

УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильєва, Н.В. Коротаєва, М.М. Панченко, В.О. Іваниця

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова.
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65082, Україна, тел. +38(0482)63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

МАТЕМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТА ОПТИМІЗАЦІЯ СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ШТАМУ *LACTOBACILLUS PLANTARUM* ONU87

Мета. Оптимізація складу поживного середовища для культивування молочнокислих бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 з одночасним вивченням впливу компонентів різних поживних середовищ на ростові характеристики і антагоністичну активність цих бактерій. **Методи.** Антагоністичну активність штаму *L. plantarum* ONU87 по відношенню до *Rhizobium radiobacter* C58 *in vitro* визначали методом подвійних агарових шарів. Титр агробактерій визначали методом серійних розведень з наступним висівом на щільне середовище MRS. Оцінку впливу кожного чинника поживного середовища на показники, що перевіряли, здійснювали за допомогою неповної регресійної моделі. Оптимізація середовища базувалася на плануванні з використанням центрального композиційного ортогонального експерименту. Параметром оптимізації слугував показник концентрації бактерій. **Результати.** У результаті проведених досліджень встановлено, що на накопичення бактерій та їх антагоністичну активність впливають склад компонентів поживних середовищ та їх співвідношення, що було показано у одержаних математичних моделях. Кінцевим результатом проведених досліджень є поживне середовище OLB (глюкоза – 22,5 г/л, пептон – 8,5 г/л, дріжджовий екстракт – 4,5 г/л, K_2HPO_4 – 6,0 г/л, Na цитрат – 2,0 г/л, $CH_3COONa \times 3H_2O$ – 25,0 г/л, $MgSO_4$ – 0,2 г/л, $MnSO_4$ – 0,2 г/л та $Fe SO_4$ – 0,05 г/л), за росту на якому концентрація лактобактерій у стаціонарній фазі росту зростає до $3,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$ кл/мл. **Висновки.** Математичне планування експерименту дозволило при незначній зміні кількісного складу поживного середовища значно збільшити накопичення біомаси.

Ключові слова: *Lactobacillus plantarum*, антагоністична активність до *Rhizobium radiobacter*, оптимізація поживного середовища, математична модель, коефіцієнт регресії, центральний композиційний ортогональний експеримент.

У попередніх дослідженнях було встановлено антагоністичні властивості бактерій *Lactobacillus plantarum*, які є нормальними мешканцями філосфери та ризосфери рослин, до фітопатогенних бактерій [8].

© Н.Ю. Васильєва, Н.В. Коротаєва, М.М. Панченко, В.О. Іваниця, 2013



Антагоністична активність лактобактерій зумовлена дією неспецифічних (органічні кислоти, низький окисно-відновний потенціал, конкурентність за поживні речовини) та специфічних (антибіотики та бактеріоцини) факторів [12]. На сьогодні, саме використання пробіотичних бактерій є альтернативою хімічним методам боротьби з фітопатогенами [11].

Для розробки пробіотичних препаратів постає задача оптимізації складу поживного середовища, оскільки, кожен штам бактерій має свої особливості росту та харчові потреби. Традиційно склад поживного середовища визначається методом тривалого емпіричного підбору, в ході якого визначається якісний і кількісний склад компонентів середовища. На сьогодні для полегшення цієї задачі все частіше застосовують математичний апарат [5, 7, 10]. Використання математичних методів планування і обробки результатів експериментів значно скорочує трудомісткість і тривалість виконання цієї задачі. Планування експерименту дозволяє варіювати одночасно важливі фактори і отримувати кількісні оцінки як самих факторів, так і ефектів взаємодії між ними [7]. Молочнокислі бактерії потребують складний набір мінеральних і органічних компонентів середовища, що вимагає уважного та цілеспрямованого підходу до їх вибору та збалансування [1, 13].

Метою роботи були математичний аналіз на підставі неповної лінійної регресії впливу компонентів поживних середовищ, їх сумісної дії на показники росту та антагоністичну активність штаму *L. plantarum* ONU87 та оптимізація складу поживного середовища з застосуванням методу математичного планування експерименту на підставі центрального композиційного ортогонального плану.

Матеріали і методи

В роботі використовували штам молочнокислих бактерій *Lactobacillus plantarum* ONU87 [8] та патогенний штам *Rhizobium radiobacter* C58, що викликає бактеріальний рак винограду, люб'язно наданий Ф.І. Товкачем з Інституту мікробіології і вірусології імені Д.К. Заболотного НАНУ.

Для культивування молочнокислих бактерій використовували різні поживні середовища, які відрізняються якісним і кількісним складом інгредієнтів (табл. 1). Поживні середовища були виготовлені на основі рецептур фірми HiMedia Laboratories Pvt. Limited (<http://www.himedialabs.ru/>).

Лактобактерії культивували у колбах об'ємом 250 мл у 50 мл середовища за температури 37 °С впродовж 60 год. Середовища засівали посівним матеріалом, який вирощували на середовищі MRS протягом 24 год.

Титр лактобактерій визначали методом серійних розведень з наступним висівом на щільне середовище MRS [4, 6]. Для розрахунку питомої швидкості росту бактерій (μ) і часу подвоєння (T) використовували стандартні методики [4, 6].



Таблиця 1

Склад застосованих поживних середовищ(г/л)

Table 1

Composition of culture media used in the experiment (g/l)

Компоненти середовища	MRS	LP 048	LP641	LP 927	LP407	LP1180	LP2	LP4	LP5	LP 7
Казеїн			10,0	10,0						
Пептон	10,0	15,0			10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Дріжджовий екстракт	5,0	5,0	5,0	10,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Глюкоза	20,0	10,0	20,0	20,0	10,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Сахароза					5,0					
Арабіноза					5,0					
МПБ	10,0		10,0	10,0			5,0	5,0		5,0
Томатний сік				20,0					20,0	20,0
KCl				2,0						
Натрій оцтовокислий	5,0		5,0		15,0	25,0	5,0			
Амоній лимоннокислий			2,0		2,0	2,0				2,0
Na ₂ HPO ₄			2,0				6,0			
K ₂ HPO ₄	2,0	2,0			6,0	6,0		6,0		
MgSO ₄	0,6		0,1		0,6	0,6	0,5	0,1		
MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,2								
MnSO ₄ ·5H ₂ O	0,2	0,05	0,05		0,2	0,2	0,1	0,05		



Антагоністичну активність досліджуваного штаму лактобацил по відношенню до *Rhizobium radiobacter* C58 *in vitro* визначали методом подвійних агарових шарів на середовищі LB при 28 °C [3, 12]. Ступінь антагоністичної активності оцінювали за шкалою: «» — відсутність антагоністичної активності (зони інгібування росту *Rhizobium radiobacter* C58 відсутні); «+» — низька антагоністична активність (діаметр зони інгібування росту — до 0,3 см), «++» — середня антагоністична активність (діаметр зони інгібування росту — 0,3–0,5 см); «+++» — висока антагоністична активність (діаметр зони інгібування росту більше 0,5 см).

Для розрахунку лінійної регресійної моделі використовували метод найменших квадратів [2, 10]. Склад середовища оптимізували за допомогою центрального композиційного ортогонального експерименту [7]. Критерієм оптимізації слугувала концентрація життєздатних бактерій.

Математичну обробку результатів досліджень здійснювали за допомогою програм Microsoft Excel 2007 і MatLab R2009a.

Результати та їх обговорення

За росту на середовищах різного складу було визначено концентрацію бактерій *L. plantarum* ONU87 на момент виходу культури в фазу стаціонарного росту, обчислено питому швидкість росту та період подвоєння бактерій (табл. 2).

Таблиця 2

Показники характеристик росту штаму *L. plantarum* ONU87
на середовищах різного складу

Table 2

Indicators of strain *L. plantarum* ONU87 growth characteristics
on different media

Середовище	Питома швидкість росту, год ⁻¹	Період подвоєння, год	Концентрація бактерій у фазі стаціонарного росту, КУО/мл
MRS	0,27	2,56	3,9±0,3×10 ⁷
LP 048	0,21	3,30	9,1±0,1×10 ⁸
LP 641	0,16	4,33	8,0±0,6×10 ⁸
LP 927	0,16	4,33	4,4±0,1×10 ⁶
LP 407	0,25	2,77	1,2±0,1×10 ⁶
LP 1180	0,36	1,92	5,7±0,4×10 ⁹
LP 2	0,12	5,77	4,1±0,1×10 ⁸
LP 4	0,34	1,87	8,0±2,9×10 ⁶
LP 7	0,12	5,57	4,1±0,1×10 ⁸



Як видно з наведених даних, ріст молочнокислих бактерій *L. plantarum* ONU87 закономірно залежить від складу поживних середовищ, що відображається в відмінностях між ростовими характеристиками. Так, наприклад, максимальний показник концентрації клітин у фазі стаціонарного росту – $5,7 \pm 0,4 \times 10^9$ КУО/мл реєстрували за культивування штаму на середовищі LP 1180, а мінімальне значення цього показника ($1,2 \pm 0,1 \times 10^6$ КУО/мл) – на середовищі LP 407 (табл. 2, рис. 1).

Саме на середовищі LP 1180 реєстрували найбільші значення питомої швидкості росту ($0,36 \text{ год}^{-1}$) та короткий час подвоєння кількості клітин – 1,92 години (табл. 2).

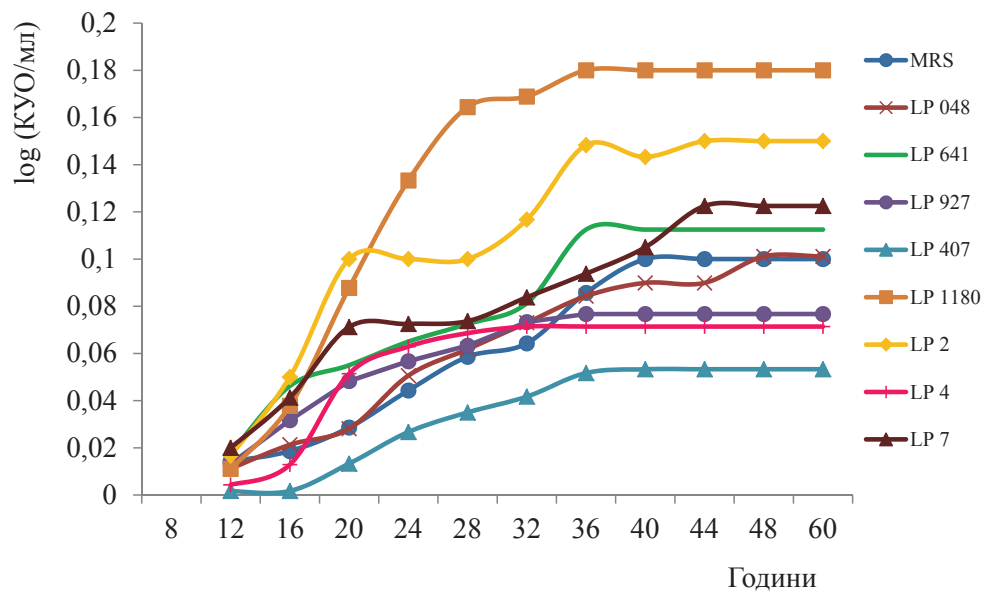


Рис. 1. Криві росту штаму *L. plantarum* ONU87 на середовищах різного складу

Fig. 1. The growth curves of strain *L. plantarum* ONU87 on different media

Аналіз динаміки кислотності середовища показав, що на відміну від стрімкого зниження рН на середовищі MRS (до рН 3,0), при використанні середовищ LP 1180, LP 407, LP 641 та LP 4 мало місце більш повільне зниження рН. У цих варіантах досліду після 36 години культивування показники кислотності середовища стабілізувалися на рівні рН 4,0 і до моменту закінчення культивування (60 год) не змінювалися.

Антагоністичну активність *L. plantarum* ONU87 по відношенню до збудника бактеріального раку винограду *R. radiobacter* C58 визначали через 12, 20, 24, 36, 48, 60 годин культивування бактерій. Показано, що найвищу антагоністичну активність *L. plantarum* ONU87 продемонстрував на середовищах LP 1180, LP 641, LP 2, LP 407 та LP 4 (табл. 3).



Таблиця 3

Антагоністична активність *L. plantarum* ONU87 до *R. radiobacter* C58
на середовищах різного складу

Table 3

Antagonistic activity of *L. plantarum* ONU87 growing on different culture
media compared with *R. radiobacter* C58

Середовище	Час					
	12 год	20 год	24 год	36 год	48 год	60 год
MRS	+	+	—	—	—	—
LP 048	++	+++	++	+	—	—
LP 641	++	+++	+++	+++	+++	++
LP 927	++	+++	+++	++	+	—
LP 407	++	+++	+++	+++	++	++
LP 1180	++	+++	+++	+++	+++	+++
LP 2	++	+++	+++	+++	++	—
LP 4	++	+++	+++	++	++	—
LP 7	++	++	+	+	—	—

Проведений однофакторний дисперсійний аналіз (рис. 2) статистично підтвердив існування достовірного розходження між показниками, що контролювали (табл. 2 і 3). Достовірність підтверджена за допомогою порівняння табличного і розрахованих значень критерію Фішера ($F_{\text{табл}} < F_{\text{факт}}$) і визначення статистичної значимості різниці між середніми значеннями.

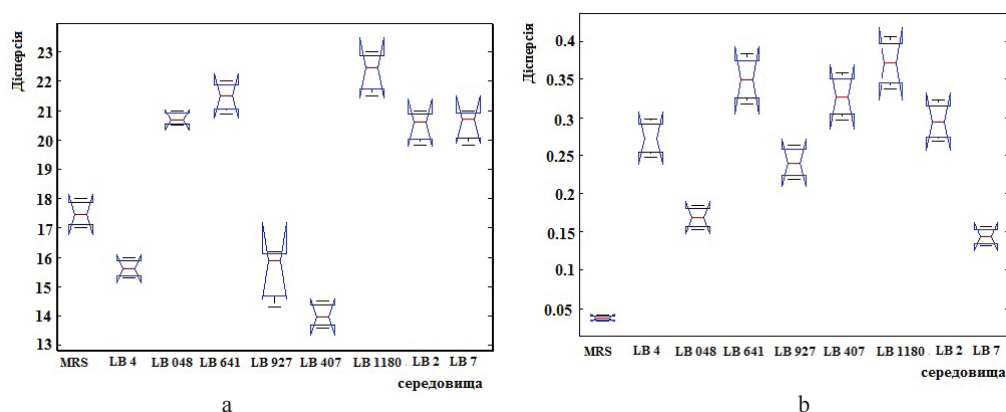


Рис. 2. Результати однофакторного дисперсійного аналізу

a — концентрація бактерій, КУО/мл, b — рівень антагоністичної активності

Fig. 2. The results of single-factor dispersion analysis

a — the concentration of bacteria, CFU/ml, b — the level of antagonistic activity



При перевірці різниці між показниками концентрації молочнокислих бактерій та рівнями антагоністичної активності підтверджено, що нерівність існує: $F_{\text{tab}}(19,16) < F_{\text{факт}}(76,52)$ для показника КУО/мл та $F_{\text{tab}}(19,16) < F_{\text{факт}}(58,52)$ для рівня антагоністичної активності.

За оцінювання ступеня впливу кожного з компонентів поживних середовищ на досліджувані показники за допомогою неповної регресійної моделі, особливу увагу звертали на показники математичного очікування, значення якого, відповідно до закону нормального розподілу, повинно бути мінімальним (у найкращому випадку $M(\hat{u}) \approx 0$), на показники дисперсії (σ) і значення квадрата помилки моделі (MSE), значення яких так само має бути мінімальним.

Вибір найбільш адекватної моделі серед усіх прорахованих, проводили на підставі отриманих статистичних оцінок. Це допомогло визначити вплив кожного компонента поживних середовищ, використаних у експерименті на показник, що перевірявся.

Незалежними змінними для побудови моделі вибрали: x_1 -пептон, x_2 – дріжджовий екстракт, x_3 – глюкоза, x_4 – м'ясо-пептонний бульйон, x_5 – натрій оцтовокислий ($\text{CH}_3\text{COONa} \times 3\text{H}_2\text{O}$), x_6 – цитрат амонію ($\text{C}_6\text{H}_{17}\text{O}_7\text{N}_3$), x_7 – гідроортофосфат натрію (Na_2HPO_4), x_8 – гідроортофосфат калію (K_2HPO_4).

Значення коефіцієнта регресії характеризує ступінь впливу відповідного фактора на ріст і активність культури бактерії. Найбільш значущі розраховані моделі наведені у таблиці 4.

Таблиця 4

Математичні моделі, розраховані на підставі неповної регресії, та їх статистичні оцінки для показників, що перевіряли

Table 4

The mathematical models, calculated on the basis of incomplete regression and statistical estimates for verifiable biological indicators

Математичні моделі по показнику загальної кількості клітин						
Індекс моделі	Модель	sigma	MSE	MAPE	Fst	$M(\hat{u})$
A	$Y = 2,015x_1 + 0,52x_2 + 0,26x_3 - 0,54x_4 + 0,057x_5 - 1,80x_6 - 1,05x_7$	0,102	0,022	0,015	521,54	-5,28e-013
B	$Y = 1,03x_1 + 0,32x_3 - 0,067x_5 - 0,45x_6 + 0,86x_8$	0,16	1,40	0,43	252,54	-2,06e-013
Математичні моделі по показнику рівня антагоністичної активності						
A1	$Y = 0,05x_1 - 0,18x_2 + 0,13x_3 - 0,22x_4 + 0,09x_5 - 0,44x_6 + 1,26x_7$	0,39	0,088	18,78	15,10	-4,78e-014
B1	$Y = 0,14x_1 + 0,078x_3 + 0,07x_5 - 1,44x_6 + 1,21x_8$	0,39	0,17	29,32	22,32	-1,95e-014



Аналізуючи наведені у таблиці 4 моделі, можна дослідити закономірну зміну коефіцієнтів регресії в залежності від кожного досліджуваного показника.

Наприклад, коефіцієнти регресії при змінних x_1 (пептон), x_2 (дріжджовий екстракт) та x_3 (глюкоза) були максимальними для моделей, що описують вплив компонентів поживних середовищ на концентрацію бактерій (моделі А та В) (табл. 4). Проведена математична обробка статистично підтвердила, що дійсно, для росту культури молочнокислих бактерій необхідні середовища складного багатоконпонентного складу. В даному випадку значення коефіцієнтів регресії значно перевищували величину довірчого інтервалу ($\Delta b_i = 0,005$), що вказує на необхідність включення до складу органічної складової поживних середовищ для культивування молочнокислих бактерій усіх зазначених факторів.

Величини коефіцієнтів регресії при змінних x_5 (натрій оцтовокислий), x_6 (цитрат амонію), x_7 (гідроортофосфат натрію) та x_8 (гідроортофосфат калію) були незначними, що свідчить про те, що ці компоненти поживних середовищ менш пріоритетні для росту досліджуваних бактерій, у порівнянні з вищезазначеними. Отримані за допомогою математичного аналізу дані повністю співпадають з літературними джерелами [13, 9]. Лактобактерії є ауксотрофними організмами і тому вимогливі до складу штучних поживних середовищ [9]. Для їх росту в поживне середовище вносять різні добавки: дріжджовий екстракт, дріжджовий автолізат, які містять незамінні амінокислоти та вітаміни.

І, навпаки, саме змінні x_5 , x_6 , x_7 та x_8 мають більше значення для антагоністичної активності штаму *L. plantarum* ONU87 (табл. 4). В моделях А1 і В1 виявлено зростання величин коефіцієнтів регресії при цих змінних майже у 10 разів (табл. 4) у порівнянні з моделями А і В (табл. 4).

Пріоритетні для цих моделей фактори x_7 (Na_2HPO_4) і x_8 (K_2HPO_4) є джерелами фосфору, який необхідний мікроорганізмам для синтезу ряду найважливіших фосфатовмісних сполук.

На підставі отриманих даних (табл. 2 і 3) та результатів математичного аналізу (табл. 4) можна зробити висновок, що найбільш сприятливим середовищем для культивування штаму *L. plantarum* ONU87 є середовище LB 1180, яке може бути використане для подальшої оптимізації за допомогою центрального ортогонального композиційного експерименту.

Грунтуючись на отриманих результатах, для подальшої роботи з оптимізації поживного середовища вибрали комбінацію з пептону, дріжджового екстракту та глюкози, що позначатимуться як чинники: x_1 — глюкоза, x_2 — пептон, x_3 — дріжджовий екстракт. Кожен з цих факторів досліджували на трьох рівнях (нижньому, середньому і верхньому) (табл. 5) та у «зоряних точках» (табл. 6). Виходячи зі складу поживних середовищ, використаних в попередніх експериментах, визначили верхні і нижні рівні значущих чинників (табл. 5).



Таблиця 5

Одиниці варіювання (λ) і концентрації компонентів середовищ на нижньому (-1), середньому (0) і верхньому рівнях (+1)

Table 5

The variation units (λ) and the concentration of media components on the bottom (-1), the middle (0) and upper levels (+1)

Чинники	Фактор	Нижній рівень (-1)	Середній рівень (0)	Верхній рівень (+1)	Одиниця варіювання (λ)
Глюкоза	x1	15,0	20,0	25,0	5,0
Пептон	x2	7,0	10,0	13,0	3,0
Дріжджовий екстракт	x3	2,5	5,0	7,5	2,5

Взагалі, розробка математичної моделі у центральному ортогональному композиційному плані передбачає принцип від «простого до складного». У вигляді полінома цей принцип означає перехід від полінома першого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j$ до полінома другого порядку $y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i \neq j} b_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^n x_i^2$.

Проведення факторного експерименту полягає у визначенні впливу обраного чинника на показник оптимізації. При плануванні за такою схемою реалізовані всі можливі комбінації, які наведені у таблиці 6.

Для розрахунку поточної дисперсії ($S_{y_u}^2$) кожен дослід здійснювали у трьох повторях, на основі чого отримали необхідні для 5% рівня значимості результати, за якими визначали дисперсію їх відтворюваності, а з урахуванням критерію Стьюдента і межі значущості коефіцієнтів регресії (табл. 6).

На підставі коефіцієнтів регресії після проведення центрального ортогонального композиційного експерименту отримана математична модель залежностей концентрації бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 (Y) від концентрацій у середовищі компонентів x_1, x_2, x_3 :

$Y = 0,43 - 0,58x_1 + 0,7x_2 + 0,19x_3 + 0,2x_1x_3 + 0,19x_2x_3 + 0,59x_1^2 + 0,71x_2^2 + 0,98x_3^2$, де x_1 — глюкоза, x_2 — пептон, x_3 — дріжджовий екстракт, Y — концентрація бактерій.

Після знаходження коренів рівнянь, обчислювали пошукувані концентрації факторів середовища використовуючи формулу:

$$c_i = x_i \lambda + c_{0i}$$

де x_i — кодоване значення фактора (безрозмірна величина); c_i та c_{0i} — натуральні значення фактора (відповідно поточне значення і значення на нульовому рівні); λ — натуральне значення інтервалу варіювання факторів (ΔC) [7].



Таблиця 6

Матриця планування експерименту, розраховані значення коефіцієнтів регресії та їх статистичні оцінки

Table 6
The planning matrix of the experiment, the calculated values of the regression coefficients and their statistical evaluation

Дослід	Рівні факторів										Значення показника оптимізації	Дисперсія $S_{y_a}^2$			
	x_1	x_2	x_3	x_1^2	x_2^2	x_3^2	$x_1 x_2$	$x_1 x_3$	$x_2 x_3$	$\bar{y} \pm \Delta$					
1	-1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	+1	+1	3,4±0,2	0,28			
2	+1	-1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	-1	-1	-1	3,9±0,7	0,37			
3	-1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	-1	+1	+1	-1	3,5±0,5	0,30			
4	+1	+1	-1	0,27	0,27	0,27	+1	-1	-1	-1	3,5±0,3	0,31			
5	-1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	-1	-1	3,2±0,7	0,26			
6	+1	-1	+1	0,27	0,27	0,27	-1	+1	+1	+1	4,2±0,1	0,43			
7	-1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	+1	+1	+1	+1	3,7±0,1	0,34			
8	+1	+1	+1	0,27	0,27	0,27	0	0	0	0	4,9±0,2	0,59			
9	-1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	3,4±0,1	0,28			
10	+1,21	0	0	0,75	-0,73	-0,73	0	0	0	0	3,1±0,1	0,24			
11	0	-1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	3,6±0,1	0,32			
12	0	+1,21	0	-0,73	0,75	-0,73	0	0	0	0	3,5±0,3	0,30			
13	0	0	-1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	4,0±0,2	0,39			
14	0	0	+1,21	-0,73	-0,73	0,75	0	0	0	0	3,9±0,1	0,37			
15	0	0	0	-0,73	-0,73	-0,73	0	0	0	0	3,1±0,1	0,23			
Дисперсія відтворюваності $S_{b_i}^2$	0,20														
Коефіцієнт регресії	b_1	b_2	b_3	b_{12}	b_{13}	b_{23}	b_1^2	b_2^2	b_3^2	b_s^2	b_0				
	-0,58	0,7	0,20	-0,03	0,20	0,19	0,59	0,71	0,98	0,43					
Висновок	Y=0,43-0,58x ₁ +0,7x ₂ +0,20x ₃ +0,2x ₁ x ₃ +0,19x ₂ x ₃ +0,59x ₁ ² +0,71x ₂ ² +0,98x ₃ ²										значущий	значущий	значущий	Критерій Кохрена G = 0,12	Критерій Фішера F = 2,49

За розрахунковими показниками оптимізоване поживне середовище (середовище OLB) для збільшення загальної кількості бактерій *L. plantarum* ONU87 має наступний склад (г/л): глюкоза — 22,5, дріжджовий екстракт — 4,5, пептон — 8,5, натрій оцтовокислий — 25,0, гідроортофосфат калію — 6,0, цитрат амонію 3-х заміщених — 2,0, сульфат магнію, марганцю і заліза в слідових кількостях.

При перевірці оптимізованого середовища OLP, отриманого за результатами центрального ортогонального композиційного експерименту, показано, що концентрація бактерій штаму *L. plantarum* ONU87 досягала значення $3,51 \pm 0,10 \times 10^{10}$ кл/мл у порівнянні з $5,7 \pm 0,4 \times 10^9$ кл/мл на вихідному середовищі. При цьому питома швидкість росту складала 0,34 год⁻¹.

Таким чином, за математичного аналізу впливу складу поживних середовищ на показники концентрації бактерій та рівня антагоністичної активності, можна зробити висновок, що найбільш значущими для росту культури молочнокислих бактерій є глюкоза, дріжджовий екстракт та пептон. Дослідженнями методом математичного планування експерименту, з використанням центрального композиційного ортогонального експерименту, оптимізовано поживне середовище, яке дозволяє суттєво підвищити врожай бактерій пробіотичного штаму *L. plantarum* ONU87.

УДК 579.852.11.24

Н.Ю. Васильева, Н.В. Коротаева, Н.Н. Панченко, В.А. Іваниця

Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65082, Украина, тел.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ОПТИМИЗАЦИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ШТАММА *LACTOBACILLUS* *PLANTARUM* ONU87

Реферат

Цель. Целью данной работы была оптимизация состава питательной среды для культивирования штамма молочнокислых бактерий *L. plantarum* ONU87 с одновременным изучением влияния компонентов различных питательных сред на ростовые характеристики и антагонистическую активность этих бактерий. **Методы.** Антагонистическую активность штамма лактобацилл относительно *Rhizobium radiobacter* C58 *in vitro* определяли методом двойных агаровых слоев. Титр агробактерий определяли методом серийных разведений с последующим высевом на плотную среду MRS. Оценку влияния каждого фактора



питательных сред на исследуемые показатели проводили с помощью неполной регрессионной модели. Оптимизация среды проведена с использованием центрального композиционного ортогонального эксперимента. Параметром оптимизации служил показатель концентрации бактерий. **Результаты.** В результате проведенных исследований показано, что на накопление бактерий и их антагонистическую активность влияет состав компонентов питательных сред и их соотношение, что было доказано с помощью полученных математических моделей. Конечным результатом проведенных исследований являлась питательная среда OLB (глюкоза — 22,5 г/л, пептон — 8,5 г/л, дрожжевой экстракт — 4,5 г/л, K_2HPO_4 — 6,0 г/л, Na цитрат — 2,0 г/л, $CH_3COONa \times 3H_2O$ — 25,0 г/л, $MgSO_4$ — 0,2 г/л, $MnSO_4$ — 0,2 г/л и $FeSO_4$ 0,05 г/л), при росте на которой концентрация лактобактерий в стационарной стадии роста возросла до $3,51 \pm 0,10 \times 10^{10}$ кл/мл. **Выводы.** Математическое планирование эксперимента позволило при незначительном изменении количественного состава питательной среды, значительно увеличить накопление биомассы.

Ключевые слова: *Lactobacillus plantarum*, антагонистическая активность к *Rhizobium radiobacter*, оптимизация питательной среды, математическая модель, коэффициент регрессии, центральный композиционный ортогональный эксперимент.

UDC 579.852.11.24

N.Yu. Vasylieva, N.V. Korotaeva, M.N. Panchenko, V.O. Ivanytsia

Odesa Mechnykov National University, 2, Dvoryanska str.,
Odesa, 65082, Ukraine, tel.: +38 (0482) 63 79 15,
e-mail: tatkamic@onu.edu.ua

MATHEMATICAL ANALYSIS AND OPTIMIZATION OF THE CULTURE MEDIUM FOR STRAIN *LACTOBACILLUS* *PLANTARUM* ONU87

Summary

Aim. The aim of this work was to optimize the composition of the nutrient medium for cultivation the strain *L. plantarum* ONU87 of lactic acid bacteria while studying the impact of various components of culture media on the growth characteristics and antagonistic activity of these bacteria. **Methods.** The antagonistic activity of the strain *L. plantarum* ONU87 relatively to *Rhizobium radiobacter* C58 in vitro was determined by the double agar layer. The titer was determined by method of serial delutions of *Rhizobium radiobacter* C58 followed by plating on solid medium MRS.



Methodological basis for the work were well-known methods, which allowed determine the quantitative values of the index CFU/ml and antagonistic activity. Assess the impact of each factor of the growth media on verifiable indicators was performed using the partial regression model. Optimization of culture medium was performed using the central composite orthogonal design. The indicator of bacterial concentration served as a parameter optimization. **Results.** The studies show that the accumulation of bacteria and their antagonistic activity depends on the components of culture media and their relationship, which was proved by mathematical models. The final result of the research was the new culture medium – OLB (glucose – 22.5 g/l, peptone – 8.5 g/l, yeast extract – 4.5 g/l, K_2HPO_4 – 6.0 g/l, Na citrate – 2.0 g/l, $CH_3COONa \times 3H_2O$ – 25.0 g/l, $MgSO_4$ – 0.2 g/l, $MnSO_4$ – 0.2 g/l, $FeSO_4$ – 0.05 g/l) by using it the concentration of lactic acid bacteria in the stationary phase of growth increased to $3.51 \pm 0.10 \times 10^{10}$ CFU/ml. **Conclusion.** It has been shown that the mathematical design of the experiments, allows with little change in the quantitative composition of the culture medium, significantly increase the accumulation of biomass.

Key words: *Lactobacillus plantarum*, culture media, antagonistic activity, optimization, the mathematical model, the regression coefficients, the central composite orthogonal design.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Держинская И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов . – Астрахань: Изд-во АГТУ., 2008. – 348 с.
2. Дронов С.В. Многомерный статистический анализ. – Барнаул: Изд-во Алт. гос. ун-та., 2003. – 213 с.
3. Егоров Н.С., Баранова И.П. Бактериоцины. Образование, свойства, применение // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – 44, № 6. – С. 33–40.
4. Ждан-Пушкина С.М. Основы роста культур микроорганизмов: учеб. пособие / Под ред. В.П. Гончаровой. – Л.: Лен. ун-т, – 1983. – 188 с.
5. Конькова Н.К. Пути усовершенствования питательных сред, используемых в технологии производства медицинских и ветеринарных пробиотиков : Автореф. дис. канд. биол. наук. Н. Новгород, 2002. – 21 с.
6. Методы общей бактериологии: В 3 т. /Под ред. Ф. Герхарда и др. – М.: Мир, 1983. – Т. 1.– 536 с.
7. Мухачев В.А. Планирование и обработка результатов эксперимента. – Томск: Томский государственный университет систем управления., 2007. – 118 с.
8. Сергеева Ж.Ю., Крилова К.Д., Ліманська Н.В., Васильева Н.Ю., Товкач Ф.І., Іваниця В.О. Вплив *Lactobacillus plantarum* ONU87 та автолізу бактерій *Erwinia carotovora* ZM1 на інфекційність збудників м'якої гнилі //Мікробіологія і біотехнологія. – 2012. – № 4. – С. 18–28.



9. Тимченко Л.Д., Пенькова Н.И., Катунина Л.С. Сравнительный анализ традиционных питательных сред и новая капуста среда для культивирования лактобактерий // Вестник Московского государственного областного университета серия «Естественные науки». — 2010. — № 2. — С. 51–55.

10. Юнкеров В.И., Григорьев С.Г. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований. — СПб.: ВМедА., 2002. — 266 с.

11. Gilligan C.A. Sustainable agriculture and plant diseases: an epidemiological perspective // Philosophical Transactions of the Royal Society. — 2008. — 363, № 1492. — P. 741–759.

12. ten Brink B, Minekus M, van der Vossen J.M., Leer R.J., Huis in't Veld J.H.. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46 // // J. Appl. Bacteriol. — 1994. — Vol. 77, № 2. — P. 140–148.

13. Пат. 2216587 Российская Федерация. Питательная среда для выращивания лактобактерий. // Н.К. Конькова, И.С. Горлова, Н.А. Голубева. — Опубл. 20.11.2003 р.

Стаття надійшла до редакції 11.05.2013 р.

