

Заключение. Наряду с субкультивированием для длительного гарантированного сохранения целесообразно проводить криоконсервацию штаммов лептоспирозных бактерий.

Для увеличения срока хранения культур лептоспир в замороженном состоянии следует использовать в качестве криопротектора желатин или бутофосфан в оптимально подобранных концентрациях.

Литература 1. Биологически активные соединения бифидобактерий: продукция и свойства / Н.И. Астапович [и др.] Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы III Московского международного нар. конгресса, Москва, 14-18 марта 2005 г. / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. – Москва, 2005. – Ч.2. – С. 82-83. 2. Бланков, Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б.И. Бланков, Д.Л. Клебанов. – М.: Медгиз, 1961. – 263 с. 3. Важинская, И.С. Лиофилизация – эффективный метод длительного хранения дейтеромицетов / И.С. Важинская, А.В. Кантерова // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы междунар. науч. конф., Минск-Раков, 1-2 июня 2006 / НАН Беларуси. Ин-т микробиол.; редкол.: Алещенкова З.М. [и др.]. – Минск, 2006. – С. 26-27. 4. Влияние источника углерода на рост и продукцию гликозидов молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* / В.В. Денисенко [и др.] // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в реальных условиях единого экономического пространства стран содружества: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск-Нарочь, 25-28 мая 2005 г. / Бел. гос. ун-т; сост. и общ. ред. А.Н. Евтушенко. – Минск, 2005. – С. 57-58. 5. Оптимизация защитных сред для хранения актиномицетов в жидком азоте / С.Н. Филиппова [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №4. – С. 573-576. 6. Особенности роста и образования β -галактозидаз бифидобактерий / Н.И. Астапович [и др.] // Микробиология, 2006. – Т. 75. – № 3. – С. 329-333. 7. Щетко, В.А. Сравнительная характеристика активности роста некоторых представителей рода *Bifidobacterium* / В.А. Щетко, Н.А. Головнева, Н.И. Астапович // Вес. Нац. акад. Беларуси: Сер. біял. навук. – 2002. – № 3. – С. 57-61. 8. Dahmen, H. Technique for long-term preservation of Phytopathogenic fungi in liquid nitrogen / H. Dahmen, T. Staub, F.J. Schwinn // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73. – P. 241-246. 9. Daily, W.A. Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen / W.A. Daily, C.E. Higgins // Cryobiology. – 1973. – Vol. 10. – P. 364-367. 10. Declerck, S. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus / S. Declerck, M.G. Angelo-van Coppenolle // New Phytol. – 2000. – Vol. 148. – P. 169-176. 11. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms / Z. Hubalek // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46. – P. 205-229. 12. Hwang, S.-W. Effects of ultralow temperature on the viability of selected fungus strains / S.-W. Hwang // Mycologia. – 1960. – Vol. 52. – P. 527-529. 13. Hwang, S.-W. Investigation of ultralow temperature for fungal cultures I / S.-W. Hwang // Mycologia. – 1968. – Vol. 60. – P. 613-621. 14. Hwang, S.-W. Investigation of ultralow temperature for fungal cultures II / S.-W. Hwang // Mycologia. – 1968. – Vol. 60. – P. 622-626. 15. Inactivation of the stress – and starvation inducible *gls 24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis* / J.-C. Giard A [et al] // J. of Bacteriology. – 2000. – Vol. 182, № 16. – P. 4512-4520. 16. Morris, G.J. A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi / G.J. Morris, D. Smith, G.E. Coulson // J. of General Microbiology. – 1988. – Vol. 134. – P. 2897-2906. 17. Simone, Frank P. Cryopreservation manual / Frank P. Simone. – American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Naige Nunc International Corp. – 1998. – 8 p. 18. Tetsuka, Y. Storage of sporangia of hop and vine downy mildews in liquid nitrogen / Y. Tetsuka, K. Katsuya // Ann. Phytopath. Soc. Jap. – 1983. – Vol. 49. – P. 731-735. 19. Use of Commercially Available Cryogenic Vials for Long-Term Preservation of Dermatophyte Fungi / M. Baker [et al] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 2. – P. 617-618.

Статья передана в печать 23.02.2012 г.

УДК 579.2 579.6:573.6

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ СПОР ДЕРМАТОФИТОВ

Зайцева В.В.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского»,
г. Минск, Республика Беларусь

Разработан состав защитной среды, обеспечивающий сохранение жизнеспособности микроконидий сублимированных грибов дерматофитов до 90,2-95,2 % в течение 24 месяцев хранения.

A protective medium has been developed maintaining up to 90,2-95,2 % of freeze-dried dermatophytes microconidia viable for 24 months.

Введение. Наиболее щадящим способом перевода биопрепарата в сухое состояние принято считать сублимационное высушивание, т.е. высушивание под вакуумом из замороженного состояния. Известны способы консервации микроорганизмов путем их сублимации [1,6].

В настоящее время лиофильное высушивание применяется для всех несовершенных грибов.

При изучении устойчивости микроорганизмов к замораживанию необходимо в первую очередь учитывать действие двух факторов: понижение температуры при замораживании и последующее ее повышение при сублимационном высушивании. При этом важно исключить процесс микроподтаивания продукта, так как процесс оттаивания замороженного материала считается более опасным для микроорганизмов по сравнению с предшествующим охлаждением. Гибель спор зависит от взаимосвязанного влияния минимальной температуры охлаждения, скорости охлаждения и подогрева грибной суспензии, а также от среды суспендирования. Это доказано при замораживании микроорганизмов, принадлежащих к разным систематическим группам и отличающихся разной степенью криорезистентности.

Одной из наиболее распространенных теорий, объясняющих гибель клеток при замораживании, является теория механического повреждения. Считается, что гибель клеток обусловлена воздействием на них крупных кристаллов льда, образующихся вне или внутри клеток при медленном охлаждении.

Предполагается, что степень повреждения клеток снижается по мере увеличения скорости охлаждения и уменьшения величины образующихся кристаллов. При этом наиболее благоприятными условиями считаются такие, при которых вода замерзает в витрифицированном состоянии, т.е. в виде аморфной стекловидной массы. Перевести воду, содержащуюся в биологическом материале, в витрифицированное состояние сложно.

Мицелиальные грибы, которые в природе выживают даже при низких температурах, т.е. в те периоды, когда физические и химические факторы окружающей среды препятствуют росту и обмену веществ, обладают особыми свойствами, позволяющими им выжить при экстремальных температурах, и в первую очередь это способность образовывать споры.

Для гарантии длительного сохранения жизнеспособности и свойств культур грибов необходимо создать такие условия, которые обеспечивали бы оптимальную стабилизацию и замедление метаболических процессов в клетках.

Для защиты культур грибов при замораживании, используют те же протекторы, что и для бактерий, вирусов.

С положительным результатом в качестве защитной среды используют мясопептонный бульон, 20 % сыроворотку крови животных, молочно-лактозосахарозную смесь, обезжиренное молоко, глицериновый буфер с добавлением пептона, 10 % пептон [4,5].

Мохина Т.Н. для сублимации грибов использовала среду следующего состава: сахароза – 10%, желатин – 1,5 %, вода - остальное [3].

Указанные защитные среды не лишены недостатков, так как обеспечивают сохранение жизнеспособности спор дерматофитов на 35-42 % через 12 месяцев хранения. Это приводит к снижению активности противогрибковых вакцин.

Показана зависимость резистентности клеток от температуры и pH защитной среды [2,8]. Авторы отмечают, что клетки, культивируемые при более низких относительно оптимума температурах, адаптируются и становятся более устойчивыми при последующей консервации. Механизм холодовой адаптации заключается в возрастании в мембранах клеток процентного соотношения ненасыщенных жирных кислот.

Наряду с подбором криопротекторов необходимо определить оптимальные методы проведения криоконсервации, учитывая особенности объекта.

Известно, что процесс регидратации, которому подвергаются клетки на стадиях контакта со средой высушивания и при лиофилизации, приводит к изменению ультраструктуры клеток. Причем при неправильно подобранной рецептуре среды или отклонении режима высушивания от оптимального для данной культуры, такие изменения могут стать необратимыми и привести к массовой гибели клеток, а следовательно, и снижению иммунной активности препарата.

Важно также, чтобы культура микроорганизмов не только оставалась живой, но исключалась селекция форм, имеющих существенные отличия от исходного материала.

Цель исследований - подобрать оптимальный состав защитной среды для каждого штамма гриба трихофитон.

Для достижения данной цели необходимо решить следующие задачи:

- разработать защитную среду для эффективной защиты микроконидий;
- изучить повреждение спор и их репарацию после сублимации;

-исследовать индивидуальную устойчивость культур гриба к процессу сублимации и эффективность защиты.

Задачей настоящих исследований, в частности, являлась разработка защитной среды для эффективной защиты микроконидий гриба трихофитон.

Материалы и методы исследований. Криопротекторами принято называть вещества, которые при их добавлении в суспензию клеток обладают способностью повышать их устойчивость к криоповреждению, увеличивать их выживаемость. Несмотря на то, что криопротекторы являются предметом многочисленных исследований во всем мире на протяжении более чем пятидесяти лет, механизм их действия окончательно не установлен. Среди наиболее вероятных приводятся следующие:

- подавление возрастания концентрации солей в растворах;
- снижение поражения поверхности клеток при дегидратации;
- уменьшение количества кристаллов образовавшегося внутри клетки льда.

Для криопротекторов внутриклеточного действия важно определение отрезка времени после смешивания с бактериальной суспензией, необходимого для эффективного проникновения протектора в клетку. Этот отрезок времени называется эквilibрацией. Если время эквilibрации слишком велико, это, как правило, приводит к токсическому действию криопротектора на микроорганизм.

Оптимальное время эквilibрации устанавливается эмпирически для каждого вида клеток [7].

Состав криопротекторов должен быть таким, чтобы не требовалось их удаления из клеточной суспензии перед использованием в ветеринарной практике.

Перед сублимацией культуры гриба должны быть выращены на оптимальной питательной среде до зрелой стадии развития, поскольку плохо развитый мицелий не выдерживает воздействия низких температур.

Необходимо выбрать наиболее подходящий график сублимации. В результате такой оптимизации факторов культуры грибов могут сохраняться длительное время без морфологических, физиологических и генетических изменений.

Для проведения исследований было изготовлено 8 вариантов защитных сред для сублимационного высушивания дерматофитов.

Вариант 1. Готовили путем смешивания белковой основы и защитной композиции при соотношении компонентов, масс. %: сухое молоко - 4,0, желатин - 1,0, защитная композиция – остальное.

Защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 0,8, сахароза - 26,0, вода – остальное.

Вариант 2. Готовили аналогично варианту 1, но вместо воды использовали 10 %-ный раствор ЛПС-Ф *Salmonella dublin*.

Вариант 3. Защитную среду готовили путем смешивания ингредиентов в соотношении, масс. %: сухое молоко - 8,0, желатин - 1,0, защитная композиция – остальное.

Защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 1,4, сахароза - 33,0, вода – остальное.

Вариант 4. Защитную среду готовили путем смешивания ингредиентов в соотношении, масс. %: сухое молоко - 9,0, желатин - 1,0, защитная композиция – остальное.

Защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 1,6, сахароза - 35,0, вода – остальное.

Вариант 5. Защитную среду готовили путем смешивания ингредиентов в соотношении, масс. %: сухое молоко - 3,0, желатин - 0,5, защитная композиция – остальное.

Защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 0,5, сахароза - 20,0, вода – остальное.

Вариант 6. Готовили аналогично варианту 1, но защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 0,8, сахароза - 33,0, 10 % раствор ЛПС-Ф Salmonella Dublin – остальное.

Вариант 7. Готовили аналогично варианту 1, но защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 1,25, сахароза - 30,0, вода – остальное.

Вариант 8 (контроль). Готовили путем смешивания ингредиентов в соотношении, масс. %: желатин - 2,0, сахароза - 10,0, вода – остальное.

Таблица 1 - Влияние состава защитной среды на выживаемость микроконидий в сухой живой вакцине

№ варианта защитной среды	Количество живых микроконидий в см ³				Общее количество микроконидий в см ³ культуры			
	при изготовлении		через 24 мес.		при изготовлении		через 24 мес.	
	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%
1	232±1,5	100,0	214,0±2,5	92,0	240,7±1,5	100,0	226±2,0	93,9
2	228,0±2,0	100,0	212,0±1,0	93,0	238,3±1,5	100,0	225,6±2,0	94,7
3	235,7±2,5	100,0	224,3±2,5	95,2	244±2,0	100,0	238,3±1,5	97,7
4	227,0±2,0	100,0	204,7±3,5	90,2	239,0±2,5	100,0	224,7±2,0	94,0
5	223,0±2,0	100,0	151,7±4,0	68,0	237,0±2,0	100,0	205,7±2,0	86,8
6	236,0±2,5	100,0	222,0±2,0	94,1	244,3±2,5	100,0	237,0±3,0	97,0
7	228,0±3,5	100,0	212,0±2,5	93,0	237,0±2,0	100,0	231,0±3,5	97,5
8	228,7±2,0	100,0	153,7±4,5	67,2	241,7±2,0	100,0	211,7±2,0	87,6

Сухие культуры ресуспендировали растворителем следующего состава, %: 1,0 % раствор ЛПС-Ф О антигена бактерий Salmonella Dublin - 10,0, экстракт дрожжевой - 1,0, натрия хлорид - 0,9, вода – остальное.

При изучении влияния соотношения грибной суспензии и защитной среды использовали следующую защитную среду, %: сухое молоко - 4,0, желатин - 1,0, защитная композиция – остальное.

Защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 0,8, сахароза - 26,0, вода – остальное.

Защитную среду и культуру грибов смешивали в соотношениях 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5. Смеси культур гриба и среды фасовали по 5,0 см³ во флаконы емкостью 10,0 см³ и направляли на сублимационное высушивание.

В заключительном опыте стояла задача выяснить влияние pH защитной среды на жизнеспособность микроконидий. Защитную среду варианта 1 готовили с pH 6,0; 6,5; 7,0 и 7,5. Образцы серий вакцины хранили при температуре +4-8°C в течение 12 месяцев.

Результаты исследований. Из всех представителей микробного мира мицелиальные грибы имеют наибольшее видовое разнообразие со всей огромной совокупностью морфологических, физиологических и биохимических свойств. Как и все микроорганизмы, они являются сложными гетерогенными объектами, в которых переносы массы и энергии обусловлены как физико-химической структурой веществ, так и взаимосвязью биохимических и биофизических превращений.

При определении влияния состава защитной среды на жизнеспособность спор в процессе хранения 24 серий опытных образцов, сублимированных препаратом, установлено, что гибель живых спор происходит интенсивнее, чем уменьшение общего количества микроконидий.

Оба показателя существенно уменьшились в образцах препаратов, сублимированных в средах, приготовленных по вариантам 5 и 6, что отражено в таблице 1.

В данных образцах отмечалось снижение жизнеспособности спор на 32,0-32,8 % спустя 24 месяцев.

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что наиболее высокая защита спор установлена в образцах грибов, сублимированных с защитными средами, приготовленными по вариантам № 1, 2, 3, 6 и 7.

Следует указать, что кроме состава среды на жизнеспособность спор грибов оказывает влияние ее соотношение с грибной суспензией. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Влияние соотношения защитной среды и суспензии гриба на выживаемость микроконидий

Соотношение защитной среды и суспензии гриба	Количество живых микроконидий в см ³				Общее количество микроконидий в см ³ культуры			
	при изготовлении		через 24 мес.		При изготовлении		через 24 мес.	
	млн/см ³	%	млн/см ³	%	Млн/см ³	%	млн/см ³	%
1:5	228,0±2,0	100,0	212,0±1,0	93,0	238,3±1,5	100,0	225,6±2,0	4,7
1:4	230,3±2,5	100,0	186,3±3,0	80,9	244,3±2,5	100,0	232,0±2,5	5,2
1:3	229,0±2,0	100,0	190,0±3,5	83,0	241,0±2,0	100,0	222,3±2,5	2,3
1:2	227,7±3,5	100,0	121,0±2,0	53,0	243,3±4,0	100,0	201,0±2,5	2,6
1:1	225,3±3,5	100,0	86,6±3,0	38,5	242,0±3,5	100,0	206,3±2,5	5,3

Как видно из материалов таблицы 2, наиболее предпочтительно смешивать грибную культуру с защитной средой в соотношении 4:1, что обеспечивает жизнеспособность спор на 93,0 %. Наиболее низкое сохранение жизнеспособности спор выявлено при соотношении грибной суспензии и среды 1:1 и 1:2 (т.к. жизнеспособность составила соответственно 38,5 % и 53,0 %). При соотношении компонентов 1:3 и 1:5 жизнеспособность спор составила 80,9-83,0.

При определении влияния pH защитной среды на жизнеспособность спор в процессе хранения 12 опытных образцов, сублимированных препаратом, путем смешивания защитной среды № 2 с культурой гриба в соотношении 1:3 установлено, что гибель живых грибных клеток происходит интенсивнее, чем уменьшение общего количества микроконидий. Оба показателя существенно уменьшались в образцах с pH 7,0-7,5. Так в образцах защитных сред с pH 7,0-7,5 наблюдалось снижение числа живых грибных клеток спустя 12 месяцев хранения на 35,8-44,0 % по сравнению с исходным. В образцах защитных сред с pH 6,0-6,5 сохранилось 82,0-80,6 %.

Таблица 3 - Динамика изменения общего количества микроконидий и живых грибных клеток в препарате в процессе хранения в зависимости от pH защитной среды, в %

pH защитной среды	Количество живых грибных клеток				Общее количество микроконидий			
	при изготовлении	через 3 мес.	через 6 мес.	через 12 мес.	при изготовлении	через 3 мес.	через 6 мес.	через 12 мес.
6,0	100	100	94,2±1,4	82,0±2,2	100	100	100	92,2±2,1
6,5	100	100	91,4±1,2	80,6±1,6	100	100	100	96,3±2,5
7,0	100	100	82,0±3,2	64,2±2,1	100	100	100	88,0±3,2
7,5	100	100	76,2±1,8	54,0±1,4	100	100	100	86,2±2,0

Таким образом, как видно из данных таблицы 3, в образцах препаратов, приготовленных с использованием защитных сред с pH 7,0-7,5, уменьшение количества живых грибных клеток происходит интенсивнее, нежели в препаратах с более низким pH.

Заключение. Таким образом, разработан состав защитной среды, обеспечивающий сохранение жизнеспособности микроконидий сублимированных грибов дерматофитов до 90,2-95,2 % в течение 24 месяцев хранения.

Подбор оптимального соотношения защитной среды и грибной культуры (1:4) позволило сохранить жизнеспособность микроконидий на 93,0 %.

Наилучшие показатели сохранения живых микроконидий дерматофитов отмечены при использовании защитной среды с pH 6,0-6,5.

Литература. 1. Звягин, И.В. Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных биологических препаратов / И.В. Звягин // Экспресс-информация института / Всесоюз. науч.-исслед. и технолог. ин-т биол. промышл. – М., 1978. – Вып. 7. – С. 3-16. 2. Influence of growth temperature on cryotolerance and lipid composition of *Lactobacillus acidophilus*/M.L. Fernandez Murga [et. al.]/ *Applied Microbiology*. – 2000. – Vol. 88. – P. 342-348. 3. Мохина, Т.Н. Изучение реактивации лиофилизированной культуры *Trichophyton verrucosum* Bodin, 1902 // Сб. науч. трудов. – М., 1982. – С. 75. 4. Рубченко, П.Н. Выживаемость пастерелл штамма К после регидратации и в аэрозольном состоянии // *Ветеринария*. – 1985. – № 1. – С. 36. 5. Сидоров, М.А. Реактивация лиофилизированных культур возбудителя рожи свиней / М.А. Сидоров, М.С. Джубандыкова // *Ветеринария*. – 1974. – №2. – С. 46-47. 6. Ситьков, В.И. Научные и практические основы промышленного производства и применения вакцин: Дисс. ... д-ра вет. наук / В.И. Ситьков. – М., 1997. – 29 с. 7. Simione, Frank P. *Criopreservation manual*/ Frank P. Simione.- American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nune International Corp. – 1998. – 8 p. 8. Fermentation pH and Temperature infenence the Cryotocerance of *Lactobacillus acidophilus* RD 758/ Y. Wang [et. al.]/ *J. Dairy Sci.* – 2005.- Vol. 88.-P. 21-29.

Статья передана в печать 28.02.2012 г.

УДК 619:616.98:578.823.2:636.5.053

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, БИОХИМИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ЦЫПЛЯТ-БРОЙЛЕРОВ ПРИ РЕОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Лазовская Н.О.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

В данной статье описаны морфологические, биохимические и серологические показатели в органах и тканях цыплят-бройлеров при реовирусной инфекции.

This article describes the morphological, biochemical and serum parameters in organs and tissues of broiler chickens during reovirus infection.

Введение. При современном интенсивном ведении птицеводства очень пристальное внимание необходимо уделять целому ряду вопросов, связанному, во-первых, со входным контролем сырья и кормов, поступающих на фабрику, во-вторых, с правильным и своевременным проведением всех ветеринарно-санитарных мероприятий (начиная от соблюдения сроков санитарных разрывов и заканчивая действующей программой биологи-