

УДК 579.872.1

UDC 579.872.1

03.00.00 Биологические науки

Biology

**ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ШТАММА *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*****FEATURES OF THE CULTIVATION OF
PROPIONIBACTERIUM SHERMANII STRAIN**Волобуева Елена Сергеевна
аспирантVolobueva Elena Sergeevna
postgraduate studentАнискина Мария Владимировна
аспирантAniskina Mariya Vladimirovna
Postgraduate studentПетенко Александр Иванович
д. с-х. н., профессорPetenko Alexander Ivanovich
Dr.Sci.Agr., professorВолкова Светлана Андреевна
канд. биол. наук, доцент
*Кубанский государственный аграрный университет,
Краснодар, Россия*Volkova Svetlana Andreevna
Cand. Biol. Sci., assistant professor
Kuban State Agrarian University, Krasnodar, Russia

Представлены материалы о средах для выращивания и промышленного культивирования *Propionibacterium shermanii*: Trypticase Yeast Extract Glucose Medium, среда Эллингера и среда ATCC Medium 33. Исследовано изменение pH и её влияние на накопление биомассы пропионовокислых микроорганизмов. Выяснено оптимальное время культивирования

We have presented materials about nutrient media for growing and industrial the cultivation of *Propionibacterium shermanii*: Trypticase Yeast Extract Glucose Medium, the culture medium Ellinger and ATCC Medium 33. We have studied pH change and its impact on the biomass accumulation of propionic acid microorganisms. We have also defined the best time of cultivation

Ключевые слова: ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА, БАКТЕРИАЛЬНЫЙ КОНЦЕНТРАТ, НАКОПЛЕНИЕ БИОМАССЫ, КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ, ШТАММ *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*.

Keywords: NUTRIENT MEDIUM, BACTERIAL CONCENTRATE, THE ACCUMULATION OF BIOMASS, MICROORGANISM CULTIVATION, STRAIN *PROPIONIBACTERIUM SHERMANII*

Введение

Пропионовокислые микроорганизмы - первоочередные участники пропионовокислого брожения. Эти бактерии сбраживают такие субстраты как сахароза, глюкоза, малат, лактоза и лактат, глицерол, образуя пропионовую, янтарную, а так же уксусную кислоты, углекислый газ, ацетон и диацетил. К тому же в процессе образуются такие ароматические соединения как пропионовый альдегид, диметилсульфид, этанол, пропанол. Род *Propionibacterium* включает грамположительные неподвижные палочки, не образующие спор. При неблагоприятных условиях роста часто появляются булабовидные формы. Пропионовокислые бактерии - неподвижные палочки размером 0,5-0,8 или

1,0-1,5 мкм [3].

Виды *Propionibacterium* относится к микроаэротолерантным формам - пропионовокислые бактерии не растут на твердых средах при попадании воздуха. К тому же, давно известно, что они обладают гемсодержащими ферментами, в первую очередь это каталаза. Исследованные представители этого рода оказались способными расти как в анаэробных, так и в аэробных условиях. При достаточно слабой аэрации рост их клеток во много раз больше, чем в анаэробных условиях. Но в случае аэробного роста скорость диффузии кислорода из газовой фазы в бактериальную массу не должна превышать его потребления в процессе дыхания: кислород при измеримых давлениях оказывает токсическое действие [4].

Пропионовокислые бактерии не обитают в почве или водоемах. Встречаются они в основном в рубце и кишечнике жвачных животных (овец, коров), в различных молочных продуктах (но не в молоке).

Колонии влажные, на ранних стадиях роста - искривленные, ветвящиеся палочки. На поздних стадиях - кокковидные, круглые или в виде овала, маслянистые, блестящие. Цвет микроорганизмов кремовый, желтый, красный, оранжевый, коричневый. Пропионовокислые бактерии под микроскопом имеют своеобразное "полисадное" расположение клеток, иногда образуют короткие цепочки вследствие деления. А также "иероглифы" при делении с защелкиванием. Клетки неровные, с округлыми концами иногда со слизью или слизистыми тяжами [2].

Кроме основных продуктов в разных количествах в культуральной жидкости пропионовых бактерий обнаружены различные кислоты - молочная, изовалериановая, муравьиная, этиловый спирт и пропиловый спирт, уксусный, пропионовый альдегиды, ацетон. Конечные продукты брожения зависят от культуры бактерий, условий культивирования и состава среды. Это касается видов накапливаемых продуктов, и соотношений между ними. Соотношение продуктов брожения может быть

разное. Оно зависит от степени окисленности источника углерода. Так, при росте на среде с глицерином, отношение пропионовая : уксусная 2:1, с лактатом 1:1,5 и пируватом 1:2. С другой стороны, при культивировании пропионовокислых бактерий в строго анаэробных условиях соотношение между количествами кислот отклоняется в обратную сторону; именно в этом случае на одну молекулу уксусной всегда образуется 3 молекулы пропионовой.

Большое влияние имеет значение концентрации ионов водорода. Когда увеличивается концентрация ионов водорода в среде изменяется соотношение основных продуктов брожения: образуется больше уксусной кислоты, а количество пропионовой заметно снижается. Соотношение пропионовой и уксусной кислот зависит от состава и свойств среды и внешних условий существования микроорганизмов. В сырах в период максимального развития культуры пропионовых бактерий (первая фаза) в основном образуются относительно окисленные соединения (уксусная кислота), в период спада развития - преимущественно более восстановленные (вторая фаза). Но при замедлении развития культуры *P. shermanii* (замена пептона аммонийными солями) уксусная кислота превалирует перед пропионовой, однако и в этом случае отношение пропионовой кислоты к уксусной возрастает. Этот пример служит доказательством связи продуцирования кислот с составом среды. Отношение пропионовой кислоты к уксусной зависит также от вида бактерий. В среде с глюкозой и дрожжевым автолизатом пропионовокислые бактерии рода *P. thonii* продуцируют указанные кислоты в отношении 5:1. Для культур *P. shermanii* (9 штаммов) отношения пропионовой кислоты к уксусной колеблется от 1,4 до 2,8.

Исследуя сбраживание глицерола клетками *Propionibacterium acidipropionici*, Вуд и Веркман (1936) нашли, что при этом происходит фиксация CO₂, поддающаяся количественному определению. Связанный

углерод можно было обнаружить в выделяемом сукцинате, что указывало на карбоксилирование пирувата с образованием дикарбоновых кислот. Такое карбоксилирование получило название реакции Вуда-Веркмана. Эта реакция свойственна не только пропионовокислым бактериям - она широко распространена у животных, растений и различных гетеротрофных микроорганизмов [5].

Существует два способа получения накопительной культуры пропионовокислых бактерий. Первым является традиционный, при котором питательную среду с лактатом и дрожжевым экстрактом инокулируют и инкубируют в анаэробных условиях. Второй - внесение накопительной культуры пропионовокислых бактерий с закваской. Он используется чаще, потому что имеет преимущества, такие как простота внесения и минимальная возможность ошибки.

Различают несколько видов пропионовокислых бактерий, из которых наиболее известны вид *Propionibacterium freudenreichii* и его подвид *shermanii*, а также *P. acidi-propionici*. Эти бактерии, помимо сахаров и молочной кислоты, способны сбразивать пировиноградную кислоту, глицерин и другие вещества. Они разлагают (дезаминируют) аминокислоты, при этом выделяются жирные кислоты.

Пропионовокислые бактерии растут в пределах температур 15–40 °С, хотя есть данные, что рост происходит при более низкой температуре (до минус 10°С). Оптимальная температура развития классических пропионовокислых бактерий составляет 30±1°С. Оптимальная величина рН роста пропионовокислых бактерий 6,5–7,0, максимальная – 8,0, минимальная 4,6. Пропионовокислые бактерии устойчивы к действию желчных кислот и выдерживают низкую (рН 2,0) кислотность желудка. Они ингибируют активность р-глюкуронидазы, азаредуктазы и нитроредуктазы - ферментов, образуемых кишечной микрофлорой и вовлекаемых в образование мутагенов, канцерогенов и промоторов роста

опухолей.

Большинство пропионовокислых бактерий не развиваются при рН среды ниже 5,0–4,5. Они факультативные анаэробы, могут переносить лишь низкое парциальное давление кислорода. Оптимальная температура их развития 30–35 °С, отмирают при температуре 60–70 °С.

Пропионовокислые бактерии на твердых средах при доступе воздуха не растут. Так как они не переносят присутствия атмосферного O₂, способны расти в анаэробных условиях и регенерировать АТФ за счет энергии брожения, их считали организмами, облигатно осуществляющими брожение.

С другой стороны, давно известно, что они обладают гемсодержащими ферментами, такими как цитохромы и каталаза. Действительно, исследованные представители рода *Propionibacterium* оказались способными расти как в анаэробных, так и в аэробных условиях [5]. Поэтому актуально изучение особенностей культивирования штамма *Propionibacterium shermanii*.

Материал и методика. Штамм *Propionibacterium shermanii* был любезно предоставлен ФГУП «Экспериментальная биофабрика Россельхозакадемии», расположенная по адресу: Россия, город Углич, ул. Старостина, 18. Дата изготовления 4.11.2012 года. Срок годности 4 месяца при температуре не выше 6°С и относительной влажности воздуха не выше 85 %. На рисунке 1 представлен образец лиофилизированной культуры *Propionibacterium shermanii*.



Рисунок 1 - Закваска БК–Углич–Про.

Характеристики закваски БК–Углич–Про представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Характеристика лиофилизированной закваски пропионовокислых бактерий БК–Углич–Про

Показатель	Норма
Внешний вид	Однородный порошок
Консистенция	Порошкообразная
Цвет	Молочно-белый, равномерный по всей массе. Допускается кремовый оттенок.
Запах	Специфический для данной закваски, без посторонних запахов
Массовая доля влаги, %	3,2±0,5
Растворимость, мин	1±0,2
Гидрофильность, %	85
Количество клеток пропионовокислых бактерий в 1 см ³ , не менее	8 × 10 ⁹
Клетки на среде Эллингера	Кокковидной и палочковидной формы, собранные в цепочки
на молоке	Кокковидные цепочки и диплококковидные клетки
БГКП (колиформы) в 0,01 см ³	Не допускаются
Патогенные, в т.ч. сальмонеллы в 25 см ³	Не допускаются

Данные, приведенные в таблице 1, показывают, что сухая закваска пропионовокислых бактерий обладает хорошей растворимостью, повышенной гидрофильностью (85 %), что свидетельствует о ее хорошем качестве. Кроме того она характеризуется хорошими органолептическими, физико-химическими и санитарно-гигиеническими показателями. Имеет

приятный специфический запах, свойственный данному продукту. Закваска имеет значительное число жизнеспособных клеток пропионовокислых бактерий 8×10^9 в 0,1 г.

Идентификация культивируемых микроорганизмов проводилась по методу «окраски по Граму» по ГОСТ 18963-73.

Приготовление разведений методом Коха. Численность популяций микробов обычно достаточно велика, поэтому для получения изолированных колоний необходимо приготовить ряд последовательных разведений методом Коха.

Посев микроорганизмов. Нужные разведения вносят в количестве 1 мл в чашку Петри, сверху заливают питательной средой Эллингера (40 °С). Выполняли по 5 повторностей и высчитывали средний результат.

Стерилизация. Проводилась в автоклаве при температуре 94 °С. Время стерилизации 15 минут.

Метод определения общего количества бактерий основан на подсчете колоний микроорганизмов, вырастающих на плотной питательной среде (среде МРС и Мерк) каждый день в течение пяти суток. Учету подлежали чашки с числом колоний 150-300 шт.

Измерение рН. Проводилось на электронном рН метре «Hanna» со съемным электродом для измерения количества свободных ионов водорода в воде и любой другой жидкости. Измерение рН раствора проводилось в сравнении с эталонными буферными растворами.

Определение БГКП, а также плесеней и грибов. Сущность метода заключается в способности бактерий группы кишечной палочки расщеплять глюкозу и лактозу.

Сухая питательная среда Кесслер (ТУ 9291-155-00008064-97). Готовая среда имеет темно-фиолетовую окраску. Кроме того использовали сухую питательную среду Кода (ТУ 9291-091-04610209-2000). Готовая среда должна иметь зеленую окраску.

Для окончательного заключения о присутствии в продукте бактерий группы кишечной палочки проводят высев со среды Кесслер (збродившие пробирки) в чашки Петри со средой Эндо. Чашки Петри помещают в термостат с температурой 37 °С. Через 18-20 ч посеы просматривают. На среде Эндо бактерии группы кишечной палочки образуют темно-красные колонии с металлическим блеском или розово-красные без блеска. Из подозреваемых колоний готовят мазки, которые окрашивают по Граму. Специфическое изменение среды Кода не требует дальнейшего подтверждения.

Общее количество микроорганизмов, которые содержатся в 1 см³ среды, вычисляется по формуле:

$$X = n \times 10^m \quad (1)$$

где n – количество колоний, подсчитанных на чашке Петри

m – число десятикратных разведений

Результаты исследований и их обсуждение. Для нормального роста, размножения и жизнедеятельности микроорганизмов необходимы оптимальные условия окружающей среды. К ним относят: химические факторы - состав и концентрация питательных веществ, присутствие активаторов и ингибиторов; физические факторы - температура, давление, активная кислотность, плотность, консистенция среды, освещение, радиация и другое.

Для приготовления питательных сред в микробиологической промышленности используется сырье минерального, растительного, животного происхождения, а также сырье, синтезируемое химическим путем [1].

В ходе эксперимента были подобраны оптимальные среды для получения маточной культуры изучаемого штамма, путем анализа питательных сред Эллингера, Trypticase Yeast Extract Glucose Medium и ATCC Medium 33 рекомендованных для пропионовокислых бактерий.

Первоначально из имеющейся заквасочной культуры была получена чистая культура, представляющая собой потомство одной клетки.

Для этого были проведены действия в следующем порядке:

1. Культивирование заквасочной культуры на селективной среде (рис.2).



Рисунок 2 - Культура на селективной среде Эллингера.

2. Проверка жизнеспособности полученной культуры на молоке (подтверждение активности штамма - появление сгустка – рис.3).



Рисунок 3 - Молоко с внесенной закваской и образовавшийся сгусток.

3. Приготовление ряда последовательных десятикратных разведений (рис.4).



Рисунок 4 - Ряд разведений методом Коха.

4. Инкубация колонии на диагностической среде – МРС (рис.5).



Рисунок 5 - Вид колонии на диагностической среде МРС на 1 сутки

Как видно из рисунка 5, вначале в местах жизнедеятельности микроорганизмов на среде МРС зеленого цвета появились желтые вкрапления.

Спустя несколько дней выросли колонии микроорганизмов, что иллюстрирует рисунок 6.



Рисунок 6 - Вид колоний на диагностической среде МРС на 5 сутки
Для того, чтобы произвести контроль чистоты культуры, мы пользовались методом окраски по Грамму и микроскопированием. Результаты микроскопирования представлены на рисунке 7.

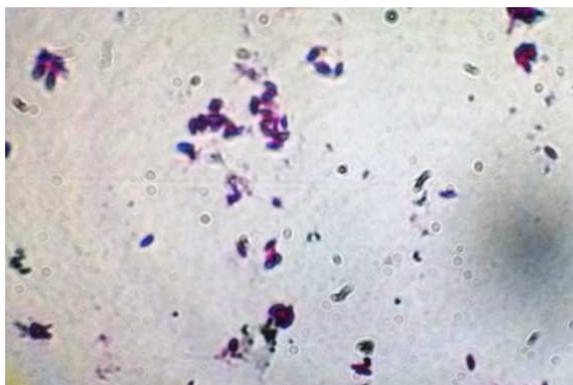


Рисунок 7 - Микроскопическая картина *Propionibacterium sp.*

По результатам микроскопирования можно сделать вывод, что закваска соответствует заявленным характеристикам.

Также в нашей работе мы провели ряд испытаний, направленных на изучение свойств микроорганизмов в различных питательных средах. Изучали поведение микроорганизмов в среде Эллингера, АТСС Medium 33 и в среде Trypticase Yeast Extract Glucose Medium. Выполнялось по 5 повторностей. Вычислены средние результаты.

По результатам данного исследования было выяснено, что в среде

Trypticase Yeast Extract Glucose Medium наблюдается значительное большее количество КОЕ микроорганизмов, чем в среде ATCC Medium 33. В среде Эллингера, ATCC Medium 33 и в среде Trypticase Yeast Extract Glucose Medium.

Для анализа сред использовали метод подсчета колоний микроорганизмов, а также измеряли активную кислотность (pH) во всех средах. Динамику роста пропионовокислых бактерий изучали на жидкой питательной среде Эллингера культивированием с высоким столбиком.

Динамика роста пропионовокислых бактерий в средах Эллингера, ATCC Medium 33 и в среде Trypticase Yeast Extract Glucose Medium в течении 5 суток, а также активная кислотность и количество живых клеток в 1 см³ показаны в таблице 2.

Таблица 2 - Динамика роста пропионовокислых бактерий в средах

Наименование штамма и среды	Продолжительность культивирования, ч	Активная кислотность, pH	Количество живых клеток в 1 см ³
<i>P. shermanii</i> на среде Эллингера	24	5,67	1,0×10 ⁸
	48	5,69	1,4×10 ⁸
	72	5,71	1,6×10 ⁹
	96	5,73	2,1×10 ⁹
	120	5,74	2,2×10 ⁹
<i>P. shermanii</i> на среде ATCC Medium 33	24	5,79	1,3×10 ⁸
	48	5,81	1,5×10 ⁸
	72	5,85	1,9×10 ⁹
	96	5,89	2,5×10 ⁹
	120	5,90	2,6×10 ⁹
<i>P. shermanii</i> на среде Trypticase Yeast Extract Glucose Medium	24	6,01	1,6×10 ⁸
	48	6,04	1,8×10 ⁸
	72	6,09	2,1×10 ⁹
	96	6,11	2,7×10 ⁹
	120	6,12	2,8×10 ⁹

Таким образом, можно сделать вывод, что в среде Trypticase Yeast Extract Glucose Medium накопление биомассы идет интенсивнее. В среде ATCC Medium 33 немного отстает, а в среде Эллингера накопленная

биомасса меньше всего. Помимо этого во всех средах также повышается рН, что положительно влияет на дальнейшее накопление биомассы пропионовокислых микроорганизмов. Это свидетельствует о том, что среда Trypticase Yeast Extract Glucose Medium эффективнее для выращивания пропионовокислых микроорганизмов. Культуру следует выращивать в течении 4-5 суток.

Анализ на БГКП, дрожжевые и плесневые клетки. Приготовление сухой питательной среды Кесслер (ТУ 9291-155-00008064-97), а также сухой питательной среды Кода (ТУ 9291-091-04610209-2000).

При росте бактерий группы кишечной палочки среда КОДА окрашивается в ярко желтый цвет, а на среде Кесслер в поплавке образуется газ. Результаты представлены на рисунке 8.

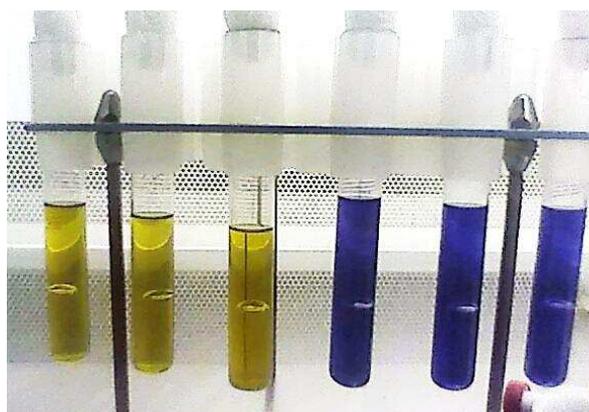


Рисунок 8 - Анализ на БГКП, дрожжевые и плесневые клетки

Как видно из рисунка 8 среда Кода не поменяла окрашивание. В среде Кесслера поплавок остается на дне пробирки, а, значит, газ не выделился. Исходя из этого, можно сказать, что БГКП, дрожжевые и плесневые клетки в готовом препарате отсутствуют.

Выводы. Оптимальной средой для культивирования и промышленного выращивания *Propionibacterium shermanii* является среда Trypticase Yeast Extract Glucose Medium. В средах Эллингера, АТСС Medium 33 и в среде Trypticase Yeast Extract Glucose Medium повышается рН, что положительно влияет на дальнейшее накопление

биомассы пропионовокислых микроорганизмов. Культуру следует выращивать в течении 4-5 суток. Оптимальной средой для подсчета колониеобразующих единиц штамма *Propionibacterium shermanii* является среда МРС.

Литература

1. Беккер М.Е. Введение в биотехнологию / М.: Пищевая промышленность, 1978. – С.75
2. Пропионовокислые бактерии // БСЭ. – 3-е изд. – М. : 1975. – Т. 15. – С. 265-266.
3. Пропионовокислое брожение и бактерии, Биофайл, 2013. Режим доступа: <http://biofile.ru>. [Электронный ресурс]
4. Пат. 2222593, Российская Федерация, МПК7 С 12 N 1/20, 1/14. Способ приготовления питательной среды для культивирования микроорганизмов / А. Г. Коцаев, И. В. Хмара, О. В. Коцаева, А. И. Петенко, Г. А. Плутахин, В. А. Ярошенко. Опубл. 06.05.2002
5. Петенко А. И. Перспективы использования пробиотиков на основе молочнокислых и пропионовокислых микроорганизмов в перепеловодстве / А. И. Петенко, Ю. А. Лысенко, И. А. Петенко // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2013. – №4 (43). – С. 67–71.

References

1. Bekker, M.E. Vvedenie v biotehnologiyu / M.: Pischevaya promishlennost, 1978. – S.75-76
2. Propionovokislye bakterii // BSE. – 3-e izd. – M. : 1975. – T. 15. – S. 265-266.
3. Propionovokisloe brojenie i bakterii, Biofail, 2013. Available: <http://biofile.ru>. [Electronic resource]
4. Pat. 2222593, Rossijskaja Federacija, MPK7 S 12 N 1/20, 1/14. Sposob prigotovlenija pitatel'noj sredy dlja kul'tivirovanija mikroorganizmov / A. G. Koshhaev, I. V. Hmara, O. V. Koshhaeva, A. I. Petenko, G. A. Plutahin, V. A. Jaroshenko. Opubl. 06.05.2002.
5. Petenko A. I. Perspektivy ispol'zovanija probiotikov na osnove molochnokislyh i propionovokislyh mikroorganizmov v perepelovodstve / A. I. Petenko, Ju. A. Lysenko, I. A. Petenko // Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2013. – № 4 (43). – S. 67–71.