Розділ 4
ЕПІЗООТОЛОГІЯ, МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ, МІКОЛОГІЯ, ІМУНОЛОГІЯ

УДК: 636.52/58.087.8:612.1

ЛІОФІЛІЗАЦІЯ ПРОБІОТИЧНОЇ КУЛЬТУРИ *BAC. SUBTILIS* ШТАМ *BI-12*

Бібен І.А., к. вет. н., доцент
Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, г. Днепропетровск, e-mail: bibenvet@ukr.net

Анотація. *Були апробовані раціональні режими ліофілізації пробіотичної культури у споровій та бацилярній формах. Застосовані технологічні прийоми дозволяють консервувати нативні біологічні властивості й антимікробну активність упродовж двох років (термін спостереження), за умови зберігання ліофільновисушенних культур у звичайному побутовому холодильнику з подальшою реактивацією на середовищі Гаузе № 2.*

Ключові слова: *пробіотики, Bac. subtilis штам BI-12, спори, вегетативні клітини, технологія ліофілізації, протективно-суспензійне середовище, консервація, нативні біологічні властивості, антимікробна активність.*

Актуальність проблеми. Створення пробіотичних лікувально-профілактичних біопрепаратів на основі спороносних прокаріот *Bac. subtilis* передбачає використання фізіологічно повноцінних і активних мікробних клітин. Відомо, що швидкорослі прокаріоти в процесі завершеного циклу розвитку мікробної популяції на середовищі з кінцевим ресурсом поживних інгридієнтів зазнають генетично детерміновані фізіологічні модифікації й в стадії негативного логарифмічного росту знижуються фізіологічні потенції та функціональна активність відмираючих клітин популяції [7,8].

У лабораторних умовах застосовують різноманітні методи для збереження нативних властивостей культур. Це і давно відомі традиційні способи підтримки мікроорганізмів шляхом періодичних пересівань на елективно-селективних поживних середовищах або зберігання культур у 25 % гліцерині, так і сучасні методи - сублімаційне висушування, зберігання за низьких температурах - переведення живих клітин в анабіотичних стан [1-4, 6].

Жоден із запропонованих методів тривалого зберігання еталонних культур мікроорганізмів не є універсальним й методичні підходи при виборі режимів зберігання ґрунтуються на біологічних властивостях конкретного штаму [1-5].

Мета роботи: розробка та апробування технологічного режиму ліофілізації пробіотичної культури *Bac. subtilis*.

Матеріал та методи дослідження. Для вивчення морфології мікробної популяції готували десятикратне розведення вихідної культури та висівали на м'ясо-пептонний агар, подальше вирощування колоній здійснювали в умовах термостату за температури 37-38°С упродовж 18-24 годин.

Морфологію колоній на щільному середовищі визначали за допомогою бінокулярної лупи із збільшенням × 80, зі скошеним освітленням під кутом 30° у затемненому полі.

Концентрацію мікробних клітин в одиниці об'єму культуральної рідини чи дослідної суспензії визначали, використовуючи галузевий стандарт каламутності на 10 ОД.

Чутливість культур до антибіотиків вивчали диско-дифузійним методом (метод дисків) на середовищі АГВ, використовуючи стандартні диски, просочені антибіотиками.

Фізіолого-біохімічні властивості вивчали за здатністю утилізувати різні вуглеводи, рости на сольових середовищах, відновлювати нітрати, продукувати індол, сірководень та синтезувати ферменти. Оцінювали також рухливість культури.

Статистичну обробку проводили за загальноприйнятими методиками. Результати вважали достовірними на першому рівні значущості.

Результати дослідження. Технологія приготування еталонної спорової культури *Bac. subtilis* штам *BI-12* включає в себе етап отримання спорового матеріалу. Для чого в біологічні матраци зі скошеним поживним середовищем Гаузе № 2, після видалення конденсату з дотриманням загальноприйнятих правил стерильності, вносили, попередньо прогріту за температури 70 °С упродовж 20 хв культуру бацил з посівною дозою не менш 1×10^6 ж.м.к. / $см^3$, яку потім рівномірно розподілили на поверхні агару.

Культуру вирощували за температури 37-38 °С упродовж 4 діб. Потім готували мазки забарвлені за Ціль-Нильсеном та оцінювали завершеність процесу спороутворення, типовість морфології спор і відсутність сторонньої мікрофлори. Після завершення стадії спороутворення (на матрацах) видаляли конденсат та стерильним фізіологічним розчином змивали спорову культуру стерильним фізіологічним розчином з поверхні поживного середовища.

Виготовлену мікробну культуру стандартизували за ряду показників: загальної концентрації мікробних клітин у камері Горяєва; концентрації життєздатних клітин; антагоністичної активності; кількості зрілих спор; термостійкості спор.

Ліофілізацію отриманого спороносного матеріалу пробіотичної культури *Bac. subtilis* штам *BI-12* проводили на установці LIOVAK GT-2. В якості протективно-суспензійного середовища висушування використовували сахарозо-желатинову суспензію із вмістом сахарози і желатину по 3 %. Для приготування сахарозо-желатинового середовища використовували сухі наважки відповідних компонентів, які послідовно розчиняли в очищеній воді з температурою 60 °С. Готове середовище фільтрували, розливали у флакон, автоклавуватися за 121 ± 2 °С упродовж 20 хв, контролювали величину pH.

Механізм захисної дії сахарози пов'язаний із здатністю утримувати деяку кількість вологи, необхідну для збереження життєздатності мікроорганізмів. Сахароза викликає підвищення осмотичного тиску в клітинах, перешкоджаючи тим самим розриву клітинної стінки при висушуванні. Суспензію спор із середовищем висушування (у співвідношенні 1 : 1) розливали в ампули, заморожували в суміші твердої вуглекислоти з етиловим спиртом до температури – 60 °С, потім поміщали у вакуумний апарат і висушували при залишковому тиску 10 Па. Залишкова вологість висушеного біоматеріалу не перевищувала 3 %.

Даний метод зберігання забезпечує підтримання культури в життєздатному стані упродовж тривалого часу без зміни основних біологічних властивостей. Життєздатність і антимікробна активність реактивованого спороносного біоматеріалу залишилася на колишньому рівні після двох років зберігання (термін спостереження) у ліофільно висушеному вигляді.

Наступним етапом наших досліджень була ліофілізація вегетативної культури *Bac. subtilis* штам *BI-12*. Вегетативний біоматеріал пробіотичної культури більш однорідній, але у той же час менш стійкий до несприятливих факторів процесу ліофілізації. Ліофільне висушування проводили за аналогічною для спор, технології висушування. Культуру для ліофілізації вирощували на середовищі Гаузе № 2 упродовж 18 годин.

Життездатність бацил після дворічного зберігання (термін спостереження) у ліофільно висушеному стані становила більше 80 %, зона затримки росту за підтитровки антибіотиків відносно тест-мікробів не змінилася.

Висновки

1. Ліофілізація пробіотичної культури *Bac. subtilis* штам *BI-12* у сахарозо-желатиновому захисно-суспензійному середовищі при залишковому тиску 10 Па до кінцевого вмісту вологи не більше 3 % забезпечує життездатність ліофілізованих спор до 100 % й вегетативних клітин більше 80 % упродовж двох років зберігання (термін спостереження).

2. Ліофільно висушена пробіотична культура *Bac. subtilis* штам *BI-12*, як у споровій, так й у вегетативній формі після дворічного терміну зберігання у процесі реактивації повністю відновлює нативні біологічні властивості та антимікробну активність.

Литература

1. Аркадьева, З.А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения / З.А. Аркадьева // Биологические науки. – 1999. -№ 4. – С. 93-105.
2. Воробьев, А.А. Бактерии нормальной микрофлоры: биологические свойства, защитные функции / А.А. Воробьев, Е.А. Лыкова // Журн. микробиол. – 1999. - № 6. – С. 102-105.
3. Коршунов, В.М. Характеристика биологических препаратов и пищевых добавок для функционионального питания и коррекции микрофлоры кишечника / В.М. Коршунов, Б.А. Ефимов, А.П. Пикина // Журн. микробиол. – 2000. - № 3. – С. 86-91.
4. Куплетская, М.Б. Методы длительного хранения коллекционных микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ / М.Б. Куплетская, З.А. Аркадьева // Микробиология. – 1997. – № 2. – С. 283-286.

5. Опарин, Ю.Г. Повреждение и защита при замораживании и лиофилизации / Ю.Г. Опарин // Биотехнология. – 1996. - № 7. – С. 3-7.
6. Тараканов, Б.В. Механизм действия пробиотиков на микрофлору пищеварительного тракта и организм животных / Б.В. Тараканов // Ветеринария. – 2000. - № 1. – С. 47-54.
7. Шевелева, С.А. Пробиотики, пребиотики и пробиотические продукты. Современное состояние вопроса / С.А. Шевелева [Текст] // Вопр. питания. – 1999. – Т. 68. - № 2. – С. 32-36.
8. Щелкунов С.Н. Штаммы бактерий Bacillus subtilis и Bacillus licheniformis, используемые в качестве компонентов препарата против вирусных и бактериальных инфекций, и препарат на основе этих штаммов / С.Н. Щелкунов, В.А. Петренко, О.Н. Рязанкина и др. [Текст] // Патент RU № 2142287 6A 61K 35/74, Бюл. № 34, 1999. – С. 1-7.

ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ПРОБИОТИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ BAC. SUBTILIS ШТАММ BI-12

Бибен И.А., канд. вет. наук, доцент
Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет
г. Днепропетровск, e-mail:bibenvet@ukr.net

Аннотация. Были апробированы рациональные режимы лиофилизации пробиотической культуры в споровой и бациллярной форме. Использованные технологические приемы позволяют консервировать нативные биологические свойства и антимикробную активность в течение двух лет (срок наблюдения), при хранении лиофильновысушенных культур в условиях бытового холодильника с последующей реактивацией на среде Гаузе № 2.

Ключевые слова: пробиотики, Bac. subtilis штамм BI-12, споры, вегетативные клетки, технология лиофилизации, протективно-суспензионная среда, консервация, нативные биологические свойства, антимикробная активность.

LYOPHILIZATION PROBIOTIC CULTURES *BAC. SUBTILIS* STRAIN *BI-12*

Biben I.A. candidate of veterinary sciences, associated professor
Dnepropetrovsk State Agrarian-Economic University, Dnepropetrovsk, e-mail: bibenvet@ukr.net

Summary. They were tested rational modes of freeze-drying the probiotic cultures in the bacillary and spore forms. The used processing methods allow to preserve native biological properties and antimicrobial activity for two years (time of observation), during storage lyophilization drying cultures in ordinary household refrigerator with subsequent reactivation in the nutrient medium Gause № 2.

Maintaining the populations of economically useful microorganisms in the laboratory in the form to certify industrial crops or reference strains of microorganisms by periodic passages on elective nutrient medium inevitably leads to phenotypic modifications, and during long passages to the unpredictable mutational changes, as well as to the commonplace pollution pure cultures of foreign microflora as a negative consequence of the human factor. Therefore, the method of lyophilization drying is the best way to preserve the purity of cultures working with the necessary functional activity and the source of genetic heterogeneity.

Lyophilization drying spore forms and vegetative biological material has some technological differences that must be considered in the preparation of crops to freeze. Sporulation process considerably longer physiologically and biochemically costly, needs more time to mature spores and their transition into anabiotic state. But as shown by the results of comparative testing regimes sublimation spore forms biological material and vegetative forms, evaporation of moisture from ice like states to a residual content is similar in both samples, and has no effect on preserving the characteristics lyophilization.

Lyophilization microbial cultures is the best method of preservation of native, including specifically of selected biological properties necessary to achieve economically useful purposes. Despite the fact that the bacilli - fertile rods and is in the form of spores can withstand extreme physical-chemical load and can be maintained in long environmental objects, sporulation is not an optimal method of preservation biological useful properties. In the process of sporulation, which is the stress response of the microorganism to extreme effects of external environment, enzymatic unforeseen changes aimed at maximizing preservation of the genetic material, rather than useful functions bacillary cells. Therefore, after the reactivation of spore-bearing biological material needed more time for the expression of functional utility citrons gene pool prokaryotic cells in the elective-selective medium at the optimum temperature range for several passages recovery.

Key words: probiotics, *Bac. subtilis* strain *BI-12*, spores, vegetative cells, lyophilization drying technology, protective, suspension nutrient medium, conservation, native biological properties, antimicrobial activity, reactivation.