

УДК 576.34

ПИТАТЕЛЬНЫЕ СРЕДЫ И ГЛУБИННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ**Медведев А.П., Меньшикова В.М.**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье приведены основные сведения о питательных средах для микроорганизмов и периодическом культивировании производственных штаммов сальмонелл и пастерелл в реакторах.

The article contains the data about media for microorganisms and periodical cultivation of Salmonella, Pasteurella strains in reactors.

Ключевые слова: питательные среды, культивирование, выживаемость, концентрация, сальмонеллы, реакторы, рост, пастереллы.

Keywords: media, cultivation, viability, concentration, salmonella, pasteurilla, reactors, growth.

Введение. Пищей принято называть любое вещество, служащее для организма источником энергии или пластическим материалом. Животные, человек, простейшие способны заглатывать пищу, которая подвергается перевариванию под действием гидролитических ферментов в желудочно-кишечном тракте (у многоклеточных) или во внутриклеточных пищеварительных вакуолях (у простейших). Такой способ питания получил название голозойного.

Микроорганизмы не имеют пищеварительных органов или органелл. Они используют питательные вещества в виде относительно небольших молекул в водном растворе. Этот способ питания, присущий микробам и растениям, называют галофильным.

Потребности различных бактерий в питательных веществах весьма различны. Некоторые из них получают необходимый углерод из углекислоты или карбонатов и не нуждаются в углеводах и белках. Такие микроорганизмы получили название - автотрофы.

Многие виды микробов нуждаются в сложных органических соединениях, из которых они черпают углерод и азот, необходимый для синтеза клеточных структур. Такие микроорганизмы называют – гетеротрофными. К гетеротрофам относят всех патогенов, вызывающих у животных и человека инфекционные болезни.

Известно, что возбудителей инфекционных болезней, за исключением облигатных внутриклеточных (хламидии, риккетсии), культивируют на питательных средах. Выращивание осуществляют для получения микробной массы с научно-исследовательской целью (изучение химического состава бактерий, их физиологии, генетики и т.д.). Постановка лабораторного диагноза при различных инфекционных болезнях диктует сугубо практическую необходимость выделения чистой культуры и ее идентификации. Для этого нужны качественные питательные среды. Среда необходима для санитарно-бактериологического исследования воды, воздуха, почвы, кормов, пищевых продуктов и других целей.

Особую значимость имеют питательные среды при производстве ветеринарных биологи-

ческих препаратов: вакцин, гипериммунных сывороток, иммуноглобулинов, анатоксинов, диагностических антигенов и т.д.

Индивидуальные потребности отдельных видов микроорганизмов крайне многообразны. Поэтому приготовление универсальной питательной среды для всех видов микробов является невозможным, но к питательным средам предъявляются определенные общие требования.

Все питательные среды должны содержать необходимые для жизнедеятельности микробов питательные вещества (белки, углеводы, микроэлементы, витамины и др.). Питательные среды, как самостоятельно изготавливаемые в лабораториях, так и выпускаемые централизованно (сухие питательные среды), имеют в своей основе вещества, содержащие азот. В качестве азотистого субстрата служат в основном белки животного происхождения – мясо (чаще всего), рыба, мясокостная мука, кровяные сгустки и т.д. Питательные среды должны быть изотоническими, обладать буферностью, быть влажными, стерильными, иметь определенную концентрацию водородных ионов (рН). Этот показатель при 7,2-7,4 является оптимальным при культивировании большинства патогенных микроорганизмов.

К средам, применяемым для производства бактериальных препаратов (производственным) предъявляются дополнительные требования по сравнению с обычными. Эти среды должны быть по возможности воспроизводимыми, свободными от балластных веществ, дешевыми, относительно простыми в изготовлении, содержащими полный набор питательных веществ.

Производство ветеринарных препаратов возникло и развивалось с применением мясных питательных сред, которые не утратили своего значения до настоящего времени при глубинном методе выращивания бактерий.

Впервые глубинный метод выращивания патогенных бактерий был апробирован Н.Е. Лебедевым (1950). Автор доказал возможность культивирования бактерий семейства Enterobacteriaceae в реакторах с применением принуди-

тельной аэрации растущей культуры и ее перемешивания.

В условиях производства выращивание патогенов, как правило, осуществляется в жидкой питательной среде в реакторах с использованием периодического способа культивирования. Динамику роста бактерий и их размножение при периодическом культивировании подразделяют на несколько фаз: лаг-фазу, логарифмического роста, фазу стационарного роста и гибели бактерий.

Известно, что количество жизнеспособных клеток при периодическом культивировании не остается постоянным, а значительно варьирует в зависимости от фаз роста и длительности выращивания.

Материалы и методы исследований. В опытной работе использовали питательные среды из непищевого сырья (мясо волов-продукторов гипериммунных сывороток), О- и Н-агглютинирующие сальмонеллезные сыворотки, производственные штаммы сальмонелл: *S. choleraesuis* 370, *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371, *S. abortusovis* 372 и пастерелл: *P. multocida* 656, 798,877, реакторы для культивирования бактерий.

Для выращивания сальмонелл и пастерелл применяли бульон Хоттингера, приготовленный из перевара Хоттингера. Перевар готовили из мяса волов-продукторов гипериммунных сывороток. Мясо пропускали через мясорубку и на 1 кг фарша добавляли 1,5 литра дистиллированной воды, подогретой до 40-42° С. Смесь перемешивали и подщелачивали 10%-ным раствором едкого натрия гидроксида до pH 7,8-8,0. На 1 литр смеси добавляли 150-200 г. очищенной от оболочек и измельченной на мясорубке поджелудочной железы крупного рогатого скота и 80 см³ химически чистого хлороформа. Гидролиз смеси вели в течение 5 суток, а затем из перевара готовили бульон Хоттингера по следующей методике.

Прозрачную жидкость гидролизата разводили дистиллированной водой до содержания в бульоне 280-300 мг% аминного азота, добавляли 0,2-0,5% пептона, 0,5% поваренной соли, 0,3% химически чистого двуосновного фосфорнокислого натрия и 10% воды на выкипание. В процессе кипячения устанавливали pH среды 7,8-8,0, кипятили ее в течение часа и оставляли для остывания на 1-2 часа, затем фильтровали через ватно-марлевый фильтр и стерилизовали при 120°С 45-50 минут.

Из непищевого сырья нам удалось приготовить жидкую питательную среду (бульон Хоттингера), отвечающую необходимым требованиям и пригодную для культивирования сальмонелл и пастерелл, т.к. гидролизат из непищевого сырья характеризовался следующими биохимическими показателями: общего азота 800-1200 мг%, аминного азота – 700-900 мг%, триптофана – 150-200 мг%.

Кроме этого, в опытной работе применяли общепринятые в микробиологической практике микроскопические, бактериологические и серологические методы исследований.

Результаты исследований. Ознакомившись с доступной литературой по вопросу глубинного культивирования микроорганизмов, мы решили изучить динамику роста бактерий *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis* и *P. multocida* при выращивании их в производственных реакторах на приготовленной нами среде из непищевого сырья.

Культивирование сальмонелл осуществляли в реакторах, оснащенных механической мешалкой, снабженных подачей стерильного воздуха, терморегуляторами. Общий объем питательной среды (бульон Хоттингера) в реакторе составлял 150 литров. Для засева использовали выращенную в баллонах, адаптированную к питательной среде культуру сальмонелл из расчета 10-12 литров на реактор. Культуры в баллонах выращивали в течение 10 часов при 37-38°С, перемешивая через каждые два часа. Концентрация живых микроорганизмов в среде составила для *S. choleraesuis* – 74%, *S. dublin* – 72%, *S. typhimurium* -79%, *S. abortusovis* – 60% от общего количества бактерий, выращенных в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера).

Каждый серотип сальмонелл культивировали в отдельном реакторе. Условия роста характеризовались следующими показателями: температура 37±0,5°С, pH 7,4±0,2, скорость вращения механической мешалки - 120 об/мин., интенсивность аэрации – 500 см³ воздуха на 1 литр среды в 1 минуту. Концентрацию микробных клеток определяли с помощью стандарта мутности, а жизнеспособность сальмонелл – путем титрования и высева на мясопептонный агар в чашках Петри.

В результате 16-ти часового выращивания сальмонелл концентрация микробных тел в 1 см³ среды составила для *S. choleraesuis* – 27 млрд, *S. dublin* – 23 млрд, *S. typhimurium* – 25 млрд, *S. abortusovis* - 12 млрд. Повышение концентрации микробных тел зарегистрировано через 4 часа от начала выращивания сальмонелл в реакторах, т.е. продолжительность лаг-фазы не превышает 4-х часов. Затем, через 6, 8 и 10 часов с момента засева бактерий в реакторы, концентрация их интенсивно нарастала. Так, через 6 часов количество микробных тел *S. choleraesuis* достигло 5 млрд/ см³, 8 часов – 10 млрд/см³, 10 часов - 20 млрд/см³, 12 часов - 25 млрд/см³, а к концу процесса культивирования – 27 млрд/см³. Примерно такая же динамика нарастания концентрации микробных тел наблюдается в отношении *S. dublin*, *S. typhimurium*, за исключением *S. abortusovis*. Рост этих сальмонелл был менее интенсивным, и их количество, спустя 6 часов от момента засева в реактор, составило 5 млрд.м.т., 8 часов - 7 млрд.м.т., 10 часов - 10 млрд.м.т., 12 часов - 12 млрд.м.т. в 1 см³ и до конца культивирования концентрация бактерий не увеличилась.

Выживаемость сальмонелл характеризовалась следующими цифрами. В фазе логарифмического роста количество жизнеспособных бактерий *S. choleraesuis* составило 94%, *S. dublin* - 98%, *S. typhimurium* - 95%, *S. abortusovis* - 97%, в фазе стационарного роста их выживаемость снизилась и составила 85%, 87%, 80% и 91%, соответственно, для каждого сероварианта сальмонелл.

Следовательно, выживаемость сальмонелл в стационарной фазе роста снижается, что является свидетельством истощения питательных веществ в среде, накопления в ней продуктов метаболизма бактерий и их гибели. Уровень концентрации сальмонелл в конце роста определяется общей массой как жизнеспособных, так и погибших клеток.

При производстве противопастереллезных биопрепаратов большое значение придается получению качественной микробной массы. Наиболее технологичным методом культивирования пастерелл является выращивание их в жидкой питательной среде. Вакцинные препараты против пастереллеза готовят из культур, выращенных глубинным способом. Поэтому мы решили изучить динамику роста пастерелл при их глубинном культивировании. В результате опытной работы установили следующее.

Нами было выявлено, что лаг-фаза длится 5 часов, затем наступает логарифмическая фаза роста пастерелл, которая продолжается до 9 часов. К этому времени концентрация пастерелл штамма 656 достигает 8 млрд.м. т./см³, штаммов 798 и 877 - 10 млрд.м. т./см³. В конце логарифмической фазы роста происходит уменьшение количества жизнеспособных клеток, а в стационарной фазе оно снижается на 6,8% к 16 часам культивирования по сравнению с выживаемостью 8-ми часовой культуры, равной 95,4%.

При изучении морфологии пастерелл установлено, что в логарифмической фазе роста, длящейся до 5-6 часов, наблюдается разнородная культура, представленная набухшими палочками разной величины. В последующие часы роста культура становится однородной в виде мелких палочек. По мере старения культуры палочки уменьшаются в размере, приобретая форму овоидов. Культуральные свойства пастерелл в течение всего процесса выращивания остаются типичными для рода *Pasteurella*.

Параметры глубинного культивирования в процессе роста пастерелл характеризовались следующими данными. В процессе культивирования температура растущей культуры поддерживалась в пределах 36-37 ± 0,5°C. Скорость вращения мешалки была постоянной - 160 об/мин. Парциальное давление растворенного в культуральной жидкости кислорода (рО₂) перед засевом было близким к 100%, затем через 10-15 мин. наблюдалось интенсивное потребление кислорода и к 3-му часу оно уменьшалось практически до 0,2%.

Через 2 часа культивирования подавали воздух на аэрацию, расход которого с этого момента оставался постоянным и составлял 12,5 литров в минуту (2,5 объема воздуха на 1 объем растущей культуры в минуту). Уровень рО₂ при подаче воздуха увеличивался до 100% и не изменялся до 4-го часа после начала выращивания микроорганизмов. По мере увеличения концентрации пастерелл, скорость потребления кислорода превышала скорость его поступления, и уровень рО₂ падал до 10% и ниже. С уменьшением интенсивности роста пастерелл (к 9 часу культивирования) уровень рО₂ увеличивался до 100% и оставался таковым до окончания процесса выращивания.

Опыт культивирования пастерелл показал, что наблюдается связь изменения окислительно-восстановительного потенциала (еН) с изменением рО₂, причем при уменьшении рО₂ до 7-10% скорость снижения еН увеличивается. Указанные изменения наблюдаются в фазе логарифмического роста микроорганизмов и, по нашему мнению, тесно связаны с интенсивным потреблением кислорода жизнеспособными клетками.

Концентрация ионов водорода (рН), равная 7,6, практически не менялась в течение первых 5 часов культивирования, затем постепенно снижалась к 8-9 часу, что соответствует продолжительности логарифмической фазы роста, а при переходе роста пастерелл в стационарную фазу, рН культуры постепенно увеличивалась и к концу культивирования значение рН составило 7,4.

В процессе культивирования пастерелл дважды (через 2 и 6 часов) добавляли глюкозу в количестве 0,1%. Интенсивное потребление глюкозы наблюдали в фазе логарифмического роста, особенно в первые 8 часов, т.е. при наличии наибольшего количества жизнеспособных клеток. При снижении количества живых клеток в стационарной фазе роста заметного потребления глюкозы не наблюдали.

Заключение. Нами приготовлена пригодная для выращивания бактерий жидкая питательная среда из непищевого сырья. Определены оптимальные параметры выращивания сальмонелл в реакторах и изучена динамика роста бактерий при глубинном культивировании.

Изучена динамика роста пастерелл при их глубинном культивировании. Доказано, что окислительно - восстановительные условия растущей культуры являются непостоянными. Показана тесная зависимость рО₂ с окислительно-восстановительным потенциалом и необходимость оптимизации процесса культивирования по основным параметрам: рН, еН, рО₂, количеству добавляемой глюкозы.

Литература. 1. *Практикум по частной микробиологии: Учебное пособие / А.А. Солонко [и др.]; Под ред. А.А. Гласкович – Минск: Урожай, 2000. - 250с.* 2. *Практикум по общей микробиологии: Учебное пособие / А.А. Солонко [и др.]; Под ред. А.А. Гласкович – Минск: Урожай, 2000. - 280с.* 3. *Микробиология и иммунология. / А.А. Воробьева, [и др.] – Минск: Медици-*

на, 1999. - 463с. 4. Заерко, В.И. Разработка и внедрение универсальной технологии изготовления, контроля и применения, вакцин против пастереллёза животных. Диссертация в форме научного доклада на соискание доктора ветеринарных наук. - Минск, 2000. - 47с. 5. Имшенецкий, А.А. Возможность обна-

ружения «нуклидов» в клетках бактерий в зависимости от возраста культур. / А.А. Имшенецкий, Г.К. Жильцов. // Микробиология. - 1968. - Т.3. - С 305-312.

Статья передана в печать 17.09.2015г.

УДК 619:616.98:578.842.1 (476)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПОДХОД К ПРОБЛЕМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Морозов Д.Д.

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

В статье отражены современные взгляды международных экспертов на африканскую чуму свиней и приведены подходы к профилактике и ликвидации заболевания, согласно международным стандартам. Представлены сведения о проекте международной технической помощи ФАО Республике Беларусь по борьбе с АЧС.

In the article the up to date international experts' opinions on ASF and approaches for prevention and eradication of ASF in compliance with the international standards have been presented. The data on FAO international technical assistance to the Republic of Belarus to eradicate ASF outbreaks have been stated.

Ключевые слова: ФАО, МЭБ, африканская чума свиней, профилактика, ликвидация, биобезопасность, дикие свиньи.

Keywords: FAO, OIE, African swine fever, prevention, eradication, biosecurity, wild boars.

За последнее время количество стран и масштабы территорий, где были зарегистрированы вспышки африканской чумы свиней, значительно расширились. Все прогнозы, ранее составляемые ветеринарными экспертами разных стран, идут по самому пессимистическому сценарию. В 2013 году с проблемой столкнулась Республика Беларусь, а в 2014 году вирус пересек границу ЕС и закрепился в странах Балтийского региона, вызвав вспышки заболевания и гибель как в популяции диких кабанов, так и у домашних свиней [1].

Озабоченность мирового ветеринарного сообщества этой проблемой выразилась тем, что только за последние 1,5 года прошло беспрецедентное количество международных встреч в целом по трансграничным болезням животных, и АЧС в частности. Наиболее важными из них являются: создание Глобальной платформы по АЧС под эгидой ФАО/МЭБ/ЕС/USAID, Глобального научно-исследовательского альянса по АЧС - GARA, реализация международного проекта ASFORCE с колоссальным бюджетом, финансируемого Еврокомиссией, проект МАГАТЭ по новейшим методам лабораторной диагностики, ряд международных встреч в штаб-квартире МЭБ и ФАО, создание постоянно действующей международной группы экспертов по Восточной Европе GF-TADs и ее регулярные встречи на территории стран, где были отмечены вспышки. Научный и консультативный орган ЕС – Европейское агентство по безопасности

пищевой продукции – EFSA провел несколько встреч рабочих групп экспертов разных стран по оценке рисков распространения вируса на Европейском континенте и роли диких кабанов в этом процессе. После всех этих мероприятий информация публикуется, обсуждается в компетентных кругах, используется в качестве научного взгляда и применяется в современном международном ветеринарном законодательстве [3]. Отдельное направление работы по теме африканской чумы свиней - это реализация проектов международной технической помощи под эгидой ФАО в странах, где были отмечены вспышки АЧС.

У АЧС имеется очень большой трансграничный потенциал, т.к. в настоящее время огромен масштаб глобальной торговли продуктами животного происхождения, куда подключено большое количество стран, включая Беларусь, кроме того, во многих странах все еще имеет место нелегальная торговля инфицированными продуктами свиноводства. Вирус АЧС способен преодолевать расстояния в сотни и тысячи километров от первоначального источника, беспрепятственно пересекать границы сопредельных государств.

Особое значение эта болезнь приобретает в странах с развитым свиноводством и, особенно, экспортирующих свинину. Страна, имеющая на своей территории вспышки АЧС, выключается из экспортного рынка свинины и несет как прямые, так и косвенные потери. Там же, где свиноводство на-