

УДК 57.083.132

UDC 57.083.132

**ИЗУЧЕНИЕ И ПОДБОР РЕЖИМА
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КУЛЬТУРЫ
АЗОТОВАСТЕРСХРООСОЦКУМ НА
ФЕРМЕНТАЦИОННОМ КОМПЛЕКСЕ ОКА
МФ — 100**

**THE STUDY AND SELECTION OF MODES OF
AZOTOBACTER CHROOCOCCUM
CULTIVATION ON OKA MT — 100 BATCH
FERMENTATION COMPLEX**

Петенко Александр Иванович
д.с.-х.н., профессор

Petenko Alexander Ivanovich
Dr.Sci.Agr., professor

Гнеуш Анна Николаевна
аспирант

Gneush Anna Nikolaevna
postgraduate student

Дмитриев Владимир Игоревич
*Кубанский государственный аграрный
университет, Краснодар, Россия*

Dmitriev Vladimir Igorevich
KubanStateAgrarianUniversity, Krasnodar, Russia

Представлены материалы по изучению и подбору режимов культивирования *Azotobacterchroococcum*, соответственно повышение титра клеток (КОЕ) и повышение выхода микробного полисахарида, что способствует продлению сроков хранения готовой продукции

The article presents the materials of the study and selection of modes of *Azotobacterchroococcum* cultivation due to increasing the colony formed units (CFU) and improving the synthesis of microbial polysaccharide that prolongs the shelf life of the finished product

Ключевые слова: РЕЖИМ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, АЗОТОВАСТЕРСХРООСОЦКУМ, ПОЛИСАХАРИД, ФЕРМЕНТАЦИОННЫЙ КОМПЛЕКС

Keywords: CULTIVATING ENVIRONMENT, *AZOTOBACTER CHROOCOCCUM*, POLYSACCHARIDES, BATCH FERMENTATION

Интенсификация технологии микробиологического синтеза - изучение и подбор режимов культивирования является одной многоаспектной проблемой получения биомассы микроорганизмов с высоким титром клеток (КОЕ) и наилучшими физико-химическими показателями конечного продукта. Управляемое культивирование может привести к сокращению времени выращивания микроорганизмов и повысить как качественные, так и количественные показатели продукта ферментации.

Объектом исследования является депонированная в ВКПМ под № В-6010 культура *Azotobacterchroococcum* В 35 входящая в группу аэробных грамотрицательных бактерий фиксирующих молекулярный азот. Молодые клетки *Azotobacterchroococcum* представляют собой короткие, утолщенные палочки с тонкой капсулой, которая иногда отсутствует, из-за чего кокки находятся достаточно близко друг к другу, представляя парные

(диплококки) и тетроидные (тетрококки) образования. По мере старения они теряют свою подвижность, покрываются общей капсулой. В жидких средах с хорошей аэрацией сроки развития азотобактера сокращаются до нескольких суток [1,4,6].

Азот – основной элемент, определяющий урожайность сельскохозяйственных культур. Вместе с тем из большого числа разнообразных соединений азота, встречающихся в почве растения в основном могут использовать минеральные формы этого элемента. Еще в 1901 году М. Бейеринком открыта аэробная бактерия усваивающая молекулярный азот - *Azotobacterchroococcum* размножающаяся при соответствующих условиях в ризосфере сельскохозяйственных культур, что и дало основу утверждать о возможности данного микроорганизма улучшать азотное питание растений[5]. Фиксация молекулярного азота атмосферой азотобактером способствует обогащению почвы и водоемов связанными формами азота легкодоступными для усвоения их микроорганизмами и высшими растениями. Азотобактер способен фиксировать до 20 мг атмосферного азота на 1 г использованного сахара[2].

Источником азота для азотобактера могут служить так же разнообразные минеральные (соли аммония, азотной и азотистой кислот) и органические (мочевина, различные аминокислоты) соединения. Однако если азотобактер развивается только за счет связанного в среде азота, он не выполняет своей основной функции - фиксации молекулярного азота. По отношению к источникам углерода азотобактер является полифагом, хорошо усваивает разнообразные углеводы (моно- и дисахара, некоторые полисахариды), органические кислоты, многоатомные спирты (глицерин, маннит) и другие вещества[3]. Количество и природа внеклеточных выделений, таких как стимуляторы роста растений – гиббереллины, гетероауксины, индолилуксусная кислота и комплекс внеклеточных полисахаридов азотобактера зависит от вида, штамма организма, возраста

культуры и от условий её выращивания. Культура *Azotobacterchroococcum* B 35 в промышленных условиях выступает активным продуцентом гетерополисахаридов–альгинатов, которые являются аналогом полисахарида агара добываемого из морских водорослей, что определяет ценность культуры. Углеводный состав гетерополисахарида капсулы исследуемой культуры представлен 87 % глюкозы и 3 % уроновой кислоты, а также большим количеством D-глюкозы, несколько меньшим D-галактозы и незначительным количеством маннозы и глюкуроновой кислоты. Данные литературы подтверждают наличие в составе полисахарида азотобактера дезоксисахара.[7,11].

Количество полисахаридов в процессе культивирования является важным показателем, так как полисахарид защитной капсулы обеспечивает наилучшую сохраняемость биомассы в процессе хранения, является одним из основных источников энергии. Его образование происходит в процессе выращивания культуры, количество зависит от режима культивирования, главным образом от температуры. Кроме того, полисахарид находится не только в капсуле, но и выделяется во внешнюю среду, что обуславливает высокую вязкость культуральной жидкости после культивирования [5,8]. Так же следует учесть способность микробных полисахаридов в адсорбции токсичных метаболитов в желудочно-кишечном тракте сельскохозяйственных животных при использовании культуры в составе кормовых добавок. [10].

Целью работы является изучение и подбор режимов культивирования *Azotobacterchroococcum* B35, исследование динамики роста титра клеток (КОЕ) и повышенного выхода микробного полисахарида.

Выращивание культуры производилось на ферментационной установке «Ока МФ-100», представленной на рисунке 1.

Рисунок 1 - Ферментационная установка «Ока МФ-100»



Установка предназначена для реализации процессов культивирования микроорганизмов, биосинтеза, биокатализа и биотрансформации биологически активных веществ по энергосберегающей технологии с использованием в качестве продуцентов бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, микроводорослей и тканей.

Установка имеет набор компьютерных программ, обеспечивающих режимы периодического и непрерывного культивирования микроорганизмов.

Культивирование осуществлялось в условиях строгой чистоты культуры, что связано со стерилизацией как основной, так и вспомогательной аппаратуры, а так же всех компонентов, поступающих в ферментер.

Непосредственно процедура непрерывной ферментации проводилась по следующему алгоритму: загрузка среды из исходной емкости в ферментер, стерилизация, охлаждение, посев инокулята через верхний паростерилизуемый разъем, включение аэрирующего воздуха, системы терморегулирования, пульсаторов и контроль за процессом путем отбора проб через нижний паростерилизуемый разъем [8,9].

Хранение музейной культуры *Azotobacterchroococcum B 35* взятой из всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ)

депонированная под № В-6010 осуществляли на плотной питательной среде Burs следующего состава (г/л дистиллированной воды): маннит – 10,0; K_2HPO_4 – 0,64; KH_2PO_4 – 0,16; NaCl – 0,2; NaCl – 0,2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,1; со следующими микроэлементами (мг/л)(x 100 конц): $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 2,5; H_3BO_3 2,9; $CoSO_4 \times 7H_2O$ – 1,2; $CuSO_4 \times 7H_2O$ – 0,1; $MnCl_2 \times 4H_2O$ – 0,09; $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ – 2,5; $ZnSO_4 \times 7H_2O$ – 1,2 [10].

Активная кислотность для оптимального роста культуры *Azotobacterchroococcum B 35* должна быть в пределах $7,0 \pm 0,2$ на начальном этапе роста (0-6 ч.), а с 12 часа культивирования pH поддерживали около 6,0. Для поддержания кислотности в указанных пределах в качестве титранта использовали 5% раствор KOH.

Маточную культуру *Azotobacterchroococcum B 35* готовили на плотной среде Эшби следующего состава (г/л дистиллированной воды): K_2HPO_4 – 0,2; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; NaCl – 0,2; KH_2PO_4 – 0,1; $CaCO_3$ – 5,0; маннит (или сахароза) – 20,0; агар – 20,0; вода дистиллированная [3].

После получения маточной культуры проводили подготовку засевной культуры на жидкой среде Эшби на ротационном шейкере в течение 72 часов, объем составил 800 мл с начальным титром $6,5 \times 10^3$ кл/мл при температуре 30°C.

Для проведения непосредственного процесса ферментации культуры *Azotobacterchroococcum B 35* были подобраны 2 среды – меласно-производственная и Эшби, как наиболее оптимальные для культивирования исследуемой культуры. На основании проведенных ферментаций *Azotobacterchroococcum B 35* на разных средах установили, что полученные результаты как на меласно-производственной, так и на среде Эшби практически не отличаются ни по титру клеток, ни по количеству полисахарида в культуральной жидкости, что и повлияло на выбор меласно-производственной среды как среды для культивирования микроорганизмов, так как является наиболее выгодной с экономической

точки зрения [12].

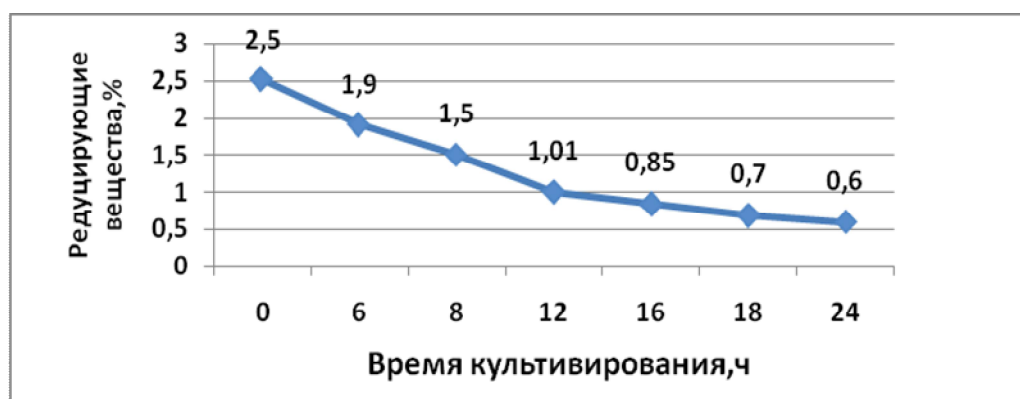
Процесс ферментации осуществлялся на ферментационной установке «Ока МФ-100» в течение 24 часов. Для периодического анализа и регулировки процесса ферментации проводили отбор проб в стерильных условиях. В отобранных пробах определили такие показатели как редуцирующие вещества (рВ, %) –титрометрическим методом по Бертрану, количество клеток (КОЕ) – методом высева на плотные среды (метод Коха), количество полисахарида (г\л) –методом спиртоосаждения, показатель активной кислотности(рН) – потенциометрическим методом [2]. Микроскопированием отобранного материала определяли изменение капсулы клеток культуры *AzotobacterchroococcumB 35* в процессе роста. Следует учесть, что контроль ферментационного процесса проводился непосредственно от взятия музейной культуры до получения конечного продукта ферментации, что представлено в таблице 1.

Таблица 1 - Стадии контроля ферментационного процесса культуры *AzotobacterchroococcumB 35*

| № п/п | Стадия | Объект контроля | Периодичность | Метод контроля |
|-------|--|--|--|--|
| 1 | Выращивание посевного материала | 1 Физиологическое состояние культуры 2 Отсутствие посторонней микрофлоры | Отбор и анализ проб из пробирок | Микроскопирование, методом высева на плотные среды (метод Коха) |
| 2 | Выращивание маточной культуры | 1 Физиологическое состояние культуры 2 Отсутствие посторонней микрофлоры | В конце стадии выращивания | Микроскопирование, метод высева на плотные среды (метод Коха) |
| 3 | Подготовка засевной культуры (72 часа) | 1 Физиологическое состояние культуры 2 Отсутствие посторонней микрофлоры | 0,12,24,36,48,60, 72 часу роста культуры | Микроскопирование, метод высева на плотные среды (метод Коха) |
| 4 | Процессы ферментации (24 часа) | редуцирующие вещества (рВ, %) количество клеток (КОЕ) количество полисахарида (г\л) показатель активной кислотности (рН) – | 0,6,8,12,16,18,24 часа роста культуры | Титрометрический метод по Бертрану, метод высева на плотные среды (метод Коха), метод спиртоосаждения, потенциометрический метод |

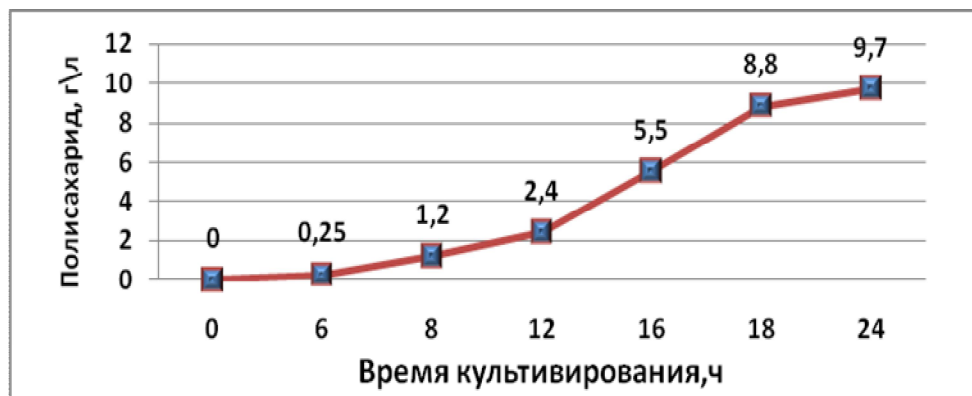
Количество редуцирующих веществ после 12 часов культивирования резко снижается, что вызвано введением культуры клеток в «экстремальные» для неё условия. Клетки при резком снижении температуры культивирования с 30 до 20°C, начинают активное потребление редуцирующих веществ, с целью увеличения защитной капсулы клетки. На рисунке 2 представлены изменение количества редуцирующих веществ в процессе культивирования культуры *Azotobacterchroococcum* B 35 [13].

Рисунок 2 – Изменение количества редуцирующих веществ в процессе культивирования *Azotobacterchroococcum* B 35.



В процессе культивирования *Azotobacterchroococcum* B 35 наблюдается повышение синтеза полисахарида, динамика роста представлена на рисунке 3. Это объясняется тем, что попадая в экстремальные условия клетки накапливают большое количество полисахарида образуя капсулы, а так же выделяют его в среду, чем обусловлена повышенная вязкость культуральной жидкости. Именно количество полисахарида оказывает влияние на увеличение срока годности культуральной жидкости, а в последствии и биопрепарата [14].

Рисунок 3 –Изменение количества полисахарида в процессе культивирования *Azotobacterchroococcum* B 35.



На протяжении всего периода культивирования определяли количество клеток исследуемой культуры микроорганизма, данные представлены в таблице 2, из которой следует, что титр клеток в течение 24 часов культивирования повышался, а резкое снижение температуры не повлияло на данный показатель, что связано с наличием редуцирующих веществ, являющиеся источником энергии для клетки количество через 24 часа ферментации составило 0,6 %

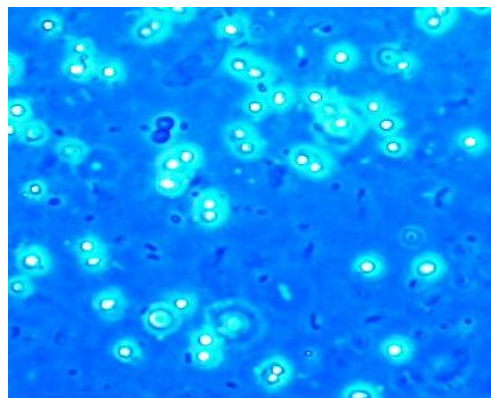
Таблица 2 – Титр *Azotobacterchroococcum* B 35 при изменении температурного режима в процессе культивирования.

| | | | | | | | |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Время культивирования, ч | 0 | 6 | 8 | 12 | 16 | 18 | 24 |
| Температура культивирования, °С | 30 | 30 | 30 | 30 | 20 | 20 | 20 |
| КОЕ кл\мл | $1,6 \times 10^4$ | $8,1 \times 10^4$ | $2,5 \times 10^5$ | $1,2 \times 10^6$ | $7,2 \times 10^6$ | $5,2 \times 10^7$ | $7,7 \times 10^8$ |

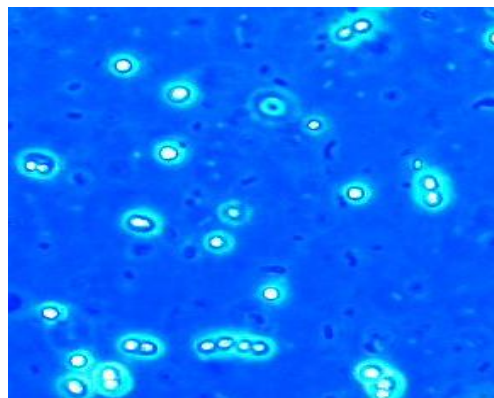
Процесс культивирования характеризуется интенсивным использованием источника углерода для построения капсулярного вещества, что подтверждалось нашими микроскопическими исследованиями, проведенными на универсальных микроскопах проходящего и отраженного света для медико-биологических исследований серии «AxioImager». Полученные микроизображения культуры представлены на

рисунке 3, на которых видна как морфология клеток, так же и наличие полисахаридной защитной капсулы[17]

Рисунок 3 – Микрофотография культуры *Azotobacterchroococcum B 35* после а) 12 и б) 24 часов культивирования (Ув. 600х)



а)



б)

В результате трех последовательных ферментаций были определены оптимальные условия культивирования *Azotobacterchroococcum B 35*. Температурный оптимум для накопления клеток составил 30°C, а для повышенного получения полисахарида 20°C, аэрация была в пределах 1-2 л/л/мин, обороты мешалки –150 об/мин, значение рН поддерживалось в около 6,0[15,16].

После получения в ферментере биомассы клеток с заданным титром производили асептическую расфасовку культуральной жидкости с клетками в подготовленные асептические емкости. Рекомендуемая температура хранения биопрепарата – +5°C.

На основании проведенных исследований можно сделать вывод о целесообразности применения подобранного режима культивирования как в лабораторном, так и промышленном производствах, что подтверждено пилотным культивированием *Azotobacterchroococcum B 35* на ферментационной установке «Ока МФ-100».

Список литературы:

1. Аркадьева З. А., Безбородов А. М., Блохина И. Н. Промышленная микробиология. Учеб. Пособие. М., Высш.шк. 1989.-688 с. ISBN 5-06-001482-7, ББК 28.4 П 81, УДК 663.18
2. Беляк В.Б. Биологизация сельскохозяйственного производства. П., «Пензенская правда», 2008.-320 с.
3. Петенко А.И., Кошаев А.Г., Жолобова И.С., Сазонова Н.С. Биотехнология кормов и кормовых добавок. Учеб. пособие; Кубанский ГАУ. – Краснодар, 2011. – 454 с.
4. Бирюков В.В., Кантере В.М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. М., Наука, 1985. – 78-93 с.
5. Воробьева Л.И. Техническая микробиология. М., Наука, 1987. 148 с.
6. Зайцева Г.Н., Биохимия Азотобактера. М., Наука, 1965 г., 304 с.
7. Кириченко Е.В. Использование *Azotobacter chroococcum* для создания комплексных биологических биопрепаратов. /Кириченко Е.В., Коць С.Я.//Biotechnologia Acta – 2011 - № 3. С. 074-081.
8. Кошаев А. Г. Кормовая добавка на основе ассоциативной микрофлоры: технология получения и использование / А. Г. Кошаев, А. И. Петенко // Биотехнология. – 2007. – № 2. – С. 57–62.
9. Кошаев А. Кормовые добавки на основе живых культур микроорганизмов / А. Кошаев, А. Петенко, А. Калашников // Птицеводство. – 2006. – № 11. – С. 43–45.
10. Матреничева В.В., Иванова А.А., Волкова О.Б. Химико-ферментативная обработка пищевых волокон растительного сырья// Пищевая промышленность, 2004. №8. С 7-12
11. Мишустин Е.Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия. М., Наука, 1975., 341 с.
12. Пат. 2437864, Российская Федерация, МПКС05F3/00, А01С3/00, С05F11/08. Способ микробиологической переработки птичьего помета/ В.И. Дмитриев, И.В. Мартынова. Л.И. Кочкина. Оpubл. 27.12.2011. Бюл. № 7.
13. Перт С. Дж Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир, 1978, С.144-165, 249-258. УДК 576.8.093.3+578.085.23.
14. Роуз Э. Химическая микробиология. М.: Мир, 1971, С.259-265. УДК 576.8
15. Самуйленко А.Я. Основы биотехнологии производства биологических препаратов (Теоретические основы, оборудование, технологические линии)/ А.Я Самуйленко, Е.А Рубан. – М., 2000. 567-612 с.
16. Семенова Л. Э. Изучение параметров аэрации-перемешивания на процесс биосинтеза в микробиологических экспериментах. – Антибиотики, 1983, № 1. с 10-14.
17. Хотянович А. В. Методы культивирования азотфиксирующих бактерий, способы получения и применения препаратов на их основе: Методические рекомендации Л.: Б., 1991. 60 с.

References

1. Arkad'eva Z. A., Bezborodov A. M., Blohina I. N. Promyshlennaja mikrobiologija. Ucheb. Posobie. M., Vyssh.shk. 1989.-688 s. ISBN 5-06-001482-7, BVK 28.4 P 81, UDK 663.18
2. Beljak V.B. Biologizacija sel'skohozjajstvennogo proizvodstva. P., «Penzenskaja pravda», 2008.-320 s.
3. Petenko A.I., Koshhaev A.G., Zholobova I.S., Sazonova N.S. Biotehnologija kormov i kormovyh dobavok. Ucheb. posobie; Kubanskij GAU. – Krasnodar, 2011. – 454 s.
4. Birjukov V.V., Kantere V.M. Optimizacija periodicheskikh processov mikrobiologicheskogo sinteza. M., Nauka, 1985. – 78-93 s.

5. Vorob'eva L.I. Tehnicheskaja mikrobiologija. M., Nauka, 1987. 148 s.
- 6 Zajceva G.N., Biohimija Azotobaktera. M., Nauka, 1965 g., 304 s.
- 7 Kirichenko E.V. Ispol'zovanie Azotobacterchroococcumdlja sozdanija kompleksnyh biologicheskikh biopreparatov. /Kirichenko E.V., Koc' S.Ja.//Biotechnologia Acta – 2011 - № 3. S. 074-081.
8. Koshhaev A. G. Kormovaja dobavka na osnove associativnoj mikroflory: tehnologija poluchenija i ispol'zovanie / A. G. Koshhaev, A. I. Petenko // Biotehnologija. – 2007. – № 2. – S. 57–62.
9. Koshhaev A. Kormovye dobavki na osnove zhivyh kul'tur mikroorganizmov / A. Koshhaev, A. Petenko, A. Kalashnikov // Pticevodstvo. – 2006. – № 11. – S. 43–45.
10. Matrenicheva V.V., Ivanova A.A., Volkova O.B. Himiko-fermentativnaja obrabotka pishhevyyh volokon rastitel'nogo syr'ja// Pishhevaja promyshlennost', 2004. №8. S 7-12
- 11 Mishustin E.N. Mikroorganizmy i produktivnost' zemledelija. M., Nauka, 1975., 341 s.

- 12 Pat. 2437864, Rossijskaja Federacija, MPKC05F3/00, A01C3/00, C05F11/08. Sposob mikrobiologicheskoy pererabotki ptich'ego pomety/ V.I. Dmitriev, I.V. Martynova. L.I. Kochkina. Opubl. 27.12.2011. Bjul. № 7.
13. Pert S. Dzh. Osnovy kul'tivirovanija mikroorganizmov i kletok. M.: Mir, 1978, S.144-165, 249-258. UDK 576.8.093.3+578.085.23.
14. Rouz Je. Himicheskaja mikrobiologija. M.: Mir, 1971, S.259-265. UDK 576.8
15. Samujlenko A. Ja. Osnovy biotehnologii proizvodstva biologicheskikh preparatov (Teoreticheskie osnovy, oborudovanie, tehnologicheskie linii)/ A. Ja Samujlenko, E. A Ruban. – M., 2000. 567-612 s.
16. Semenova L. Je. Izuchenie parametrov ajeracii-peremeshivanija na process biosinteza v mikrobiologicheskikh jeksperimentah. – Antibiotiki, 1983, № 1. s 10-14.
17. Hotjanovich A. V. Metody kul'tivirovanija azotfiksirujushchih bakterij, sposoby poluchenija i primenenija preparatov na ih osnove: Metodicheskie rekomendacii L.: B., 1991. 60 s.