

– N 57. – P.49-65. 3. Scott, F.W. Viral Cell cultures contamination [Text] / F.W. Scott // Cornell Vet/ - 1973. – N 63. – P. 536-560. 4. COMMISSION DECISION 2000/608/ES of 27 September 2000 concerning the guidance notes for risk assessment outlined in Annex III of Directive 90/219/EEC on the contained use of genetically modified micro-organisms [Text]. – 2000. – P.18. 5. Pauwels, K. Animal Cell Cultures: Risk Assessment and Biosafety Recommendations. [Text] / K. Pauwels [et al.] // Applied Biosafety - 2007. -Vol 12, N 1 – P. 27-39. 6. Levings, R.L. Bovine viral diarrhoea contamination of nutrient serum, cell cultures and viral vaccines [Text] / R.L. Levings, S.J. Wessman // Dev Biol Stand.-1991.-№ 75; P. 177-181. 7. Veznik, Z. Detection of chlamydiae in animal and human semen using direct immunofluorescence [Text] / Z. Veznik // Vet. Med (Praha). — 1996.- № 41(7).-P. 201-206. 8. Teankum, K. Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks [Text] / K. Teankum // Theriogenology. - 2007. - № 15;67(2). - P.303—10. 9. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals // O.I.E. 6th ed. - 2008. – V. 1-2. – 1343 p. 10. Vaccines (WHO Manual) // [Ел. ресурс] Режим доступу <http://www.who.int/vaccines/en/poliolab/webhelp/Chapter 04/4 4 Cell culture problems identification and elimination.htm>. 11. Boom, R. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. [Text] / R. Boom, C. Sol, M. Salimans et al.//Journal of Clinical Microbiology.–1990.–№ 28(3). – P.495-503

POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE CONTROL OF VIRAL AND MYCOPLASMA CONTAMINATION OF OBJECTS VETERINARY SUPERVISION

Goraychuk I.V., Bolotin V.I., Gerilovich A.P. Korovin, I.V.

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

At the present work it was developed and optimized the methods for molecular-genetic studies according to the presence of bovine virus diarrhoea and mycoplasma in various kinds of biological material. 62 samples of semen, 90 veterinary immunobiological products, 1,084 samples of raw materials for production of native bovine serum and 37 cell cultures of FLK were studied by these methods. It was established that 8 samples of blood serum were contaminated by mycoplasma and 6 contained genetic material of bovine virus diarrhoea.

УДК 636.09:544.722.12

ОПТИМІЗАЦІЯ ПАРАМЕТРІВ СТАДІЇ ДОСУШУВАННЯ ПРОЦЕСУ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ *E.coli* 0-55 ПРИ ВИКОРИСТАННІ МОДИФІКОВАНИХ ЗАХИСНИХ СЕРЕДОВИЩ

Гордієнко О. І., Постосенко В. О., Кравецький Л. Й., Салганська О. О.

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Метод сублімаційного зневоднення широко використовують для одержання сухих форм штамів мікроорганізмів. Процес ліофільного висушування є останнім етапом в технологічному ланцюгу одержання сухих біологічних об'єктів і є вирішальним у системі управління якістю продукту [1].

Нами раніше було розроблено підхід до оптимізації параметрів етапу досушування при ліофільному висушуванні *E.coli* 0-55 з використанням методів планування повного факторного експерименту [1].

Збереження життєздатності і інших біологічних властивостей бактерій в процесі ліофілізації, крім вдало підібраних параметрів висушування, залежить й від інших факторів: фізіологічного стану культури, захисного середовища, тощо [2, 3].

Метою даного дослідження є розробка комплексного підходу на основі оптимізації параметрів стадії досушування процесу ліофілізації штаму *E.coli* 0-55, відтворення його фізіологічних та морфологічних властивостей культури через пасажування на тваринах та підбору ефективного захисного середовища.

Матеріали і методи. При висушуванні *E.coli* 0-55 використовували сублімаційну установку фірми «Telstar LP3», яка характеризується наступними основними характеристиками: глибоким вакуумом 0,17 мВ, температурою конденсора -45-50 °С. В якості компонентів захисного середовища висушування використовували сахарозу і желатин з кінцевою концентрацією 10 % та 1 % відповідно, та модифіковане сахарозо – желатинове середовище з додаванням аеросилу А-300 з кінцевою концентрацією 0,3 %. Співвідношення біологічної складової до захисного середовища складало 1:1 за об'ємом [1].

Постановку повного факторного експерименту (ПФЕ) здійснювали у такій послідовності: планування і реалізація експерименту, на основі якого визначали коефіцієнти регресії рівнянь, які описують досліджуваний процес, виявлення статистичної значущості коефіцієнтів регресії, проведення аналізу рівнянь [4]. Факторами оптимізації стадії досушування слугували наступні: концентрація живих клітин *E.coli* в межах 0,5-1 млн клітин, тривалість та температура стадії досушування (11-23°C).

Результати досліджень. Важливе значення для правильної постановки експериментів, враховуючи їх значну складність і тривалість у часі, має точний вибір вхідних параметрів і діапазону їх варіювання.

Аналіз процесу досушування *E.coli* 0-55 при ліофілізації показав, що, крім трьох вищезгаданих основних вхідних параметрів (концентрації живих клітин, тривалості та температури досушування), на вихідний параметр КҮО може впливати початкова концентрація клітин в суспензії яка подається на сушку.

Тому нами проведені дослідження по відтворенню культурально-морфологічних та фізіологічних ознак *E.coli* 0-55 через пасажування на лабораторних тваринах (білих мишах).

Варіювання факторів вибрані у наступних межах: початкова концентрація живих клітин 0,500±1000 млн/см³, тривалість досушування 8÷12 годин, температура досушування 11-23 °С. Багатофакторний експеримент здійснювали за допомогою матриці планування з використанням кожного з досліджуваних факторів (концентрація живих клітин (Z_1), тривалість досушування (Z_2) та температура досушування (Z_3) за співвідношенням:

$$X_j = \frac{Z_j - Z_j^0}{\Delta Z_j}, \quad (1)$$

де X_j – кодове значення фактора (безрозмірна величина); Z_j – натуральне значення фактора; Z_j^0 – натуральне значення фактора на нульовому рівні; ΔZ_j – натуральне значення інтервалу варіації.

Центр плану з координатами (Z_1^0, Z_2^0, Z_3^0) визначили за виразом:

$$X_j^0 = \frac{Z_j^{\max} + Z_j^{\min}}{2}; \quad J = 1,2,3 \quad (2)$$

де Z_j^{\max} і Z_j^{\min} – відповідно максимальне і мінімальне значення конкретного фактора.

Інтервал варіації ΔZ_j знаходили із співвідношення:

$$\Delta Z_j = \frac{Z_j^{\max} - Z_j^{\min}}{2} \quad (3)$$

У нашому дослідженні координати центру плану мають такі значення:

$$\begin{aligned} Z_1^o &= \frac{Z_1^{\max} + Z_1^{\min}}{2} = \frac{1000 + 500}{2} = 750 \text{ тис.}; \\ Z_2^o &= \frac{Z_2^{\max} + Z_2^{\min}}{2} = \frac{12 + 8}{2} = 10 \text{ год.}; \\ Z_3^o &= \frac{Z_3^{\max} + Z_3^{\min}}{2} = \frac{23 + 11}{2} = 17 \text{ }^\circ\text{C}, \end{aligned} \quad (4)$$

а інтервал варіювання дорівнюють:

$$\begin{aligned} \Delta Z_1 &= \frac{Z_1^{\max} - Z_1^{\min}}{2} = \frac{1000 - 500}{2} = 250 \text{ тис.}; \\ \Delta Z_2 &= \frac{Z_2^{\max} - Z_2^{\min}}{2} = \frac{12 - 8}{2} = 2 \text{ год.}; \\ \Delta Z_3 &= \frac{Z_3^{\max} - Z_3^{\min}}{2} = \frac{23 - 11}{2} = 6 \text{ }^\circ\text{C}. \end{aligned} \quad (5)$$

У безрозмірній системі координат верхній рівень факторів дорівнює +1, нижній -1, в центрі плану - 0.

З метою вивчення сумісного впливу на кінцеву концентрацію живих клітин на кінцеву концентрацію живих клітин після пасажування на лабораторних тваринах Y_1 , на кінцеву концентрацію живих клітин висушених з додаванням модифікованого захисного середовища Y_2 в процесі досушування сублімаційної сушки *E.coli* 0-55 факторів X_1, X_2, X_3 поставлено згідно ПФЕ по матриці планування експерименту 8 дослідів та 5 – в центрі плану. Порядок проведення експерименту (матриця планування) та отримані результати наведені у таблиці 1.

Таблиця 1 – Матриця планування експериментів за оптимізації параметрів стадії досушування сублімаційної сушки відтвореної культури *E.coli* 0-55 при використанні різних захисних середовищ

Номер досліді	Фактори варіювання в натуральних одиницях			Фактори варіювання в безрозмірній системі координат			Вихідні параметри			
	Концентрація живих клітин, тис.	Тривалість етапу, год	Температура етапу,	Концентрація живих клітин, X1	Тривалість етапу, X2	Температура етапу, X3	Захисне середовище: сахароза+желатин (10 %+1 %)		Захисне середовище: сахароза+желатин+ А 300 (10 %+1 %+0,3 %)	
							КУО, Y1, млн	% живих клітин	КУО, Y2, млн	% живих клітин
01	750	10	17	0	0	0	0,350	47	0,620	83
02	750	10	17	0	0	0	0,347	46	0,610	81
03	750	10	17	0	0	0	0,351	47	0,590	79
1	500	8	11	-1	-1	-1	0,105	21	0,115	23
2	1000	8	11	+1	-1	-1	0,560	56	0,590	59
3	500	12	11	-1	+1	-1	0,180	30	0,250	50
4	1000	12	11	+1	+1	-1	0,770	77	0,850	85
04	750	10	17	0	0	0	0,360	48	0,600	80
5	500	8	23	-1	-1	+1	0,170	34	0,230	46
6	1000	8	23	+1	-1	+1	0,620	62	0,630	63
7	500	12	23	-1	+1	+1	0,220	44	0,290	58
8	1000	12	23	+1	+1	+1	0,760	76	0,880	88
05	750	10	17	0	0	0	0,320	43	0,630	84

Після обчислення коефіцієнтів рівнянь регресії для Y_1 та Y_2 за допомогою методів планування експерименту [5] і статистичного аналізу їх значень з використанням критерію Стюдента [6] з ймовірністю 95 % одержані наступні рівняння регресії відповідно для Y_1 та Y_2 :

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

$$Y_1 = 0.423 + 0.254X_1 + 0.059X_2 + 0.022X_3 + 0.028X_1X_2 \quad (7)$$

$$Y_2 = 0.479 + 0.258 X_1 + 0.088 X_2 + 0.039 X_1 X_2 - 0.011 \times 13 X_1 X_3 - 0,011 \times 23 X_2 X_3 \quad (7)$$

Розраховано і показано також відповідність рівнянь (6) та (7), отриманим експериментальним даним за критерієм Фішера [5] з ймовірністю 95 %.

Як видно із рівнянь (6), (7) лінійні моделі адекватно описують залежність Y_1 , Y_2 від вхідних факторів, причому кожний з них позитивно впливає на результат. На кінцеву концентрацію живих клітин впливають майже однаково їх початкова концентрація та температура досушування, а тривалість проведення процесу – вдвічі слабкіше.

Отримані нами дані (табл. 1) показують, що крім досліджених параметрів стадії досушування, на вихід живих клітин значно впливає захисне середовище. Найвищий показник КУО для *E.coli* 0-55 отримано при використанні модифікованого сахарозо-желатинового середовища з додаванням 0,3 % аеросилу А-300 та наступних вхідних параметрів: 1млн. клітин, тривалості стадії досушування 12 годин та температури 23 °С.

Висновки. 1. Використання методів ПФЕ дозволяє адекватно описувати складні процеси стадії досушування ліофілізації *E.coli* 0-55 при значному зменшенні кількості дослідів і підвищенні точності результатів.

Розроблено комплексний підхід до підвищення збереженості клітин *E.coli* 0-55 під час ліофільного висушування, який ґрунтується на використанні методів ПФЕ для оптимізації вхідних параметрів стадії досушування, відтворення фізіологічних та культурально-морфологічних властивостей бактерій через пасаж на лабораторних тваринах та модифікованих захисних середовищ.

Перспективи подальших досліджень. Запропонований комплексний підхід є перспективним у використанні для оптимізації параметрів довго термінованого зберігання у ліофілізованому стані виробничих штамів мікроорганізмів.

Список літератури

1. Постоєнко, В. О., Гордієнко, О. І., Ушкалов, В. О., Кравецький, Л. Й., Салганська О. О. Розробка підходу до оптимізації параметрів стадії досушування процесу ліофілізації *E. coli* 0-55. – К.: Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України 145, 2010.
2. Осадчая, А. И. Влияние некоторых факторов на криорезистентность и хранение жизнеспособности при лиофилизации культур *Bacillus subtilis*. – М.: Биотехнология №3, 2002. – С. 45-54.
3. Микробиологические и вирусологические методы исследований в ветеринарной медицине: справочное пособие / Под ред. А.Н. Головки. – Х.: НТМТ, 2007. – С. 197-205.
4. Асабина, Е. А., Четвериков С. И., Логинов О. Н. Оптимизация биосинтеза ингибиторов роста фитопатогенов бактериями рода *Pseudomonas*. – М.: Биотехнология №3, 2009. – С. 67-71.
5. Разработаны оптимальные методы замораживания и сублимационной сушки микроорганизмов, микробных и вирусных препаратов (заключительный отчет). – Москва, 1980 (руковод. Ю.П. Чернецкий). – № Гос. регистрации 76077549, инв. № Б993961. – 13.10.1981.
6. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев – Л., 1980.

OPTIMIZATION OF *E.COLI* 0-55 LYOPHILIZATION FINISH DRYING STAGE PARAMETERS WHILE USAGE OF MODIFIED PROTECTIVE MEDIUMS

Hordienko O. I., Postoienko V. O., Kravetskiy L.I., Salhanskaya E. A.

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms, Kyiv

Authors advised complex way of E.coli 0-55 living cells output after lyophilization and storage period. It is shown that optimal conditions for E.coli 0-55 lyophilization are usage of modified saccharose – gelatine protective medium with addition of 0,3 % aerosil A-300 and next parameters of finish drying stage: Colony Creating Units (CCU) – 1mill of cells, stage duration 12 hours and temperature 23 °C.

УДК 628.543

МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТА АКТИВНОГО ИЛА В АЭРОТЕНКЕ ИДЕАЛЬНОГО СМЕШЕНИЯ

Денисов А.А., Кадысева А.А., Ганяев А.М., Чичелишвили Г.Д., Бондырев Д.Е., Калистратов И.М., Махров С.В., Скребнев Ю.В.

ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности Россельхозакадемии», г. Щелково, Московская обл.

В настоящее время выполнено большое количество работ по моделированию процессов обработки сточных вод в аэротенках. В настоящей работе сделана попытка не только обобщить эти работы, но и рассмотреть перспективы моделирования биотехнологических процессов, которое является полезным инженерным инструментом в руках исследователей и проектировщиков.

Основной задачей моделирования является оптимизация либо отдельных комбинаций узлов, либо – всего комплекса обработки, включая и выбор конструктивных узлов системы биологической очистки сточных вод.

Моделирование используется в качестве первого шага при выборе структурной и гидравлической схемы, прогнозирования и проведения расчетов и разработке технологической и конструкторской документации.

В настоящей работе рассмотрены процессы бактериального роста и питания и их моделирование в условиях дисперсного роста в аэротенках полного смешения.

Понимание процессов микробного роста и потребления субстрата обязано появлению оригинальных концепций процессов очистки органосодержащих стоков бактериальной микрофлорой активного ила. Начальное развитие этой проблемы было положено концепцией Моно, давшей теоретическое обоснование взаимосвязи между скоростью роста бактерий и концентрацией потребляемого ими субстрата [2, 3, 5].

Главным недостатком традиционных методов моделирования является использование уравнений, описывающих установившиеся взаимосвязи между параметрами процессов. Этим самым игнорируется тот факт, что из-за колебаний нагрузки условия в аэротенках никогда не являются установившимися.