

Актуальность. Основой производства бактериальных препаратов, предназначенных для специфической профилактики инфекционных заболеваний бактериальной этиологии, является культивирование микроорганизмов. Теоретическое и экспериментальное обоснование методов и параметров культивирования микроорганизмов, обеспечивающих воспроизводимое получение популяций с определенными свойствами, всегда привлекали внимание исследователей [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7]. Именно на этой технологической стадии производства вакцин происходит синтез антигенов, от которых зависит эффективность иммунных препаратов. При культивировании микроорганизмов одновременно стремятся к увеличению выхода биомассы и сохранению биологических свойств бактерий [2, 3, 7]. Для этого необходима организация управляемого культивирования микроорганизмов, позволяющая создавать и длительное время поддерживать культуры с постоянной и точно определенной концентрацией биомассы, фазой и скоростью роста [7, 8, 9, 10, 11, 12, 15]. В этой связи разработка современных способов культивирования патогенных микроорганизмов имеет важное прикладное значение в биотехнологии производства противобактериальных препаратов. В настоящее время получение бактериальной массы для вакцин от болезней сельскохозяйственных животных основано на периодическом способе глубинного культивирования микроорганизмов [3, 5, 6, 7, 8]. Стратегия разработки условий культивирования должна включать: - выбор, поддержание и сохранение штаммов микроорганизмов; подбор питательных сред; - оптимизацию периодического культивирования, направленную на сокращение длительности лаг-фазы, увеличение экспоненциальной фазы и числа жизнеспособных клеток; - получение бактериальной массы с заданными свойствами; - изучение возможности применения перспективных методов культивирования. До настоящего времени в производстве биопрепаратов, в том числе и на стадии их разработки в лабораторных условиях, широкое применение находит периодическое глубинное культивирования патогенных микроорганизмов [4, 10]. При культивировании получают бактериальную культуру, включающую клетки микроорганизмов, остатки питательных веществ, различные внеклеточные продукты метаболизма и др. Для получения концентрированной микробной биомассы используют различные методы: флотацию, сепарирования, фильтрацию, экстракцию, ионный обмен, адсорбцию, кристаллизацию, мембранные методы и др. Как правило, технология выделения и очистки продукта включает несколько стадий. В связи с этим весьма актуальной задачей при производстве бактериальных вакцин является разработка технологии концентрирования бактерий, применение которой способствует увеличению выхода конечного продукта и получению качественных биопрепаратов. Наиболее простым в технике исполнения и перспективным с точки зрения расширения возможностей управления процессом является мембранный

биореактор (МБР), в котором развитие популяции происходит в постоянно обновляемой среде. Это обновление осуществляется за счет постоянной или циклической подпитки субстратом и постоянного удаления метаболитов, всех или части, через полупроницаемую мембрану [11, 12, 13, 14, 16]. Сочетание ферментера с мембранным разделителем для удаления продуктов метаболизма бактерий увеличивает концентрацию клеток и продлевает длительность активной фазы роста за счет уменьшения ингибирующего эффекта. Кроме того, использование мембранного биологического реактора (МБР) дает возможность получать положительный эффект и за счет подвода питательных веществ в культуральную жидкость через полупроницаемую мембрану [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22]. Цель настоящей работы – изучение влияния способов культивирования на выход бактериальной массы и качество вакцин для ветеринарной медицины. В работе определяли влияние периодического способа культивирования бактерий и продленного способа культивирования бактерий с использованием мембранного биореактора на выход бактериальной массы и качество вакцин для ветеринарной медицины. Материалы и методы В исследованиях использовали бактерии *Salmonella cholerae* suis № 370 и *Salmonella typhimurium* № 415, *Pasteurella multocida* штаммы Пастеровский, АВ и К Краснодарской НИВС, применяемые при производстве живых сухих вакцин против пастереллеза птиц, а также штаммы А - 8683, В-681 и Д - Т - 80, применяемые при производстве вакцины против пастереллеза свиней. Культивирование сальмонелл и пастерелл проводили на питательной среде, основой которых являлся перевар Хоттингера (%): - пептон – 0,5; - натрий хлористый – 0,3; двузамещенный фосфат натрия – 0,5. Перевар Хоттингера, разведенный дистиллированной водой до - 100,0; содержание аминного азота 185 - 200 мг %, рН готовой среды – 8,0 - 8,2. Перед засевом в среду добавляли 0,1 % глюкозы в пересчете на сухое вещество в виде 40 % раствора. Культуру сальмонелл и пастерелл выращивали в пробирках и флаконах на шуттель-аппарате, а также в ферментере АНКУМ-2М емкостью 3 и 10 литров, которые оснащены системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования (температура, рН, рО₂, еН, расход воздуха на аэрацию, число оборотов перемешивающего устройства и оптическая плотность бактериальной суспензии). Для пеногашения при интенсивном росте бактерий в биореакторах применяли пропиол Б - 400. Мембранный биологический реактор реализован с использованием ферментера Ф - 10 аппаратуры для непрерывного культивирования типа АНКУМ - 2М с вынесенной мембранной установкой для ультрафильтрации. В качестве мембранного разделителя использовали ультрафильтрационный модуль из полупроницаемых мембран в виде полых волокон из ароматического полиамида типа ВПУ - 15ПА с площадью фильтрационной поверхности 1 м². Представленная на рисунке 1 технологическая схема пригодна для культивирования бактерий периодическим и непрерывным способами с отделением продуктов

метаболизма, растворенных в культуральной жидкости, подачей биомассы на дальнейшую переработку с получением вакцин и подачей фильтрованной питательной среды в биореактор. Кроме того, на начальной стадии культивирования бактерий возможно интенсивное их накопление в биореакторе путем концентрирования биомассы бактерий с отбором продуктов метаболизма из культуральной жидкости, возврате концентрированной биомассы в биореактор и подачей фильтрованной питательной среды в биореактор. Морфологические и биохимические свойства бактерий определяли стандартными методами. Жизнеспособность бактерий определяли методом КОЕ. Продолжительность фаз роста, максимальной удельной скорости роста, минимальной продолжительности удвоения (генерации) культур определяли графическим методом. Результаты и обсуждение Культивирование бактерий в лабораторных условиях. Критерием оптимизации периодического способа культивирования бактерий является получение максимального количества живых клеток [18]. Ниже представлены результаты исследований, проведенных с *Pasteurella multocida* штамм Пастеровский, который используют при производстве живой вакцины в промышленных условиях. Для экспериментов с центром в точке, в которой получено наилучшее накопление по оптической концентрации, выбран план 2-го порядка для двух факторов: X_1 - парциальное давление растворенного в культуральной жидкости кислорода (pO_2) и X_2 - pH. Шаги варьирования $DX_1 = 5\%$ нас., $DX_2 = 0,4$ ед pH. Эксперименты проводили методом острых опытов при культивировании пастерелл в течение 1 час. Матрица планирования и полученные результаты приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Матрица планирования и результаты эксперимента по рототабельному плану второго порядка № опытов

№ опыта	X_1	X_2	Y^*
1	1	1	0,30
2	2	1	0,40
3	3	1	0,30
4	4	1	0,40
5	5	1	0,28
6	6	1	0,42
7	7	1	0,35
8	8	1	0,35
9	9	1	0,35
10	10	1	0,35
11	11	1	0,35
12	12	1	0,35
13	13	1	0,35
14	1	2	7,6
15	2	2	7,6
16	3	2	8,4
17	4	2	8,4
18	5	2	8,0
19	6	2	8,0
20	7	2	8,0
21	8	2	8,0
22	9	2	0,22
23	10	2	0,26
24	11	2	0,27
25	12	2	0,23
26	13	2	0,24
27	1	3	0,22
28	2	3	0,16
29	3	3	0,21
30	4	3	0,32
31	5	3	0,31
32	6	3	0,30
33	7	3	0,32

* Y - концентрация жизнеспособных бактерий. ** $R = 1,414$ коэффициент плеча «звездной» точки в центре униформ-рототабельного плана. Зависит от первоначального плана ПФЭ и высчитывается $R = 2n/4$, где n - число опытов. По результатам исследований получена математическая модель 2 порядка на уровне значимости $\alpha = 0,05$: $Y = 0,314 + 0,1125X_2 - 0,0328X_1^2 - 0,0553X_2^2 - 0,020X_1X_2$ Поверхность отклика представляет собой эллиптический параболоид с координатами максимума в кодированных единицах $X_1 = -0,03$, $X_2 = 0,11$, т.е. pO_2 опт. = 35 % и pH опт. = 8,0 ед. В результате проведенных исследований установлено, что оптимальные значения уровней pO_2 и pH на логарифмической стадии роста пастерелл с учетом жизнеспособных бактерий, практически совпадает с таковыми, полученными при оптимизации процесса культивирования по оптической плотности. Таким образом, оба критерия

оптимизации (оптическая плотность и концентрация жизнеспособных клеток) могут в равной степени применяться при разработке режимов культивирования бактерий на логарифмической стадии роста, используемых при изготовлении биопрепаратов. Рис. 1 - Аппаратурно-технологическая схема мембранного биореактора: 1 - ампула с лиофильно высушенными бактериями; 2 - бактерии, выращенными на скошенном агаре; 3 - бактерии, выращенные в жидкой питательной среде; 4 - бактерии, засеянные во флаконы 450мл; 5 - выращивание бактерий во флаконах 450 мл на шуттель-аппарате в термостатируемом помещении; 6-реактор для приготовления питательной среды; 7 -мембранный фильтр для очистки питательной среды; 8 - реактор для стерилизации питательной среды; 9 - насос для перекачки; 10 - биореактор (ферментер) для культивирования; 11 - установка для ультрафильтрации. При культивировании бактерий возможно истощение из культуральной жидкости источника углерода – глюкозы, которая лимитирует рост пастерелл. При этом наблюдается снижение скорости роста микроорганизмов, повышение уровня растворенного кислорода и pH. Антроновым методом определен лимитирующий уровень концентрации глюкозы, который составил 0,01%. Поэтому при выращивании пастерелл во избежание прекращения их роста и, следовательно, увеличения продолжительности технологического процесса необходимо поддерживать концентрацию глюкозы выше лимитирующей. Алгоритм управления культивированием пастерелл можно сформулировать следующим образом: продолжительность культивирования в течение 6 - 8 ч в жидкой питательной среде на основе перевара Хоттингера. После засева pH снижают до -20 , -60 мВ и затем в течение 2 - 2,5 ч парциальное давление растворенного кислорода поддерживается на уровне 10 - 20 % нас. при pH среды 8,2 - 8,6. Затем pH снижают до 7,8 - 8,2 при pO₂ 30 - 40 % нас., а концентрацию глюкозы на протяжении всего процесса поддерживают в пределах 0,01 - 0,3 %.

Культивирование бактерий в производственных условиях. Увеличение объема биореактора показана значимость для роста пастерелл парциального давления растворенного кислорода и необходимость использования на производстве для управляемого культивирования микроорганизмов аппаратов с хорошими массообменными характеристиками по кислороду. Культивирование бактерий в модернизированном химическом реакторе емкостью 1000 л при объеме питательной среды 300 л., числе оборотов мешалки турбинного 180 об/мин, и подачи воздуха в реактор до 270 л/мин. получить положительных результатов не представилось возможным. Через 2,5 - 3 час. при максимально возможном расходе воздуха на аэрацию и перемешивании питательной среды, pO₂ снижалось с оптимального практически до нуля, скорость роста пастерелл значительно уменьшалась и наблюдался линейный рост бактерий (выход их на стационарную фазу, где скорость гибели бактерий, компенсируется скоростью прироста биомассы), что является признаком лимитирования по кислороду.

Через 6 ч выращивания накопление бактерий составляло 15 - 18 млрд/мл. При культивировании в ферментере фирмы «Электролюкс» со скоростью мешалки до 1000 об/мин, представилась возможность регулировать pO_2 в достаточных пределах. Динамика роста пастерелл в ферментере емкостью 400 л соответствовала динамике роста в 10 - литровых лабораторных аппаратах, максимальная удельная скорость роста составляла 1,7 - 1,8 час⁻¹ при накоплении до 50 - 60 млрд. м.к./мл после 6 - 8 часов культивирования. Продолжительность культивирования пастерелл аргументирована тем, что через 6 - 8 часов наступает стационарная фаза роста, при которой культура пастерелл, как известно, обладает высокой иммуногенной активностью и наиболее устойчива к воздействию неблагоприятных факторов в последующих технологических процессах получения вакцин. Оптимальные условия культивирования *Pasteurella multocida* штамм Пастеровский периодически успешно использованы для культивирования штаммов *P. multocida*, также применяемых при производстве вакцин против пастереллеза.

Разработанный управляемый режим культивирования пастерелл защищен патентом РФ № 1566533 «Способ изготовления вакцины против пастереллеза птиц». Используя алгоритм для культивирования пастерелл, разработан алгоритм управляемого культивирования сальмонелл. Питательную среду засевают 16 - 18 часовой культурой сальмонелл, выращенной в жидкой питательной среде аналогичного состава. Засевная доза составляла 8 - 10 % к объёму питательной среды. Сальмонеллы культивируют при 36,5 - 37,5 °C в течение 8 часов. После засева окислительно-восстановительный потенциал снижали до - 90 - - 120 мВ путём выдерживания культуры без подачи воздуха на аэрацию и включения мешалки (от 0,5 до 1,5 часов). Затем до конца культивирования изменения расход воздуха и число оборотов мешалки поддерживают парциальное давление растворённого кислорода на уровне 15 - 25 % от насыщения кислородом воздуха. Используя 10 % раствор NaOH, pH культуральной жидкости поддерживают на уровне 7,6 - 7,7. Дробную подачу глюкозы осуществляют дозами до концентрации 0,15 - 0,25 % при лимитировании роста сальмонелл глюкозой, характеризующемся резким повышением pO_2 при неизменном расходе воздуха и числе оборотов мешалки и прекращении снижения pH культуральной жидкости. В разработанном управляемом режиме культивирования снижение eH до необходимого уровня - 90 мВ достигали путём выдержки культуры сальмонелл в течение получаса без подачи воздуха на аэрацию и при выключенной мешалке. Затем в процессе культивирования уровень eH ко второму часу понижался до - 120 мВ и далее плавно повышался до значения - 100 мВ к четвертому часу культивирования. Значение eH поддерживалось на этом уровне до седьмого часа и затем плавно повышалось до значения - 70 мВ и оставалось на этом уровне до окончания культивирования. Аэрация сальмонелл в разработанном процессе проводилась

следующим образом: в течение первых двух часов (для снижения eH) не производили подачу воздуха и перемешивание, а затем, после снижения eH изменением расхода воздуха и числа оборотов мешалки pO_2 поддерживали на уровне 20 % от насыщения кислородом воздуха. Дробную подачу глюкозы осуществляли дозами до концентрации 0,2 % при лимитировании роста сальмонелл глюкозой, характеризующегося резким повышением pO_2 , при неизменных расходе воздуха и числе оборотов мешалки, и прекращением закисления культуральной жидкости. Как показали результаты опытов, накопление жизнеспособных сальмонелл составило до 40,0 млрд/см³ через 9 часов культивирования. При этом фаза приспособления продолжалась 0,15 часа, а лог-фаза - 4,5 часа. Максимальная удельная скорость роста популяции сальмонелл составила 1,21 час⁻¹, а время удвоения - 0,57 часа. В таблице 2 представлены результаты накопления жизнеспособных сальмонелл при культивировании по экспериментальному режиму.

Таблица 2 - Накопление жизнеспособных сальмонелл при культивировании

Продолжительность культивирования, час	Накопление жизнеспособных сальмонелл, млрд. м.к.
S.choleraesuis штамм 370	0,035
S.typhimurium штамм № 415	0,02
1	0,9
0,19	2
1,7	1,6
3	2,0
2,2	4
2,3	2,3
5	5,6
4,9	6
17,7	11,2
7	20,0
19,8	8
24,3	20,1
9	24,1
18,7	

Разработанный управляемый режим культивирования сальмонелл позволил сократить продолжительность фазы приспособления с 0,5 часа до 0,15 часа, увеличить продолжительность логарифмической фазы с 1,4 часа до 4,5 часов, увеличить максимальное накопление бактерий с 5,5 до 20,0 - 40,0 млрд/см³ и сократить продолжительность культивирования с 12 часов до 6 - 8 часов.

Разработанный управляемый режим культивирования сальмонелл защищен патентом № 2129016 «Способ изготовления вакцины против сальмонеллеза сельскохозяйственных животных». Культивирование бактерий в мембранном биореакторе. Проведено сравнение традиционного периодического способа культивирования сальмонелл в биореакторе с культивированием в МБР (рисунок 1). После засева биореактора бактерии культивировали неуправляемым периодическим способом в течение 4 часов. Исследования показали, что через 4 часа культивирования сальмонелл в неуправляемом режиме культурой достигается стационарная фаза роста. Дальнейшее культивирование бактерий не целесообразно. Периодическое культивирование бактерий в МБР при управляемом режиме (регулированием pO_2 , pH) сопровождалось непрерывным концентрированием биомассы на установке для ультрафильтрации, ее возвратом в биореактор, отбором продуктов метаболизма и одновременной подачей питательной среды в биореактор. Через 12 часов культивирования сальмонелл в данном режиме культура достигала стационарной фазы.

Культивирование сальмонелл с использованием МБР периодическим способом в сочетании с управляемым режимом позволяет продлить рост бактерий и увеличить накопление жизнеспособных сальмонелл в 3 - 4 раза больше, чем при

культивировании периодическим неуправляемым способом. Показано, что культивирование бактерий сальмонелл в МБР непрерывным способом управляя режимом (регулированием pO_2 , pH), дает возможность поддерживать в течение длительного времени концентрацию клеток, удельную скорость роста и концентрацию питательных веществ. Когда культура микроорганизмов выходит на экспоненциальную фазу роста (лог-фазу) отбирается 2/3 от объема ферментера и биомасса концентрируется на установке для ультрафильтрации и подается на дальнейшую переработку. Затем в биореактор подается очередная доля питательной среды и культивирование продолжается до следующего отбора биомассы. Коэффициент разбавления питательной средой при этом поддерживался в пределах 0,5 - 0,7 ч⁻¹. При культивировании данным способом в культуральной жидкости концентрация сальмонелл увеличивается более чем в 7 раз. Отбор культуры микроорганизмов на этапе лог-фазы позволяет значительно повысить концентрацию жизнеспособных бактерий и получать вакцины с лучшими иммуногенными свойствами при хранении. Культивирование бактерий в МБР снижает фактор накопления ингибирующих рост продуктов жизнедеятельности микроорганизмов, которые приводят к существенным морфологическим и физиологическим изменениям культуры – лизис клеток. Следует отметить, что непрерывный способ культивирования микроорганизмов в МБР позволяет организовать дальнейшее непрерывное получение вакцины увеличив эффективность работы технологического оборудования.. Выводы

Установлена целесообразность культивирования бактерий пастерелл и сальмонелл для получения вакцин с лучшими иммуногенными свойствами управляемыми периодическим и непрерывным способами в мембранном биореакторе. Показана возможность создания мембранного биореактора на базе традиционного биореактора с использованием ультрафильтрационной установки.