

УДК 619:579.843.95

**ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ ИЗ СЫВОРОТКИ МОЛОКА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПАСТЕРЕЛЛ****Вербицкий А.А., Медведев А.П., Гвоздев С.Н.**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,  
г. Витебск, Республика Беларусь

*В статье показана возможность приготовления качественных питательных сред из дешевого сырья – сыворотки молока для культивирования пастерелл. **Ключевые слова:** сыворотка молока, питательные среды, тест-штаммы, свойства, бактерии, скорость роста, концентрация, диссоциация.*

**A MEDIUM FROM MILK SERUM FOR CULTIVATING PASTEURELLAE****Viarbitski A.A., Medvedev A.P., Hvozdeu S.N.**

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*The article shows the possibility of preparing high-quality nutrient media from cheap raw materials - whey milk for the cultivation of pasteurellosis. **Keywords:** milk serum, nutrient media, test strains, properties, bacteria, growth rate, concentration, dissociation.*

**Введение.** Пастереллез – инфекционная болезнь, преимущественно молодняка многих видов сельскохозяйственных животных, характеризующаяся при остром течении лихорадкой, явлениями септицимии, токсикоза, поражением кишечника, а при хроническом – воспалением легких, артритами. У взрослых животных болезнь может проявляться абортами. Пастереллы – возбудители пастереллеза, могут вызывать пищевые токсикоинфекции у людей, что свидетельствует о социальной опасности болезни [3, 4].

В последнее время пастереллез животных и птиц в хозяйствах Республики Беларусь имеет широкое распространение. Ежегодно в стране регистрируется от 16 до 70 неблагополучных пунктов по этой инфекционной патологии у крупного рогатого скота и свиней. Заболеваемость при этом составляет до 90%, летальность – от 10 до 75% [4].

Важнейшей задачей ветеринарной науки и практики является профилактика инфекционных болезней животных, в том числе и пастереллеза. Решающую роль в деле предупреждения и ликвидации пастереллеза отводят применению специфических препаратов.

В Республике Беларусь в целях предотвращения возникновения и распространения пастереллеза среди животных предложены для применения следующие вакцины: вакцина ассоциированная инактивированная против репродуктивно-респираторного синдрома и пастереллеза свиней, а также вакцина инактивированная против пастереллеза и бордетеллеза свиней. Обе вакцины производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского НАН РБ». Также применяется вакцина ассоциированная поливалентная против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней, производства ОАО «БелВитунифарм».

Однако их промышленное производство связано с необходимостью применения огромного количества питательных сред, особенно жидких.

Традиционно для промышленного культивирования большинства видов бактерий, в том числе и пастерелл, при изготовлении биопрепаратов применяют бульон Хоттингера, который готовят из качественного говяжьего мяса, пригодного в пищу людям, что экономически не целесообразно [1, 5, 12].

Поэтому на протяжении всей истории развития микробиологии проводились и в настоящее время проводятся работы по поиску и применению различного белоксодержащего сырья для получения из него гидролизатов и приготовления на их основе питательных сред для культивирования различных видов микроорганизмов [2, 6, 7, 8, 9, 10, 11].

В этой связи целью нашей работы явилась апробация сыворотки молока в качестве сырья для получения гидролизатов и приготовления на их основе питательных сред, предназначенных для культивирования пастерелл.

**Материалы и методы исследований.** В опытной работе использовали сыворотку молока – отход молочной промышленности при производстве сыра и творога. Известно, что при приготовлении этих продуктов в сыворотке молока остается до 1,5% полноценного белка. Мы закислили сыворотку, что вызвало осаждение белковой массы, которую затем разводили водой в соотношении 1:1, а затем расщепляли ее воздействием протеолитических ферментов. В результате протеолиза мы получили гидролизат, который по биохимическим показателям был сходным с переваром Хоттингера, получаемым из говяжьего мяса, т.е. содержал 800–1200 мг% общего азота, 700–900 мг% аминного азота, 150–200 мг% триптофана. Полученный гидролизат представлял собой жидкость светло-желтого цвета, имел характерный специфический запах, хорошо смешивался с водой, концентрация водородных ионов составляла 6,4–6,8. С использованием гидролизата нами было приготовлено три варианта жидкой питательной среды: первый вариант содержал в своем составе 0,5% хлористого натрия и 2% гидролизата (лактопептона),

второй – 0,5% хлористого натрия и 3% лактопептона, третий – такое же количество хлористого натрия и 4% лактопептона. pH приготовленных сред доводили с помощью 10%-ного раствора натрия гидроксида до 7,4–7,6, а затем автоклавировали их при 1 атм. в течение 30 минут. Стерильность питательных сред определяли общепринятыми в микробиологической практике способами.

Кроме жидких питательных сред, нами были приготовлены плотные и полужидкие среды, в которых устанавливали оптимальные для выращивания пастерелл значения pH. Среды стерилизовали в автоклаве, контролировали на стерильность и затем применяли в опытной работе. Все приготовленные среды подвергали визуальному, физико-химическому и биологическому контролю.

Оценку пригодности питательных сред для культивирования тест-штаммов микроорганизмов и производственных штаммов пастерелл проводили по следующим критериям:

- чувствительности сред;
- скорости роста тест-штаммов бактерий при засеве ими приготовленных сред;
- концентрации бактерий, выращенных в опытных средах;
- тинкториально-морфологическим свойствам выращенных тест-микроорганизмов;
- характеру роста и степени диссоциации бактерий на плотных средах;
- степени диссоциации бактерий в процессе семикратного пассирования через питательные среды.

В экспериментальной работе были задействованы производственные штаммы пастерелл *Pasteurella multocida* 877 и *Pasteurella multocida* 656.

Биологический контроль питательных сред проводили с использованием тест-микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Corynebacterium diphtheroides*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*.

Для определения чувствительности и скорости роста штаммов микроорганизмов их выращивали на плотной питательной среде, смывали физраствором, готовили взвесь с содержанием 1 млрд м.т. в 1 см<sup>3</sup>. Затем из этой взвеси делали десятикратные разведения и проводили засев из разведений 10<sup>-5</sup>–10<sup>-8</sup> на плотные, жидкие и полужидкие питательные среды. Среды считали качественными в отношении чувствительности при появлении роста в чашках и пробирках, засеянных культурой тест-штамма, разведенной не менее чем 10<sup>-5</sup>. Скорость роста бактерий определяли для каждого разведения взвеси через 12–24–48 часов выдерживания в термостате плотных питательных сред и через 3–6–9 и т.д. до 48 часов жидких и полужидких сред.

Концентрацию бакмассы определяли с помощью денситометра и фотоэлектронметрически. Эффективность жидких питательных сред устанавливали по концентрации микробных клеток через 20–24 часа инкубации их в термостате. При проведении опытов в качестве контрольных применяли среды, приготовленные на основе гидролизатов из качественного говяжьего мяса.

Характер роста тест-штаммов микроорганизмов и пастерелл определяли визуально. При просмотре жидких сред выявляли интенсивность их помутнения, изменение цвета, наличие осадка, поверхностной пленки, пристеночного кольца. Выросшие на плотной питательной среде колонии характеризовали по величине, форме, прозрачности, контуру края, рельефу поверхности, цвету, структуре и консистенции.

Чистоту культур тест-штаммов бактерий и пастерелл проверяли путем световой микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму.

Подвижность бактерий определяли путем посева уколом в полужидкий агар с последующим визуальным просмотром этой среды.

Сахаролитическую способность пастерелл определяли путем засева чистых культур в жидкие среды Гисса, содержащие различные сахара.

Патогенность пастерелл определяли на белых мышах массой 16–18 г, которым вводили подкожно по 0,5 см<sup>3</sup> 18–24-часовую бульонную культуру.

**Результаты исследований.** Результаты опытной работы позволили установить следующее. Среды из непищевого сырья – сыворотки молока оказались высокочувствительными, т.е. давали видимый рост на плотных, в жидких и полужидких средах, в пробирках и чашках Петри при посеве тест-микроорганизмов в разведении 10<sup>-5</sup> и 10<sup>-6</sup>.

Скорость роста на плотных питательных средах в пробирках на скошенном агаре и в чашках Петри характеризовалась появлением визуально определяемых колоний через 15–18 часов инкубации сред в термостате. В жидких и полужидких питательных средах в пробирках видимый рост появлялся после выдерживания их в термостате в течение 10–12 часов, т.е. скорость роста в этих средах была более высокой, чем на плотных питательных средах.

Эффективность жидких питательных сред определяли по концентрации микробных тел спустя 20–24 часа инкубации их в термостате. Концентрация тест-штаммов бактерий, выращенных в жидких средах, представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Концентрация бактерий, выращенных в жидких средах

Среды, содержащие	Наименование тест-штаммов микроорганизмов (ед. оптической плотности)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Corinebacterium diptheroides</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
2% лактопептона	0,30±0,1	0,41±0,2	0,42±0,1	0,29±0,1
3% лактопептона	0,38±0,1	0,43±0,1	0,46±0,1	0,33±0,1
4% лактопептона	0,37±0,2	0,42±0,2	0,45±0,1	0,31±0,2
МГБ (контрольная среда)	0,37±0,2	0,43±0,1	0,46±0,1	0,32±0,2

Данные таблицы 1 свидетельствуют о том, что жидкая среда, содержащая 3% лактопептона, по концентрации бакмассы не уступает контрольной среде, полученной из говяжьего мяса. Среда, содержащая 2% лактопептона, не обеспечивает максимального накопления бактериальных клеток. Среда, содержащая 4% лактопептона, не приводит к интенсификации роста микроорганизмов. Среда, содержащая 3% лактопептона, обладает максимальной ростобеспечивающей способностью, что определило выбор ее при проведении дальнейшей опытной работы, т.е. культивировании производственных штаммов пастерелл.

Из культур каждой среды мы готовили препараты-мазки, окрашивали по Граму и подвергали световой микроскопии. Исследованные тест-штаммы микроорганизмов по тинкториально-морфологическим признакам соответствовали определенному роду и виду, т.е. стафилококки и стрептококки представляли собой грамположительные шаровидные бактерии, коринебактерии и колибактерии – палочковидные бактерии, но коринебактерии были грамположительными, а колибактерии – грамотрицательными.

Пассирование через жидкие питательные среды вызывало незначительную диссоциацию бактерий, что проявлялось образованием на поверхности плотной питательной среды до 7% колоний в R-форме. Бактерии тест-штаммов *S. aureus*, *Str. faecalis*, *C. diptheroides* были не подвижны, а *E. coli* – подвижными. В биохимическом отношении микроорганизмы тест-штаммов были полноценными, т.к. обладали биохимической активностью, присущей видовой принадлежности каждого тест-штамма.

Результаты определения биохимических свойств тест-штаммов бактерий позволяют утверждать, что среды, приготовленные из непищевого сырья – молочной сыворотки, пригодны для культивирования микроорганизмов.

Поэтому следующим этапом нашей работы явилось культивирование пастерелл в средах, приготовленных из сыворотки молока. Штаммы пастерелл выращивали в течение 24 часов. Затем из выращенных культур готовили препараты-мазки, окрашивали по Граму и микроскопировали. В поле зрения светового микроскопа пастереллы представляли собой мелкие овальной формы палочки малинового цвета, располагающиеся одиночно, попарно, короткими цепочками, скоплениями неопределенной формы. В жидкой питательной среде рост пастерелл характеризовался равномерным помутнением среды, образованием незначительного осадка, который при встряхивании пробирки поднимался в виде косички. На поверхности плотной питательной среды пастереллы формировали прозрачные, мелкие, нежные, розинчатые колонии с ровными краями, которые слегка опалесцировали в проходящем свете.

Концентрация пастерелл в опытной среде, содержащей 3% лактопептона, составила в отношении *P. multocida* 656 0,76 ед. оптической плотности, а в контрольной среде из говяжьего мяса – 0,79 ед. оптической плотности. Исходя из этих данных, можно утверждать, что опытная среда обладает практически такой же ростобеспечивающей способностью, что и контрольная среда.

При посеве культуры пастерелл уколом в полужидкий агар наблюдали рост бактерий в виде серо-белого стержня только по уколу, что свидетельствует о неподвижности бактерий.

Сахаролитические свойства пастерелл характеризовались их способностью расщеплять с образованием кислоты без газа глюкозу, сахарозу, маннозу, галактозу, сорбит, маннит.

При определении патогенности оказалось, что мыши, зараженные подкожно бульонной культурой в дозе 0,5 см<sup>3</sup>, погибали в течение 3-4 суток, т.е. культура обладала явной патогенностью.

**Заключение.** В результате проведенной экспериментальной работы нам удалось приготовить путем гидролиза непищевого сырья – сыворотки молока (отход производства сыра и творога) – гидролизаты, которые по биохимическим показателям были равнозначными гидролизатам, получаемым из ценного пищевого продукта – говяжьего мяса.

На основе опытных гидролизатов были приготовлены жидкие, полужидкие и плотные питательные среды, которые использовались для культивирования вакцинных штаммов *P. multocida* 877 и *P. multocida* 656 с последующим определением их биологических свойств. В результате было установлено, что выращенные бактерии по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим и патогенным свойствам соответствовали роду *Pasteurella* и

паспортным данным на эти штаммы. Следовательно, нами доказана возможность приготовления качественных питательных сред из сыворотки молока для культивирования вакцинных штаммов пастерелл.

**Литература.** 1. Булашова, Л. А. Биологические показатели роста тест-штаммов микроорганизмов в среде с лактопептоном / Л. А. Булашова, С. П. Сергеева // Сборник научных трудов / ВГНКИ. – Москва, 1985. – С. 51–54. 2. Вербицкий, А. А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 236 с. 3. Гидролизат белков сыворотки молока для питательных сред клеточных культур / А. П. Простяков [и др.] // Ветеринария. – 1990. – № 7. – С. 67–69. 4. Заерко, В. И. Производство живых вакцин против сальмонеллеза животных на питательных средах из непищевого сырья : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / В. И. Заерко ; Всероссийский государственный НИИ контроля стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – Москва, 1996. – 18 с. 5. Злобина, Ш. И. Использование некондиционных перепелиных яиц для изготовления гидролизата / Ш. И. Злобина, И. А. Ашикбаева, И. М. Миронова // Контроль качества химиотерапевтических препаратов: сборник научных трудов / ВГНКИ. – Москва, 1987. – С. 53–56. 6. Изучение возможности использования гидролизатов, полученных из отходов биопредприятия / Н. А. Ашикбаев [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – 1978. – № 4. – С. 12–13. 7. Использование сыворотки молока в качестве сырья при получении питательных сред для культивирования сальмонелл / А. П. Медведев, В. Н. Алешкевич, С. В. Даровских, В. М. Меньшикова // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2017. – № 1. – С. 29–32. 8. Использование отходов сывороточного производства при культивировании пастерелл / Л. С. Куршудянец [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс-информация. – 1981. – № 5. – С. 31–33. 9. Медведев, А. П. Питательная среда для культивирования пастерелл / А. П. Медведев, В. М. Жаков, А. А. Вербицкий // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2003. – Т. 39, ч. 1. – С. 167–168. 10. О контроле качества ветеринарных биологических препаратов / А. М. Юдашин, А. П. Медведев, А. А. Вербицкий, С. В. Даровских // Ветеринарная медицина Беларуси. – Минск, 2004. – № 2. – С. 4–5. 11. Получение белковых гидролизатов из мяса волов-продуцентов гипериммунных сывороток / А. П. Медведев, Т. С. Воронова, Т. В. Фроленко, И. П. Кулешова // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2002. – Т. 38, ч. 1. – С. 91–92. 12. Лактопептон, его свойства и применение / А. П. Простяков, С. П. Сергеева, Л. А. Булашова // Ветеринария. – 1990. – № 3. – С. 60–62.

Статья передана в печать 18.04.2019 г.

УДК 615.332:616.34-002

#### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРЕПАРАТА «СУЛЬТРИМ 240» ПРИ ГАСТРОЭНТЕРИТАХ МОЛОДНЯКА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

**Голубицкая А.В., Петров В.В., Романова Е.В.**

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

*Приведены результаты применения ветеринарного препарата «Сультрим 240» при заболеваниях желудочно-кишечного тракта у молодняка сельскохозяйственных животных. **Ключевые слова:** гастроэнтерит, диспепсия, абомазоэнтерит, сультрим 240, поросята, телята, ягнята.*

#### **EFFICIENCY OF THE APPLICATION OF THE VETERINARY PREPARATION "SULTIMA 240" AT GASTROENTERITES OF YOUNG ANIMAL ANIMALS**

**Golubitskaja A.V., Petrov V.V., Romanova E.V.**

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republik Belarus

*The results of the use of the veterinary preparation "Sultrim 240" at diseases of the gastrointestinal tract in young farm animals are given. **Keywords:** gastroenteritis, dyspepsia, abomazoenteritis, sultrim 240, piglets, calves, lambs.*

**Введение.** В условиях промышленного животноводства желудочно-кишечные болезни молодняка являются основным фактором, снижающим эффективность работы отрасли. Данная группа болезней является полиэтиологичной, и в большинстве случаев в развитии болезней участвует условно-патогенная и патогенная микрофлора. Сама промышленная технология имеет несколько негативных факторов, а именно «скудность» содержания животных, приготовление и хранение кормов в больших объемах, их перемещения на большие расстояния, интенсификация производства, которые являются факторами риска в возникновении и массовом распространении болезней [4].