

УДК 619:579.86

Борисовец Д.С., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>  
 Журавлева Е.С., кандидат ветеринарных наук<sup>1</sup>  
 Зуйкевич Т.А., кандидат ветеринарных наук<sup>1</sup>  
 Красочко П.А., доктор ветеринарных и биологических наук, профессор<sup>2</sup>  
 Яромчик Я.П., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>2</sup>  
 Морозов А.М., младший научный сотрудник<sup>1</sup>  
 Курбат И.А., младший научный сотрудник<sup>1</sup>

<sup>1</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского», г. Минск

<sup>2</sup>УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

## ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ПРЕСНОВОДНЫХ ВОДОЕМОВ

### Резюме

В статье показано влияние физических (рН, температура, аэрация) и химических (содержание сахаров, источники азотного и фосфорного питания) факторов на показатель роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования.

Определены оптимальные условия: температура роста *Bacillus subtilis* 42 °С, рН 6,7–7,3; *Bacillus licheniformis* – 37 °С, рН 6,8–7,2; *Bacillus megaterium* – 36–39 °С, рН 6,4–6,9; при погруженном культивировании – аэрация с интенсивностью 150 об/мин; концентрация мелассы (для всех исследованных штаммов рода *Bacillus*) – 30 г/л; сульфата аммония – 2,5 г/л; солей  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$  – 30 г/л.

На основании проведенных исследований создана оптимизированная питательная среда, использование которой позволяет увеличить скорость накопления бацилл до 85,7 % в сравнении с исходной средой.

### Summary

The article shows the influence of physical (pH, temperature, aeration) and chemical (sugar content, sources of nitrogen and phosphorus nutrition) factors on the growth rate of strains of the genus *Bacillus* under conditions of solid-phase and submerged cultivation.

The optimal conditions have been determined: temperature of *Bacillus subtilis* growth 42 °C, pH 6,7–7,3; *Bacillus licheniformis* – 37 °C, pH 6,8–7,2; *Bacillus megaterium* 36–39 °C, pH 6,4–6,9; with submerged cultivation – aeration with an intensity of 150 rpm; molasses concentration (for all studied strains of the genus *Bacillus*) 30 g/l; ammonium sulfate – 2,5 g/l; salts  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$  – 30 g/l.

On the basis of the studies carried out, an optimized nutrient medium was created, the use of which makes it possible to increase the accumulation rate of bacilli up to 85,7 % in comparison with the initial medium.

Поступила в редакцию 22.10.2020 г.

### ВВЕДЕНИЕ

Рынок биотехнологий (по наиболее объективному критерию – объему производства биотехнологических товаров) продолжает стремительно расти. Ежегодный рост мирового рынка биотехнологий составляет 7–9 процентов. Предполагается, что к 2025 году этот показатель достигнет уровня в 2 трлн долларов США [7, 8].

Традиционными производителями и потребителями продукции биотехнологии являются преимущественно высокоразвитые страны: США, Канада, Япония и госу-

дарства ЕС. В течение текущего десятилетия масштабные программы развития по всему спектру биотехнологий также стали реализовывать Китай, Индия и Бразилия. Приоритетное развитие получили медицина, сельское хозяйство, пищевая промышленность, химическое производство и другие [1].

Микроорганизмы – бактерии, дрожжи и микроскопические мицелиальные грибы – основные промышленные объекты биотехнологии. Они имеют высокую скорость роста, способны расти на дешевых

питательных средах и обладают пластичным метаболизмом, протекающим с высокой скоростью и эффективностью [2, 3, 6].

В настоящее время в развитых странах разработана и широко используется стратегия селекционной работы с микроорганизмами, которая заключается в поиске природных форм, обладающих какими-либо полезными для человека свойствами (синтез ценных соединений, высокая скорость роста, способность к усвоению дешевых и доступных субстратов и т. д.), а также дальнейшем их улучшении [7].

Современные тенденции развития селекции продуцентов – конструирование промышленных штаммов с полезными заданными свойствами при использовании новейших достижений фундаментальных отраслей биологии в сочетании с приемами классической селекции.

Кроме производства биологически активных веществ, клетки микроорганизмов также используются и для изготовления пробиотических препаратов.

В мире производится более 90 живых пробиотических продуктов коммерческого назначения, в том числе свыше 53 в Японии и более 45 в Европе. В последние годы произошел поворот от использования пробиотиков преимущественно с профилактической целью к активному их использованию в лечении инфекций желудочно-кишечного тракта, аллергических заболеваний, бактериальных и вирусных инфекций (Лахтин В.М. с соавт., 2008) [4, 7].

Способность спорообразующих бактерий оказывать пробиотическое действие привела к разработкам на их основе препаратов, отнесенных к поколению так называемых самоэлиминирующихся антагонистов. В итоге на сегодняшний день в мире создано более полусотни таких препаратов, которые полностью или частично составлены на основе спороформирующих бактерий. Штаммы бацилл для лечебного питания животных включают *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. polyfermentans* и *B. cereus* и др. (N.T. Hoa et al., 2000; K.H. Lee et al., 2001) [1, 4, 7].

В целом по уровню биотехнологиче-

ских исследований и разработок, их внедрения в промышленное производство Республика Беларусь отстает от развитых зарубежных стран. Недостаточны объемы производства биотехнологической продукции, которая закупается за рубежом. Отечественные биопрепараты значительно дешевле иностранных, однако более 70 процентов потребностей республики в них удовлетворяются за счет дорогостоящего импорта. Рынок биотехнологической продукции Республики Беларусь составляет около 400 млн долларов США, из них продукция отечественного производства составляет менее 20 процентов. Ежегодно закупается за рубежом более 200 наименований средств защиты растений, пробиотиков, премиксов, кормовых аминокислот, консервантов кормов, ветеринарных вакцин на общую сумму около 300 млн долларов США. Неблагоприятная ситуация сложилась и в области микробиологической промышленности ввиду того, что выпускаемая продукция в ряде случаев малорентабельна из-за низкой активности исходных микробиологических штаммов [2, 5].

Сложившаяся ситуация создает предпосылки для выделения природных форм микроорганизмов рода *Bacillus*, обладающих полезными свойствами (синтез ценных биологически активных соединений, высокая скорость роста), их селекции и дальнейшего улучшения, а также конструирования на их основе промышленных штаммов с заданными свойствами.

**Цель работы** – оптимизировать состав среды культивирования для получения максимального выхода биомассы штаммов рода *Bacillus* и биологически активных соединений.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа проводилась в отделе вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», виварии института.

С целью изучения влияния физических факторов на показатель роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования была ис-

следована зависимость роста от следующих показателей: pH, температура, аэрация.

Исследования погруженного культивирования проводились на ферментере РФ-2.10 объемом 10 л. Культивирование проходило в объеме 4 л.

**Твердофазное культивирование.**

Для засева готовили микробную культуру следующим образом: смыв суточной агаровой культуры довели до 1 млрд микробных тел в 1 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора. Затем десятичными разведениями довели концентрацию до 10<sup>3</sup> и 0,1 см<sup>3</sup> микробной взвеси внесли на поверхность чашки Петри со средой SMS (минимальной солевой средой), распределяли шпателем по поверхности чашки и ставили в термостат при исследуемых температурах на 24 ч.

**Погруженное культивирование.**

Для засева готовили микробную культуру с концентрацией 1 млрд микробных тел в 1 см<sup>3</sup> объемом 400 мл. Далее микробную культуру вносили в ферментер с исследуемыми показателями pH, температурой и аэрацией. Культивирование проводили, пока исследуемая культура не войдет в стадию раннего стационара, контролируя температуру, pH и аэрацию.

На первом этапе исследований для культивирования бацилл использовали три варианта среды: бульон Хоттингера, пептонную среду и солевую среду SMS. Культивирование бактерий проводили во флаконах объемом 500 мл на круговых качалках с частотой оборотов 220–240 об/мин при температуре 37 °С. Рабочий объем питательной среды во флаконе составлял 50 мл. Посевной материал вносили из расчета созда-

ния начальной численности бактерий в среде 1,0×10<sup>6</sup>–1,5×10<sup>6</sup> м.т./мл. Продолжительность культивирования составляла 24 ч.

На втором этапе с целью оптимизации состава среды культивирования для получения максимального выхода биомассы штаммов рода *Bacillus* и биологически активных веществ была исследована зависимость роста от следующих показателей: содержание сахаров, источники азотного и фосфорного питания.

Исследования погруженного культивирования консорциума трех штаммов бактерий проводилось на ферментере РФ-2.10 объемом 10 л. Культивирование проходило в объеме 4 л.

В качестве источника углеводов использовалась меласса, источников азотного питания – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, фосфорного питания – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

При исследовании переменных факторов исследовали мелассу в концентрациях 20 и 30 г/л; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – 1–7,5 г/л; смесь фосфатов в равных долях K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O+KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 5–45 г/л.

Критерием оптимизации служила численность жизнеспособных бактерий в культуральной жидкости (м.т./мл), количество которых определяли методом серийных разведений с последующим высевом на агаризированую питательную среду.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Результаты исследований по изучению влияния физических факторов на показатель роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования представлены в таблицах 1–6.

Таблица 1. – Погруженное культивирование *Bacillus subtilis* на среде SMS

Аэрация, об/мин		Температура, °С							
		28		37		42		45	
		0	150	0	150	0	150	0	150
pH	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	био пленка	+/-	био пленка	+/-	био пленка	+/-	-	-
	6		+		+		+	-	-
	7		+		+		+	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста; «+» – наличие роста; «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 2. – Погруженное культивирование *Bacillus licheniformis* на среде SMS

Аэрация, об/мин		Температура, °С							
		28		37		42		45	
		0	150	0	150	0	150	0	150
рН	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+/-	+/-	+	+/-	-	-	-	-
	6	+	+	+	+	-	-	-	-
	7	+	+	+	+	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 3. – Погруженное культивирование *Bacillus megaterium* на среде SMS

Аэрация, об/мин		Температура, °С							
		28		37		42		45	
		0	150	0	150	0	150	0	150
рН	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	+/-	+/-	+	+	+	+	-	-
	6	+	+	+	+	+	+	-	-
	7	+	+	+	+	+	+	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Для более точного изучения влияния значения рН на рост штаммов бактерий *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* были проведены дополнительные исследования с более точным значением рН, значения были взяты от 6,0 до 8,0.

Оптимальный рост для *Bacillus subtilis* наблюдался при значениях рН 6,7–7,3 при аэрации 150 об/мин. При значениях рН выше 7,3 наблюдалось хлопьеобразование, при значении рН 7,8–8,0 рост прекращался или полностью отсутствовал. Оптимальной температурой роста бактерий является значение 42 °С.

Оптимальный рост для *Bacillus li-*

*cheniformis* наблюдался при значениях рН 6,8–7,2 при аэрации и ее отсутствии. При значениях рН выше 7,2 наблюдалось хлопьеобразование, при значении рН 7,8–8,0 рост прекращался или полностью отсутствовал. Оптимальной температурой роста бактерий является значение 37 °С.

Оптимальный рост для *Bacillus megaterium* наблюдался при значениях рН 6,4–6,9 при аэрации и ее отсутствии. При значениях рН выше 7,5 наблюдалось хлопьеобразование, при значении рН 8,0 и выше рост прекращался или полностью отсутствовал. Оптимальной температурой роста бактерий является диапазон от 36 °С до 39 °С.

Таблица 4. – Твердофазное культивирование *Bacillus subtilis* на среде SMS

рН	Температура, °С			
	28	37	42	45
4	-	-	-	-
5	+/-	+/-	+/-	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-
8	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 5. – Твердофазное культивирование *Bacillus licheniformis* на среде SMS

рН	Температура, °С			
	28	37	42	45
4	-	-	-	-
5	+/-	+/-	-	-
6	+	+	-	-
7	+	+	-	-
8	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

Таблица 6. – Твердофазное культивирование *Bacillus megaterium* на среде SMS

рН	Температура, °С			
	28	37	42	45
4	-	-	-	-
5	+/-	+	+	-
6	+	+	+	-
7	+	+	+	-
8	-	-	-	-

Примечание: «-» – отсутствие роста, «+» – наличие роста, «+/-» – слабое проявление роста

При твердофазном культивировании оценка роста происходила визуально по внешнему виду колоний, при этом оптимальные параметры роста штаммов соответствовали показателям, полученным в

процессе погруженного культивирования.

Результаты исследований по изучению оптимальной питательной среды для глубинного культивирования бацилл представлены на рисунках 1–3.

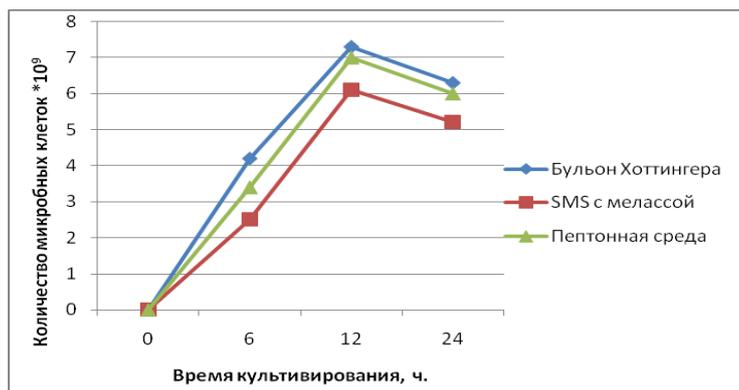


Рисунок 1. – Рост *Bacillus subtilis* на различных типах питательных сред

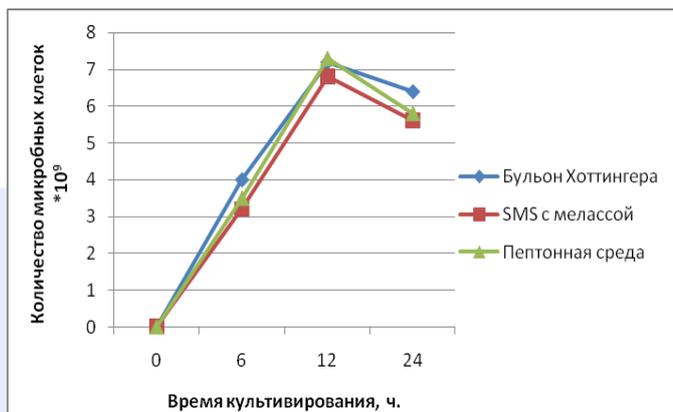
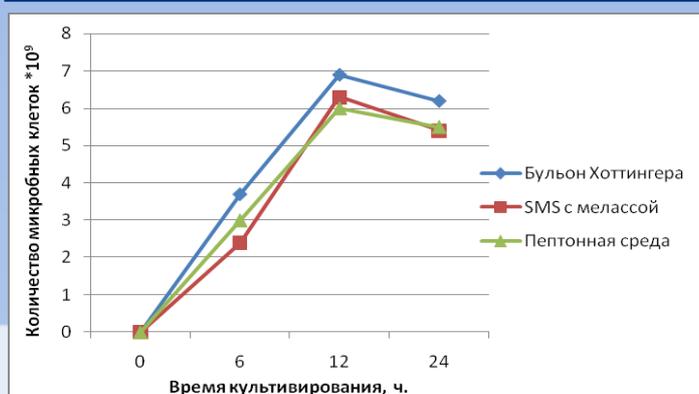


Рисунок 2. – Рост *Bacillus licheniformis* на различных типах питательных сред



**Рисунок 3. – Рост *Bacillus megaterium* на различных типах питательных сред**

При культивировании штаммов бацилл на изучаемых средах различного состава (рисунки 1–3) бактерии проявили неодинаковую ростовую активность. На бульоне Хоттингера и пептонной среде, богатых по содержанию органических соединений, наблюдали наиболее интенсивный рост бацилл. Максимальное содержание клеток в среде через 12 ч культивирования для всех штаммов составляло  $6,0 \times 10^9$ – $7,3 \times 10^9$  м.т./мл. Однако компоненты данных сред являются дорогостоящими для наработки биомассы клеток в производственных условиях. Более дешевой для применения в производстве является

среда SMS с мелассой, которую бактерии могут использовать в качестве основного источника углерода и энергии. При росте на этой среде в течение 12 ч численность жизнеспособных бацилл составляла  $6,1 \times 10^9$ – $6,8 \times 10^9$  м.т./мл.

Таким образом, показано, что среда SMS с мелассой (как более дешевая) является приемлемой для дальнейшей оптимизации и использования в производственных условиях.

Результаты исследований по оптимизации состава среды культивирования по содержанию сахаров представлены в таблицах 7–12.

Таблица 7. – Скорость роста *Bacillus megaterium* при концентрации мелассы 20 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,412	-
1	0,498	-
2	0,621	$1,7 \times 10^9$
3	0,732	$1,9 \times 10^9$
4	0,912	$2,3 \times 10^9$
5	1,130	$2,9 \times 10^9$
6	1,237	$3,1 \times 10^9$
7	1,231	$3,1 \times 10^9$

Таблица 8. – Скорость роста *Bacillus megaterium* при концентрации мелассы 30 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,401	-
1	0,485	-
2	0,701	$1,9 \times 10^9$
3	0,923	$2,4 \times 10^9$
4	1,132	$2,8 \times 10^9$
5	1,328	$3,3 \times 10^9$
6	1,489	$3,7 \times 10^9$
7	1,604	$4,1 \times 10^9$
8	1,599	$4,0 \times 10^9$

Культивирование штамма *Bacillus megaterium* происходило при оптимальных условиях: температура 38 °С, рН 6,6, аэрация 150 об/мин.

Таблица 9. – Скорость роста *Bacillus licheniformis* при концентрации мелассы 20 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,220	-
1	0,521	-
2	0,728	$1,9 \times 10^9$
3	1,068	$2,5 \times 10^9$
4	1,435	$3,7 \times 10^9$
5	1,804	$4,5 \times 10^9$
6	1,798	$4,2 \times 10^9$

Таблица 10. – Скорость роста *Bacillus licheniformis* при концентрации мелассы 30 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,371	-
1	0,670	-
2	0,826	$2,0 \times 10^9$
3	1,182	$2,6 \times 10^9$
4	1,454	$3,7 \times 10^9$
5	1,978	$4,9 \times 10^9$
6	1,990	$4,9 \times 10^9$
7	2,024	$5,0 \times 10^9$

Культивирование штамма *Bacillus licheniformis* происходило при оптимальных условиях: температура 37 °С, рН 7,0, аэрация 150 об/мин.

Таблица 11. – Скорость роста *Bacillus subtilis* при концентрации мелассы 20 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,371	-
1	0,402	-
2	0,826	$2,1 \times 10^9$
3	1,254	$3,0 \times 10^9$
4	1,476	$3,7 \times 10^9$
5	1,698	$4,1 \times 10^9$
6	1,862	$4,5 \times 10^9$
7	1,924	$4,9 \times 10^9$

Таблица 12. – Скорость роста *Bacillus subtilis* при концентрации мелассы 30 г/л

Время культивирования, ч	Оптическая плотность	Титр, м.т./мл
0	0,229	-
1	0,282	-
2	0,710	$1,8 \times 10^9$
3	1,152	$3,9 \times 10^9$
4	1,510	$4,1 \times 10^9$
5	1,935	$4,9 \times 10^9$
6	2,195	$5,3 \times 10^9$
7	2,235	$5,6 \times 10^9$

Культивирование штамма *Bacillus subtilis* происходило при оптимальных условиях: температура 42 °С, рН 6,8, аэрация 150 об/мин.

Для всех штаммов оптимальной концентрацией мелассы является 30 г/л, при использовании которой выход бакте-

риальной массы бацилл был на  $0,7 \times 10^9$ – $0,9 \times 10^9$  м.т./мл выше в сравнении с концентрацией 20 г/л.

Результаты исследований по оптимизации состава среды культивирования по содержанию источников азотного питания представлены в таблице 13.

Таблица 13. – Влияние различных концентраций сульфата аммония на рост штаммов бацилл

Время культивирования, ч	Концентрация бактериальных клеток, м.т./мл		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
без добавления сульфата аммония			
6	$2,7 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$
12	$3,5 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
1 г/л сульфата аммония			
6	$3,5 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$
12	$4,8 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$	$3,8 \times 10^9$
2,5 г/л сульфата аммония			
6	$4,7 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$
12	$6,8 \times 10^9$	$6,8 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$
5 г/л сульфата аммония			
6	$4,8 \times 10^9$	$4,4 \times 10^9$	$4,3 \times 10^9$
12	$6,8 \times 10^9$	$7,0 \times 10^9$	$6,6 \times 10^9$
7,5 г/л сульфата аммония			
6	$4,2 \times 10^9$	$4,5 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$
12	$6,8 \times 10^9$	$6,8 \times 10^9$	$6,4 \times 10^9$

По данным таблицы 13 установлено, что оптимальной концентрацией сульфата аммония в качестве источника азота для культивирования штаммов бацилл является 2,5 г/л, т.к. ее увеличение до 5,0–7,5 г/л не приводило к существенному росту интенсивности накопления биомассы бацилл.

Результаты исследований по оптимизации состава среды культивирования по содержанию источников фосфорного питания представлены в таблице 14.

По данным таблицы 14 установлено, что оптимальной концентрацией солей  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$  в качестве источника фосфора для культивирования штаммов

бацилл является 30 г/л. Дальнейшее ее увеличение до уровня 45 г/л не привело к существенному росту интенсивности накопления биомассы бацилл.

По результатам проведенных исследований изготовлена оптимизированная питательная среда для накопления штаммов бацилл на основе солевого концентрата SMS (минимальной солевой среды) с добавлением мелассы свекловичной в концентрации 30 г/л,  $(NH_4)_2SO_4$  – в концентрации 2,5 г/л и  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$  – в концентрации 30 г/л. Ростовые свойства изготовленной среды сравнивали со свойствами исходной (таблица 15).

Таблица 14. – Влияние различных концентраций  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$  на рост штаммов бацилл

Время культивирования, ч	Концентрация бактериальных клеток, м.т./мл		
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
без добавления $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$2,2 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$
12	$3,4 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
5 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$2,7 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$
12	$5,5 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$	$4,8 \times 10^9$
15 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$2,7 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$3,4 \times 10^9$
12	$5,8 \times 10^9$	$5,8 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$
30 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$3,0 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$4,2 \times 10^9$
12	$6,2 \times 10^9$	$6,7 \times 10^9$	$6,3 \times 10^9$
45 г/л $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$			
6	$3,2 \times 10^9$	$3,5 \times 10^9$	$4,0 \times 10^9$
12	$6,0 \times 10^9$	$6,5 \times 10^9$	$5,9 \times 10^9$

Таблица 15. – Рост штаммов бацилл на питательных средах после оптимизации

Варианты питательной среды	Количество клеток <i>Bacillus subtilis</i> , % после выращивания в течение, ч		Количество клеток <i>Bacillus licheniformis</i> , % после выращивания в течение, ч		Количество клеток <i>Bacillus megaterium</i> , % после выращивания в течение, ч	
	6	12	6	12	6	12
Исходная среда	$3,4 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$	$3,2 \times 10^9$	$5,3 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$
Оптимизированная среда	$5,6 \times 10^9$	$7,5 \times 10^9$	$5,5 \times 10^9$	$7,4 \times 10^9$	$5,2 \times 10^9$	$7,4 \times 10^9$

По данным таблицы 15 установлено, что в результате оптимизации состава среды по содержанию сахаров, источников азотного и фосфорного питания уровень накопления штаммов бацилл через 6 часов увеличивался на 64,7–85,7 % и на 36,4–48 % – через 12 часов культивирования в сравнении с исходной питательной средой.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучение показателей роста штаммов рода *Bacillus* в условиях твердофазного и погруженного культивирования показало, что оптимальной температурой роста *Bacillus subtilis* является значение 42 °С, pH 6,7–7,3, *Bacillus licheniformis* – 37 °С, pH 6,8–7,2, *Bacillus megaterium* – от

36 до 39 °С, pH 6,4–6,9. Также необходима аэрация в условиях погруженного культивирования с интенсивностью 150 об/мин, особенно для штамма *Bacillus subtilis*, т.к. без аэрации данная культура образовывала плохо разбивающуюся биопленку.

2. Среда SMS с мелассой (как более дешевая) является приемлемой для оптимизации и использования в производственных условиях.

3. Для всех штаммов оптимальной концентрацией мелассы является 30 г/л, сульфата аммония в качестве источника

азота для культивирования штаммов бацилл – 2,5 г/л, солей  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O + KH_2PO_4$  – 30 г/л приводило к существенному увеличению интенсивности накопления биомассы бацилл.

4. Оптимизация состава питательной среды по содержанию сахаров, источникам азотного и фосфорного питания приводит к увеличению накопления штаммов бацилл через 6 часов на 64,7–85,7 % и на 36,4–48 % – через 12 часов культивирования в сравнении с исходной питательной средой.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Беденко, А. Пробиотики в рационе молодняка крупного рогатого скота: опыты на телятах молочного периода в ФРГ / А. Беденко // Молоко & Корма. Менеджмент. – 2007. – № 4. – С. 32–34.

2. Влияние препарата на основе фитолектинов и пробиотиков «Метафитохит» на обменные процессы телят при энтеритах / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы и инновации в современной ветеринарной фармакологии и токсикологии : материалы V Междунар. съезда ветеринарных фармакологов и токсикологов, Витебск, 26–30 мая 2015 г. / УО ВГАВМ ; редкол. : А. И. Ятусевич (гл. ред.) [и др.]. – Витебск, 2015. – С. 105–109.

3. Идентификация и изучение свойств природных микроорганизмов, выделенных из донных отложений пресноводных водоемов / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; редкол. : П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2015. – С. 97–100.

4. Каврус, М. А. Гигиенические аспекты использования пробиотических препаратов в животноводстве / М. А. Каврус, В. В. Малашко // Ветеринарная наука – производству. – 2005. – № 38. – С. 242–246.

5. Лечебная и профилактическая эффективность про- и пребиотических препаратов при инфекционных энтеритах телят / П. А. Красочко [и др.] // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 26–27 ноября 2015 г. / РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; редкол. : П. А. Красочко (гл. ред.) [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2015. – С. 114–117.

6. Лысак, В. В. Микробиология: методические рекомендации к лабораторным занятиям, контроль самостоятельной работы студентов / В. В. Лысак, Р. А. Желдакова, – Минск : БГУ, 2002. – 97 с.

7. Олива, Т. В. Производство экологически безопасной продукции животноводства путем направленного формирования бактериоциноза кишечника молодняка животных / Т. В. Олива // Мировой опыт и перспективы развития сельского хозяйства : материалы Междунар. конф., посвящ. 95-летию Воронеж. гос. аграр. ун-ту, Воронеж, 23–24 окт. 2007 г. / Воронеж. гос. аграр. ун-т. – Воронеж, 2008. – С. 115–117.

8. Пестис, В. К. Пробиотики в животноводстве и ветеринарии / В. К. Пестис, М. А. Каврус, А. Н. Михалюк. – Гродно : Гродн. гос. аграр. ун-т, 2006. – 94 с.