

Из результатов, сведенных в таблице 3, следует, что у мышей, иммунизированных смесью соматического антигена и вифлорита, через 10 суток после первой иммунизации продолжительность жизни составила 187,2 часа. Тогда как у животных, иммунизированных соматическим антигеном без адьюванта и с гидроокисью алюминия, средняя продолжительность жизни мышей составила, соответственно, 84,3 и 139,2 часа.

Через 6, 12 и 18 суток после второй вакцинации соматическими антигенами, приготовленными как с гидроокисью алюминия, так и вифлоритом, обеспечивали продолжительность жизни животным, соответственно, 193,6 - 203,2 часа, 211,6 - 219,2 часа и 224,0 - 230,0.

Из полученных результатов видно, что вифлорит обеспечивает более раннюю иммунную защиту, чем гидроокись алюминия.

Однако в целом по адьювантной активности вифлорит и гидроокись алюминия равноценны, хотя механизмы их действия разные. Из результатов, сведенных в таблицах 2 и 3, видно, что вифлорит обладает адьювантным свойством, так как существенно повышает иммуногенность как соматического, так и адгезивного антигенов эшерихий.

Заключение. По результатам проведенных исследований нами сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что включение вифлорита в состав адгезивных антигенов эшерихий взамен физиологического раствора в 8 раз повышает иммунный ответ животных.

2. Действие вифлорита в использованной дозе в составе адгезивного антигена как адьюванта равноценно гидроокиси алюминия, который используется в производстве коммерческих вакцин против колибактериоза.

3. После повторной инъекции адгезивного антигена эшерихий адьювантный эффект вифлорита снижается вследствие гиперактивации иммунной системы животных, очевидно, из-за содержания высокой дозы антигена и адьюванта.

4. Для конструирования с высокой биологической защитой вакцины против колибактериоза животных в дополнительных исследованиях необходимо подобрать оптимальные соотношения адьюванта с вифлоритом.

Литература. 1. Каврук, Л. С. *Этиология желудочно-кишечных заболеваний поросят-сосунов, их профилактика и лечение* / Л. С. Каврук // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2009. – №6. – С. 53–58. 2. Медведев, А. П. *Требования к штаммам, предназначенным для производства противозерихиозных препаратов* / А. П. Медведев, А. М. Юдасин // *Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал*. – Витебск : ВГАВМ, 2007. – Т. 43, вып. 1. – С. 154–157. 3. Медведев, А. П. *Условно-патогенные микробы и их роль в инфекционной патологии животных* / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий, М. В. Грибанова // *Ветеринарная медицина Беларуси*. – 2006. – № 1. – С. 12–13. 4. *Этиологическая структура инфекционных болезней поросят отъемышей в свиноводческих комплексах* / Г. Н. Спиридонов [и др.] // *Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях : материалы Междунар. науч.-практ. конф. г. Воронеж, 23-25 сентября 2002 года*. – Воронеж, 2002. – С. 40–42. 5. *Эффективность нового бактериального препарата на основе бацилл при лечении кишечных инфекций у молодняка сельскохозяйственных животных и птиц* / Н. Н. Андросик [и др.] // *Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 70-летию со дня образования Бел. НИИЗВ им. С.Н. Вышелесского, г. Минск, 5-6 октября 2000 года*. – Минск, 2000. – С. 239–241. 6. *Adjuvants are an important component of vaccines* [Electronic resource] // *Biopreparaty*. – 2010. – № 4. – P. 40. – Access mode: <http://www.biopreparaty-magazine.ru/review/4001/>. 7. Garçon, Nathalie *GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives* / Nathalie Garçon, Patrick Chomez, Marcelle Van Mechelen // *Expert Review of Vaccines*. – 2007. – Vol. 6, No. 5. – P. 723–739. 8. Garçon, Nathalie *Vaccine adjuvants* / Nathalie Garçon, Geert Leroux-Roels, Wen-Fang Cheng // *Perspectives in Vaccinology*. – 2011. – Vol. 1, No 1. – P. 89–113. 9. *The vaccine adjuvant alum inhibits IL-12 by promoting PI3 kinase signaling while chitosan does not inhibit IL-12 and enhances Th1 and Th17 responses* / Andres Mori [et al.] // *European Journal of Immunology*. – 2012. – Vol. 42, No 10. – P. 2709–2719.

Статья передана в печать 27.08.2015 г.

УДК 619:579.842.11.017.8

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ВЫРАЩИВАНИЯ ЭШЕРИХИЙ

*Зайцев В.В., **Зайцева А.В., **Дремач Г.Э., **Корочкин Р.Б.

*ОАО «БелВитунифарм», г. Витебск, Республика Беларусь

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

В ходе проведенной работы подобран оптимальный состав питательной среды для производственного культивирования штаммов эшерихий, позволяющий повысить выход целевого продукта в 2,95-3,0 раза.

The authors have developed a recipe for a medium to cultivate Escherichia strains while allowing the final culture yield by 2,95 – 3,0 times.

Ключевые слова: питательная среда, E. coli, ферментализат, пивные дрожжи, пекарные дрожжи, бульон Хоттингера.

Keywords: medium, E. coli, lyzate, deer yeast, baking yeast, Hottinger broth.

Введение. Одной из важнейших задач животноводства является производство высококачественных безопасных в экологическом и санитарном отношении продуктов питания – молока и мяса. Однако на протяжении длительного времени животноводство несет большие потери вследствие возникновения желудочно-кишечных болезней новорожденных телят, основным этиологическим фактором которых является условно-патогенная микрофлора. К такой категории микроорганизмов относятся и эшерихии, обуславливающие возникновение колибактериоза (эшерихиоза).

Колибактериоз одна из серьезнейших проблем в свиноводстве, которая усугубляется этиологическими факторами, выражающимися разнообразием серовариантов эшерихий, вызывающих различные формы проявления данного заболевания [4, 6].

Колибактериоз регистрируется во многих странах мира, в том числе и в Республике Беларусь [3].

Для специфической профилактики болезни в республике применяется ряд биологических препаратов – вакцин и сывороток. Основным элементом их производства является приготовление питательной среды, обеспечивающей высокое накопление биомассы микроорганизмов. С этой целью в биологической промышленности используется значительное количество сред разного состава. Разработка состава питательных сред хоть и проводится на основании современных представлений о физиологических потребностях микроорганизмов и особенностях их метаболизма, но соотношения компонентов в среде зачастую подбираются эмпирически, реже с использованием весьма трудоемкого метода многофакторного планирования. Такие подходы приводят к созданию сред, недостаточно оптимальных и экономичных по составу.

В связи с этим, исследования, направленные на повышение биологической активности питательных сред на основе ферментоллизатов мяса, являются актуальными и вытекают из запросов производства.

Технология создания сред на основе белковых гидролизатов проста и универсальна, что позволяет получать их в больших количествах. Предложено значительное число белковых гидролизатов: казеина, цельной крови, сыворотки крови, эмбрионов, внутренних органов, мышечной ткани животных, растительных белков – сои, гороха и других.

Для культивирования бактерий используют сывороточные среды, гидролизаты мяса, мясокостной муки, субпродуктов животных и придатков семенников, гидролизатов крови и др. Бульон Хоттингера, применяемый для выращивания культур *E. coli* при изготовлении биологических препаратов ветеринарного назначения, по ряду параметров не удовлетворяет требованиям современного производства [1, 2, 5].

Цель исследований – повысить биологическую активность питательных сред на основе ферментоллизатов мяса.

Материалы и методы исследований. В опыте использовали перевар Хоттингера, пептон, автолизат пивных дрожжей.

Химические показатели качественного перевара:

- общий азот - 800-1200 мг/%;
- аминный азот - 600-900 мг/%;
- триптофан - 100-200 мг/%.

При необходимости перевар Хоттингера можно хранить до одного месяца при 18°C, для чего к нему добавляют хлороформ из расчета 10 см³ на 1 литр перевара.

Бульон Хоттингера готовили из прозрачной надосадочной жидкости основного перевара, которую разводили очищенной водой до содержания в бульоне 200-220 мг/% аминного азота и добавляли 0,5% пептона и натрия хлорида, 0,3% двусоснового фосфорно-кислого натрия. Смесь кипятили в течение 30 минут. В процессе кипячения устанавливали pH 7,2-8,0 добавлением 10%-ного раствора натрия гидроксида. После часа кипячения среду отстаивали 2 часа и фильтровали. Фильтрованную среду фасовали во флаконы и стерилизовали в течение 45 минут при температуре 116-118°C.

Для характеристики гидролизатов использовали показатели, которые свидетельствовали о наличии в них продуктов расщепления белка, т.е. определяли содержание общего, остаточного и аминного азота.

Варианты питательных сред №1 и №2 готовили путем разведения водой до содержания 200 мг/% аминного азота, соответственно, ферментоллизаты пекарских и пивных дрожжей. Кроме того, готовили опытные варианты питательных сред №3, №4, №5 и №6 путем включения в бульон Хоттингера соответственно 5%, 10%, 15% и 20% ферментоллизата пивных дрожжей.

В качестве контроля использовали бульон Хоттингера.

К важным показателям качества гидролизатов относят: количество в них белкового и аминного азота, триптофана, углеводов, накопление количества микробных клеток, скорость роста микроорганизмов на питательных средах, стабильность основных свойств выращенных культур и другие.

Наличие белкового азота в гидролизатах является количественным показателем в них крупных белковых фракций и нерасщепленного белка.

Величина pH питательных сред, чувствительность и скорость роста бактерий в них, стабильность свойств полученных культур – это показатели, непосредственно характеризующие качество питательных сред.

Для оценки ростовой активности сред использовали тест-штаммы микроорганизмов:

- *Staphylococcus aureus* «Лоссмано»,
- *Escherichia coli* № 675,
- *Streptococcus faecalis* 6783,
- *Streptococcus pyogenes* DICK-1,
- *Shigella flexneri* №8516,
- *Corinebacterium diphtheroides* №1911.

Для изготовления вакцин использовали производственные штаммы эшерихий: E. coli O₂₀, E. coli O₁₁₇, E. coli O₂₆, E. coli O₁₃₉, E. coli O₁₅, E. coli O₄₁, E. coli O₅₅, E. coli O₁₁₅, E. coli O₁₀₁, E. coli O₁₄₁, E. coli O₈, E. coli O₉ и E. coli O₇₈.

Физико-химический и биологический контроль белковых гидролизатов и приготовленных на их основе сред осуществляли согласно «Методическим рекомендациям по контролю качества питательных сред для микроорганизмов» (2006).

Результаты исследований. В первом опыте нами дана оценка питательным средам, приготовленным на основе ферментализатов пивных и пекарных дрожжей.

Таблица 1 – Показатели роста испытываемых культур разных серотипов эшерихий, млрд/см³ м.к.

Штаммы эшерихий	Наименование среды		
	бульон Хоттингера	ферментализат пекарских дрожжей (среда № 1)	ферментализат пивных дрожжей (среда № 2)
E. coli O ₈	4,0 ± 0,2	2,6 ± 0,10	3,1 ± 0,16
E. coli O ₉	4,3 ± 0,18	2,8 ± 0,12	3,3 ± 0,18
E. coli O ₁₅	4,2 ± 0,16	2,8 ± 0,15	3,2 ± 0,14
E. coli O ₂₀	4,0 ± 0,14	2,5 ± 0,14	3,0 ± 0,12
E. coli O ₂₆	4,2 ± 0,16	2,7 ± 0,10	3,3 ± 0,10
E. coli O ₅₅	4,2 ± 0,14	2,7 ± 0,10	3,2 ± 0,14
E. coli O ₇₈	4,3 ± 0,18	2,8 ± 0,13	3,0 ± 0,10
E. coli O ₈₆	4,4 ± 0,14	2,8 ± 0,12	3,4 ± 0,18
E. coli O ₁₁₅	4,2 ± 0,12	2,6 ± 0,11	3,2 ± 0,12

Из таблицы 1 видно, что все производственные штаммы эшерихий проявляли ростовую активность на дрожжевых средах. Однако, уровень накопления клеток на дрожжевых средах был ниже, чем на бульоне Хоттингера. Так, на среде, приготовленной на основе ферментализатов пекарских дрожжей, концентрация эшерихий находилась в пределах 2,5±0,14 - 2,8±0,15 млрд/см³ м.к., на среде, приготовленной на основе пивных дрожжей, - 3,0±0,12 - 3,4±0,18 млрд/см³ м.к., в то время как на бульоне Хоттингера плотность баксуспензии составила 4,0 ± 0,2 - 4,4 ± 0,1418 млрд/см³ м.к. Исходя из полученных результатов исследований очевидно, что дрожжевые среды самостоятельно не могут использоваться для производственных нужд, так как не обеспечивают накопления достаточного объема биомассы микроорганизмов.

Во втором опыте нами была предпринята попытка оптимизировать бульон Хоттингера путем включения в его состав разных доз ферментализата пивных дрожжей.

Для сравнительной оценки ростовой активности экспериментальные среды засеивали тест-штаммами микроорганизмов.

Результаты исследований представлены в таблице 2.

В ходе проведенных исследований установлено, что все испытанные тест-штаммы наиболее высокую ростовую активность проявляли на экспериментальных средах (таблица 2).

Тест-культуры на средах, приготовленных по вариантам 5 и 6, росли в 2,7 – 3,0 раза интенсивнее, чем на бульоне Хоттингера.

Эти же тест-культуры на среде, приготовленной по варианту №3, обеспечивали прирост биомассы относительно контрольной среды на 37,0-40,0%.

Среда, приготовленная по варианту №4, по ростовой активности занимала промежуточное положение.

Таблица 2 – Рост тест-штаммов микроорганизмов в средах разного состава (в единицах оптической плотности)

Наименование среды	Наименование тест-культур					
	Staphylococcus aureus «Лоссманов»	Streptococcus pyogenes DICK-1	Shigella flexneri №8516	Corinebacterium diphtheroides №1911	Escherichia coli № 675	Streptococcus faecalis 6783
вариант 3	0,59±0,026	0,77±0,05	0,60±0,022	0,58±0,018	0,79±0,04	0,61±0,015
вариант 4	0,85±0,04	1,06±0,09	0,79±0,06	0,71±0,05	1,04±0,08	0,80±0,05
вариант 5	1,21±0,06	1,68±0,08	1,23±0,06	1,13±0,07	1,62±0,08	1,24±0,06
вариант 6	1,26±0,08	1,65±0,10	1,28±0,07	1,18±0,08	1,64±0,07	1,29±0,06
по методическим рекомендациям	0,4±0,10	0,12±0,11	0,15±0,010	0,12±0,012	0,5±0,03	0,3±0,011
бульон Хоттингера (контроль)	0,42±0,02	0,56±0,022	0,44±0,012	0,42±0,014	0,58±0,021	0,44±0,012

В заключительном опыте нами проведена оценка влияния разных модификаций бульона Хоттингера на интенсивность роста разных серотипов эшерихий. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты оценки эффективности изучения питательных сред при стационарном культивировании разных штаммов эшерихий (млрд/см³ м.к.)

Наименование питательных сред	Наименование культур эшерихий												
	E. coli O ₆ :K ₄₃	E. coli O ₆ :K ₃₀	E. coli O ₁₅ :K ₁₄ :H	E. coli O ₂₀	E. coli O ₂₆ :K ₆₀	E. coli O ₅₆	E. coli O ₇₆ :K ₆₀	E. coli O ₁₁₇	E. coli O ₁₁₅	E. coli O ₁₃₉	E. coli O ₁₀₁	E. coli O ₁₄₁	E. coli O ₄₁
вариант 3	3,32 ± 0,26	3,35 ± 0,20	3,26 ± 0,20	3,28 ± 0,22	3,34 ± 0,26	3,36 ± 0,20	3,24 ± 0,25	3,27 ± 0,21	3,20 ± 0,28	3,26 ± 0,18	3,35 ± 0,18	3,28 ± 0,14	3,24 ± 0,12
вариант 4	3,86 ± 0,28	3,88 ± 0,30	3,88 ± 0,30	3,78 ± 0,22	3,85 ± 0,24	3,88 ± 0,20	3,90 ± 0,31	3,88 ± 0,25	3,79 ± 0,26	3,76 ± 0,18	3,83 ± 0,22	3,86 ± 0,24	3,88 ± 0,28
вариант 5	5,21 ± 0,46	5,24 ± 0,42	5,24 ± 0,42	5,22 ± 0,35	5,25 ± 0,30	5,22 ± 0,33	5,14 ± 0,28	5,18 ± 0,25	5,22 ± 0,28	5,15 ± 0,36	5,23 ± 0,32	5,18 ± 0,20	5,16 ± 0,24
вариант 6	5,24 ± 0,40	5,25 ± 0,38	5,25 ± 0,38	5,24 ± 0,32	5,23 ± 0,34	5,25 ± 0,35	5,19 ± 0,31	5,23 ± 0,35	5,20 ± 0,33	5,18 ± 0,32	5,20 ± 0,28	5,24 ± 0,24	5,21 ± 0,30
контроль (бульон Хоттингера)	2,66 ± 0,18	2,68 ± 0,16	2,68 ± 0,16	2,61 ± 0,20	2,62 ± 0,18	2,63 ± 0,22	2,58 ± 0,20	2,61 ± 0,20	2,26 ± 0,22	2,61 ± 0,18	2,63 ± 0,21	2,6 ± 0,16	2,58 ± 0,22

Все изученные производственные штаммы эшерихий положительно реагировали на присутствие в составе бульона Хоттингера компонентов ферментализата пивных дрожжей. Так, включение в бульон Хоттингера 5% ферментализата пивных дрожжей способствовало повышению выхода биомассы эшерихий на 23,0-25,0%.

Наиболее выраженная ростовая активность эшерихий проявлялась на бульоне Хоттингера при добавлении 15-20% ферментализата дрожжей. При этом, относительно контроля прирост биомассы повышался в 2,95-3,0 раза. Добавление в бульон Хоттингера до 10% ферментализата дрожжей повышало накопление эшерихий более чем в 2,0 раза.

Для практических целей при производственном выращивании штаммов эшерихий целесообразно в бульон Хоттингера добавлять 15% ферментализата дрожжей. Добавление в бульон более 15% ферментализата дрожжей не целесообразно.

Заключение. На основании проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Для получения производственных питательных сред с высокой ростовой активностью относительно культур эшерихий в бульон Хоттингера следует добавлять 15% ферментализата пивных дрожжей.

2. Использование сбалансированной среды на основе ферментализатов мяса и пивных дрожжей для производственного культивирования штаммов эшерихий позволяет повысить выход целевого продукта в 2,95-3,0 раза.

3. Применение предлагаемой среды в производстве колибактериозных вакцин для животных позволит в 3 раза снизить расход говяжьего мяса.

Литература. 1. Андросик, Н. Н. Достижения и перспективы развития ветеринарной науки / Н. Н. Андросик // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных : материалы Международной науч.-практ. конф., посвященной 70-летию со дня образования БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелесского, 5-6 окт. 2000. – Минск, 2000. – С. 11–22. 2. Максимюк, Н. Н. О преимуществах ферментного способа получения белковых гидролизатов / Н. Н. Максимюк, Ю. В. Марьяновская // Фундаментальные исследования. – 2009. – № 1. – С. 34–35. 3. Медведев, А. П. Требования к штаммам, предназначенным для производства противозшерихиозных препаратов / А. П. Медведев, А. М. Юдасин // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск : ВГАВМ, 2007. – Т. 43, вып. 1. – С. 154–157. 4. Медведев, А. П. Условно-патогенные микробы и их роль в инфекционной патологии животных / А. И. Медведев, А. А. Вербицкий, М. В. Грибанова // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2006. – № 1. – С. 12–13. 5. Сартакова, О. Ю. Промышленная микробиология : учебное пособие по курсу «Основы микробиологии и биотехнологии» / О. Ю. Сартакова. – Барнаул : Изд-во АлтГТУ, 2009. – 173 с. 6. Этиологическая структура инфекционных болезней поросят отъемышей в свиноводческих комплексах / Г. Н. Спиридонов [и др.] // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях : материалы Междунар. науч.-практ. конф. в Воронеж, 23-25 сентября 2002 года. – Воронеж, 2002. – С. 40–42.

Статья передана в печать 09.09.2015 г.