.* Investigations of the biological properties of lactic acid bacteria and highly selected strains of microorganisms *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317 for the design of probiotics. Stamsms of *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317, *L. plantarum* 22, *B. adolescentis* 3 п showed high antagonistic activity, a zone of detention of height is a 20,0–25,0 mm; stamsms *B. adolescentis* 23, *St. lactis* 5, *B. longum* 23, *Bacillus subtilis* 1, *L. delbrueckii* 8, *L. plantarum* 19 zone of detention of height a from 10,0 to 19,0 mm.

Investigations of the biological properties of lactic acid bacteria and highly selected strains of microorganisms *L. plantarum* 7, *L. casei* 27, *B. adolescentis* 17, *B. adolescentis* 17-316, *L. plantarum* 7-317 for the design of probiotics.

**Keywords:** probiotic, lactobacillus, bifidobacteria.

УДК 579.62:57.083.1:579.24:579.873.21

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ РОСТОВЫХ ХАРАКТЕРИСТИК СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ *M. AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* (MAP)

Завгородний А.И., Позмогова С.А., Палий А.П., Гончарова Н.В.

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, e-mail: paliy.tub@mail.ru

В статье представлены результаты сравнительного изучения ростовых характеристик изготовленных синтетических питательных сред для выращивания MAP. Установлено, что разработанная синтетическая среда, в состав которой не входят дорогостоящие аминокислоты, по своим характеристикам превосходит известные синтетические среды по выращиванию MAP. Культивирование MAP на этой среде позволяет получить максимальное количество бактериальной массы и культурального протеина с единицы объема при минимальных экономических затратах.

**Ключевые слова:** паратуберкулез, культивирование, синтетические среды, ростовые свойства, накопление бактериальной массы и белка.

Для изготовления специфических диагностикумов (антигенов, аллергенов, вакцины) при паратуберкулезе используют жидкие синтетические питательные среды, благодаря которым можно получить максимальное количество целевого продукта. В настоящее время в рецептуру всех известных жидких синтетических сред для выращивания *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), независимо от состава компонентов, в качестве источника азота входят дорогостоящие импортные левовращающиеся изомеры аминокислот, таких как *L*-аспарагин, *L*-аргинин, использование которых значительно повышает экономические затраты на производство препаратов. Ранее, в СССР в качестве жидких питательных сред для культивирования MAP применялись среды Сотона, Данкина, Дорзета, Новиковой, Аликаевой [1, 2]. За рубежом при изготовлении вакцины и йонина для культивирования MAP применяют модифицированную питательную среду Рейда [3] и среду Watson-Reid [4, 5], первая содержит *L*-аспарагин, вторая – *L*-аргинин.

**Целью** нашей работы было подобрать жидкую питательную среду, обеспечивающую наибольшее накопление бактериальной массы и культурального белка при минимальных финансовых затратах, путем замены импортных аминокислот на менее дорогостоящие компоненты отечественного производства.

**Материалы и методы.** Было приготовлено 7 вариантов жидких синтетических питательных сред, из которых 2 служили контрольными (Сотона и среда Рейда). При изготовлении модифицированных вариантов за основу была взята среда Рейда, в состав которой, входят *L*-аспарагин; калий фосфорнокислый 1-замещенный; магний серноокислый; аммоний лимоннокислый; железо лимонно-аммиачное; декстроза; глицерин. Во всех модифицированных средах вместо декстрозы использовали глюкозу, а вместо аспарагина вносили:

I вариант среды – гликокол;

II вариант среды – Na *L*- глутаминовокислый (глутамат Na);

III вариант среды – равное количество гликокола и глутамата Na;

IV вариант среды – *L*, *D*-аспарагиновую кислоту и глутамат Na;

V вариант среды – *L*, *D*-аспарагиновую кислоту и гликокол.

Режим стерилизации сред 120 °C – 20 минут, pH – 5,8–6,0.

Следует учитывать, что MAP из всех микобактерий наиболее требовательны к составу питательной среды и для максимального накопления бактериальной массы необходима их предварительная адаптация к жидкой среде. Адаптацию с яичной питательной среды для культивирования MAP на жидкие среды проводили путем одноразового пассажа культуры на все варианты синтетических сред, разлитых во флаконы объемом 0,5 л. Флаконы закрывали ватно-марлевыми пробками и инкубировали в термостате на протяжении 1 месяца. По результатам скорости

и интенсивности роста пленки *MAP* была отобрана наиболее перспективная среда (III), с которой был проведен посев пленки в бутылки (n=10 на каждый вариант среды), не менее 3-х петель на бутылку. Бутылки инкубировали в скошенном положении 10 недель. После окончания культивирования, бутылки с культурой инактивировали путем автоклавирования при режиме 120 °С – 60 минут. Бактериальную массу отделяли фильтрованием, а из культурального фильтрата получали белок путем осаждения 40 % трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Критериями ростовых свойств синтетических сред были скорость роста пленки, количество бактериальной массы и культурального белка через 10 недель инкубирования. Рост матричной культуры во флаконах определяли по диаметру пленки (см), в бутылках – по занимаемой площади (%) и толщине пленки.

**Результаты исследований.** Результаты проведенных исследований по изучению роста *MAP* на модифицированных средах при адаптации (во флаконах) представлены в таблице 1.

**Таблица 1 – Рост *MAP* на модифицированных средах при адаптации (во флаконах)**

Вариант среды	Диаметр пленки на поверхности среды (см)		
	через 10 дней	через 20 дней	через 30 дней
I	–	1	2
II	–	1	3
III	2	4	Пленка покрыла 50% поверхности среды
IV	1	2	Рост пленки остановился
V	–	1	Рост пленки остановился

Как видно из данных таблицы 1, при адаптации с яичной среды на жидкие варианты (во флаконах) сред рост пленки на среде III начался раньше, чем на остальных средах. Так, через 10 дней культивирования, диаметр пленки на этой среде составлял 2 см, тогда как на средах I, II и V роста не наблюдали. В этот же период наметился рост и на среде IV, на которой диаметр пленки составил 1 см. Еще через 10 дней культивирования диаметр пленки на средах III и IV удвоился и составил 4 и 2 см соответственно. На вариантах сред I, II и V только через 20 дней был зарегистрирован рост культуры (1 см). Через 30 дней инкубации *MAP* на среде III пленка покрывала половину всей поверхности, на средах I, II площадь пленки увеличилась только в 2–3 раза, а на средах IV, V рост культуры прекратился.

Таким образом, наилучшими адаптационными свойствами (срок появления первых признаков роста, интенсивность роста) обладала среда III, которая была выбрана для дальнейшей работы.

Далее, адаптированную матричную культуру из флакона переносили по 3 петли в бутылки с синтетическими средами Рейда (n=10), Сотона (n=10) и модифицированной средой III (n=10). Бутылки с посевами инкубировали в течение 10 недель, через каждые 10 дней учитывали скорость и интенсивность роста пленки. Результаты изучения ростовых свойств разных синтетических сред представлены в таблице 2.

**Таблица 2 – Ростовые свойства синтетических сред во втором пассаже (в бутылках)**

Срок культивирования (дни)	Модифицированная среда (III)				Среда Рейда				Среда Сотона			
	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Площадь пленки, %	25	50	100	x2	10	30	50	100	–	–	10	50
Бакмасса, г/л	25,00±1,6				18,60±0,54				5,85±0,12			
Культуральный белок, г/л	10,85±0,29				6,2±0,25				2,96±0,31			

**Примечание:** \* – увеличение толщины пленки в 2 раза.

Как видно из данных таблицы 2, наиболее интенсивный рост наблюдался на модифицированной среде. Так через 5 дней культивирования, тонкая, нежная пленка *MAP* занимала четверть поверхности модифицированной среды, тогда как на среде Рейда площадь пленки составляла 10 %. Через 20 дней инкубирования вся поверхность модифицированной среды была затянута тонкой пленкой, тогда как на среде Рейда культура занимала только 50 % поверхности. При дальнейшем росте *MAP* на модифицированной среде наблюдали утолщение пленки, образование складок, бугристости, провисания пленки вглубь среды, заплзвания ее на стенки бутылей. На среде Рейда рост по всей поверхности в виде тонкой пленки наблюдали только через месяц культивирования. При дальнейшем культивировании интенсивность роста пленки на среде Рейда несколько увеличилась, но через 7 недель пленка под тяжестью веса упала на дно бутылей.

Наихудшими ростовыми характеристиками обладала среда Сотона. Так площадь пленки *MAP* через 30 дней культивирования занимала только половину поверхности, а рост культуры по всей поверхности среды регистрировали через 45 дней инкубирования.

После окончания срока культивирования (через 10 недель), инактивированную бактериальную массу отфильтровывали от культуральной жидкости через ватно-марлевый фильтр, отжимали и взвешивали. В определенный объем культурального фильтрата добавляли 40 % ТХУ до 4 % конечной концентрации. Через 18 часов осажденный белок центрифугировали в заранее взвешенных

центрифужных стаканах и определяли вес. Данные о накоплении бактериальной массы и культурального белка на синтетических средах представлены в таблице 2.

Как видно из результатов таблицы 2, накопление бактериальной массы и культурального белка на модифицированной среде происходит гораздо интенсивнее. Так, вес бактериальной массы на модифицированной среде составил  $25,0 \pm 1,6$  г/л ( $P=0,15\%$ ), что в 1,34 раза больше по сравнению с ее количеством на среде Рейда ( $18,6 \pm 0,54$  г/л) и в 4,3 раза больше, чем на среде Сотона ( $5,85 \pm 0,12$  г/л). Выход культурального протеина с модифицированной среды составил  $10,85 \pm 0,29$  г/л, что в 1,75 раза больше, чем со среды Рейда ( $6,2 \pm 0,25$ ), и в 3,6 раза, по сравнению со средой Сотона ( $2,96 \pm 0,31$ ).

Таким образом установлено, что разработанная синтетическая питательная среда, в состав которой входят не дорогостоящие отечественные компоненты, по ростовым характеристикам превосходит известные синтетические среды. Кроме того, экономические затраты на изготовление единицы объема модифицированной среды в 15 раз меньше, чем среды Рейда.

**Выводы и перспективы дальнейших исследований.** Разработанная синтетическая питательная среда позволяет получить максимальное количество целевого продукта с наименьшими экономическими затратами.

Разработанная синтетическая среда может быть использована при производстве аллергенов и антигенов.

#### Список литературы

1. *Методы частной микробиологии* [Текст] : учебно-методическое пособие / Д.А. Васильев [и др.]. – Ульяновск, 2004. – 224 с.
2. *Иванова, Н.А.* Культивирование микобактерий паратуберкулеза на жидких питательных средах [Текст] / Н.А. Иванова // *Инфекционная патология с/х животных* : тр. ВИЭВ. – М., 1984. – Т. 61. – С. 67–72.
3. *OIE Terrestrial Manual 2008, Ch. 2.1.11.* – Paratuberculosis.
4. *Watson, E.A.* Tuberculin, Johnin and Mallein derived from non-protein media [Текст] / E.A. Watson // *Canadian Public Health Journal.* – 1935. – № 26. – P. 268–275.
5. *Paratuberculosis Organism, Disease, Control* [Текст]: Edited by Marcel A. Behr, Desmond M. Collins. – 2010. – 388 p.

### COMPARATIVE STUDY OF SOME DESCRIPTIONS OF SYNTHETIC NOURISHING ENVIRONMENTS FOR GROWING OF *M. AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS* (MAP)

Zavgorodniy A.I., Pozmogova S.A., Paliy A.P., Goncharova N.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

*For making of specific diagnosticums (antigens, allergens, vaccine) at paratuberculosis use liquid synthetic nourishing environments due to that it is possible to get the maximal amount of having a special purpose product.*

*The aim of our work was to pick up a liquid nourishing environment providing the most accumulation of bacterial mass and cultural albumen substitutionally the imported amino acids on the less expensive components of home production.*

*The 7 variants of liquid synthetic nourishing environments from that 2 served as control (Sotone and environment of Raid) were prepared. At making of the modified variants for basis the environment of Raid, in the complement of that, was taken, L-asparagine; potassium phosphoric sour 1-deputized; magnesium sulphuric sour; ammonium citric-acid; iron lemon-ammoniac; d-glucose; glycerin. In all modified environments instead of d-glucose used glucose, and instead of asparagine brought in:*

*I a variant of environment is a glycocoll;*

*II variant of environment - Na L-glutamate sour (glutamate of Na);*

*III a variant of environment is an equal amount of glycocoll and glutamate of Na;*

*IV variant of environment - L, D- aspartic and glutamate of Na;*

*V variant of environment - L, D- aspartic and glycocoll.*

*Mode of sterilization of environments 120 °C – 20 minutes, pH 5,8–6,0.*

*As a result of undertaken studies it was set that the best adaptation properties (term of appearance of the first signs of height, intensity of height) were possessed by the environment of III, that was chosen for further work. The worked out synthetic nourishing environment allows to get the maximal amount of having a special purpose product with the least economic expenses, that does her perspective for using for the production of allergens and antigens.*

**Keywords:** paratuberculosis, cultivation, synthetic environments, properties nourishing, accumulation of bacterial mass and albumen.