

:Агропромиздат, 1990. – 239 с. 12. Справочник врача ветеринарной медицины / С. С. Абрамов [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Минск : Техноперспектива, 2007. – 971 с. 13. Фармакология : учебник для студентов вузов, обучающихся по специальности «Ветеринария» / В. Д. Соколов [и др.] ; ред. В. Д. Соколов. – 4-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2013. – 575 с. 14. Ятусевич, А. И. Паразитология и инвазионные болезни животных : учебник для студентов вузов по специальности «Ветеринарная медицина» / А. И. Ятусевич, Н. Ф. Карасев, М. В. Якубовский ; ред. А. И. Ятусевич. – 2-е изд., доп. и перераб. – Минск : ИВЦ Минфина, 2007. – 580 с.

Статья передана в печать 23.08.2017 г.

УДК 619:579.017.8:579.842.14

ПОЛУЧЕНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ ИЗ ДЕШЕВОГО БЕЛОКСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

*Медведев А.П., *Вербицкий А.А., *Огурцова К.А., **Кулешов Д.Б.

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

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

*В статье представлены результаты получения питательных сред для сальмонелл из дешевого белоксодержащего сырья — продукции птицепредприятий - куриных голов и показана возможность выращивания бактерий на этих средах без изменения их биологических свойств. **Ключевые слова:** сальмонеллы, куриные головы, питательные среды, штаммы, бактерии, гидролиз, биологические свойства.*

DEVELOPING MEDIA FOR CULTIVATION OF SALMONELLAE USING CHEAP PROTEIN-CONTAINING SUBSTANCES

*Medvedev A.P., *Verbitskij A.A., *Ogurtsova K.A., **Kuleshov D.B.

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

**OJCM «BelVitinipharm», Vitebsk, Republic of Belarus

*The article presents data on developing media for salmonellae bacteria using a cheap protein — containing substrate from poultry industry and demonstrates possibility of bacteria growth on this media without change of their biological properties. **Keywords:** salmonellae, chicken heads, nutrient media, strains, bacteria, hydrolysis, biological properties.*

Введение. Сальмонеллез — инфекционная болезнь, вызываемая бактериями из рода *Salmonella*, характеризующаяся разнообразными клиническими проявлениями — повышением температуры тела, энтеритом, бронхопневмонией, артритом, коликами, параличами, абортацией.

Сальмонеллезом болеет преимущественно молодняк сельскохозяйственных животных. Сальмонеллы могут поражать и человека, у которого болезнь проявляется в виде токсикоинфекции.

Сальмонеллез широко распространен во всех странах мира, а также в хозяйствах нашей страны и представляет собой сложную ветеринарную и медицинскую проблему. Несмотря на постоянное совершенствование ветеринарно-санитарных мероприятий и технологии ведения животноводства, применение разнообразных лечебно-профилактических препаратов, эта болезнь пока еще не ликвидирована и наносит значительный экономический ущерб.

По мнению ветеринарных и медицинских специалистов, экспертов ВОЗ, самыми действенными препаратами в борьбе с сальмонеллезом являются специфические средства: вакцины, сыворотки, иммуноглобулины, бактериофаги. Однако, для их приготовления необходимы качественные питательные среды, особенно жидкие, в больших объемах.

Следует отметить, что питательные среды без преувеличения могут считаться важными компонентами микробиологических исследований. Современная микробиология без питательных сред существовать и развиваться не может. В настоящее время известно с учетом модификаций более 5000 их прописей.

Питательные среды нужны для изучения физиологических свойств микробов, выделения из биосубстратов чистой культуры бактерий и ее идентификации, хранения и поддержания ценных производственных и музейных штаммов, санитарно-бактериологической оценки воды, продуктов питания для людей, кормов для животных. Питательные среды необходимы для приготовления многочисленных лечебно-профилактических и диагностических препаратов. В промышленной микробиологии их применяют с целью получения витаминов, ферментов, ростовых веществ, лимонной, уксусной и других кислот, ацетона, этанола, глицерина и т. д.

В биологической промышленности для культивирования большинства патогенных микроорганизмов бактериальной природы служит бульон Хоттингера, который готовят из основного перевара Хоттингера. Для приготовления перевара используют мясо крупного рогатого скота — говядину, которую подвергают гидролизу и на основе ее гидролизата готовят питательные сре-

ды. Однако, мясо является ценным пищевым продуктом и поэтому приготовление из него питательных сред для микроорганизмов экономически не выгодно. В этой связи учеными интенсивно велись работы по поиску и применению сырья различного происхождения для получения из него гидролизатов и приготовления на их основе питательных сред для бактерий. Об этом свидетельствуют публикации многих авторов: Л.Я. Телишевская, О.А. Тугаринов, С.И. Цыганкова, Т.А. Великанова, У.Э. Неязов, Ф.С. Шуляк и др. (1987); С.И. Цыганкова, В.И. Космына, Г.Г. Горбенко (1987); Е.Г. Левченко, А.Д. Чудинова, Л.Я. Телишевская и др. (1989); И.В. Соболева, Л.Я. Телишевская (2003) и др.

Заслуживают внимания основные пути получения, оптимизации, совершенствования и повышения ростообеспечивающей способности питательных сред. Первый путь связывают с поиском дешевого сырья, богатого белками, пригодного для проведения гидролиза и приготовления на его основе необходимых питательных сред. Второй путь оптимизации сред — добавление к ним различных питательных ингредиентов и стимуляторов роста микроорганизмов. Третий путь предполагает разработку способов повышения качества сырья, используемого для приготовления питательных сред [1].

Исходя из вышеотмеченного, целью данной работы явилось получение питательных сред из дешевого белоксодержащего сырья — продукции птицепредприятий — куриных голов и определение их пригодности для культивирования сальмонелл.

Материалы и методы исследований. В экспериментах в качестве белоксодержащего сырья была использована дешевая и доступная продукция птицепредприятий — куриные головы, которые подвергали гидролизу и на основе его готовили питательные среды для культивирования сальмонелл. Упомянутое сырье пропускали через мясорубку и получали фарш. На 1 кг фарша добавляли 1,5 литра водопроводной воды, подогретой до температуры 40 — 42°C, тщательно перемешивали и смесь подщелачивали 10%-ным раствором едкого натрия гидроокиси до pH 7,8—8,0. Затем на 1 литр смеси добавляли 150—200 г очищенной от оболочек и измельченной на мясорубке поджелудочной железы крупного рогатого скота или 20—30 г панкреатина и 80 см³ химически чистого хлороформа. После добавления ингредиентов смесь перемешивали и проводили ее гидролиз при температуре 40—42°C в течение 4—5 суток. Первые шесть часов смесь перемешивали каждый час, а затем - 3—4 раза в сутки. В процессе гидролиза ежедневно определяли pH, и в случае снижения концентрации водородных ионов, перевар подщелачивали до значения 7,8—8,0 добавлением 10%-ного раствора едкого натрия гидроокиси. По истечении срока переваривания фарш превращался в рыхлый сероватый осадок, над которым верхний слой жидкости имел желтоватый цвет.

О готовности перевара судили по уровню содержания триптофана. Падение триптофана, начиная с 350—400 мг %, являлось свидетельством окончания гидролиза.

Для оценки качества гидролизата брали его пробы объемом не менее 100—150 см³ и определяли цвет проб и запах их содержимого.

Концентрацию водородных ионов в пробах определяли потенциометрически, используя соответствующий прибор и руководствуясь прилагаемой к нему инструкцией.

Содержание в пробах общего белка, остаточного и аминного азота, триптофана определяли общеизвестными в биохимии методами.

Для приготовления мясо-пептонного бульона (МПБ) перевар разводили дистиллированной водой до содержания в нем 280—300 мг % аминного азота, добавляли 0,5% пептона, 0,5% поваренной соли, 0,3% химически чистого двуосновного фосфорнокислого натрия и 10% воды на выкипание. Бульон кипятили 30 минут. В процессе кипячения устанавливали pH 7,8—8,0 путем добавления к среде 10%-ного раствора NaOH. После этого среду стерилизовали при 120°C 45—50 минут, pH готовой среды — 7,4—7,6.

Для получения мясо-пептонного агара (МПА) в МПБ добавляли 2,5—3% тщательно промытого мелко нарезанного агар-агара, колбу подогревали на огне до расплавления вещества, устанавливали pH 7,4—7,6 и, не охлаждая смесь, расфасовывали по пробиркам, а затем автоклавировали при 1 атм 30 минут.

Мясо-пептонный полужидкий агар (МППЖА) готовили так же, как и МПА, с той лишь разницей, что в МПБ добавляли 0,25—0,3% агара.

Физико-химические показатели питательных сред определяли по тем же методикам, которые использовали для оценки качества гидролизата. Кроме этого, определяли чувствительность и скорость роста тест-штаммов микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* в приготовленных питательных средах, стабильность их основных свойств.

В опытах использовали производственные штаммы сальмонелл: *S. cholerae suis*, *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. abortusovis*, которые выращивали в МПБ, МППЖА и на МПА. Чистоту культур определяли микроскопией препаратов-мазков, окрашенных по Граму.

Стерильность обычного МПБ проверяли путем помещения в термостат на 10 суток 10 пробирок со средой. Такое же количество пробирок со средой Китта-Тароцци засеивали проверяемым МПБ. Спустя двое суток из пробирок с МПБ и средой Китта-Тароцци делали пересевы на среду Сабуро, которую выдерживали в термостате при 28—30 °C в течение 8 суток.

Для проверки стерильности МПА среду выдерживали в водяной бане до ее полного расплавления и затем помещали в термостат на 10 суток.

Мясо-пептонный полужидкий агар, расфасованный в 10 пробирок, помещали в термостат при 37—38°C на 10 суток.

Культуральные свойства сальмонелл изучали по характеру роста бактерий в жидких, полужидких и на поверхности плотных питательных сред. Подвижность сальмонелл определяли методом посева их уколом в полужидкий агар. Биохимические свойства бактерий изучали по их способности ферментировать сахара, выделять индол и сероводород. Патогенность микробных культур определяли для белых мышей путем подкожного введения их в дозе 0,1 см³.

Антигенную структуру сальмонелл устанавливали согласно методическим указаниям по применению сальмонеллезных монорецепторных О- и Н-агглютинирующих адсорбированных сывороток для идентификации сальмонелл в РА.

Результаты исследований.

Приготовленный из куриных голов перевар Хоттингера (опытный) характеризовался следующими биохимическими показателями:

- общего азота — 1500 мг %;
- аминный азот — 1050 мг %;
- триптофан — 300 мг %.

Биохимические показатели перевара, приготовленного из говяжьего мяса (контроль), существенно не отличались от показателей перевара, полученного из куриных голов. С учетом этих данных из опытного и контрольного переваров были приготовлены питательные среды МПБ, МПА, МППЖА.

В результате визуального контроля установили, что жидкие среды были прозрачными, без осадка на дне пробирок, имели светло-желтый цвет. Плотные среды были прозрачными, слегка желтоватыми, а полужидкие - менее прозрачными, более мутными с желтым оттенком. Запах сред как жидких, так плотных и полужидких, был специфическим.

Концентрация водородных ионов питательных сред была в пределах от 7,2 до 7,6.

Полученные среды из опытного перевара выдержали проверку на стерильность, т. е. видимого роста микроорганизмов в средах не обнаружено.

Для определения стабильности основных свойств культур тест-штаммов (*S. aureus*, *E. coli*) делали посева бактерий в испытываемые жидкие, полужидкие и на плотные питательные среды, которые инкубировали в течение 20 часов при температуре 37°C, а затем определяли их морфологические, культуральные и биохимические свойства. В результате опытов установили, что выросшие микроорганизмы по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам были типичными для соответствующего вида и рода тест-штаммов бактерий.

Положительные результаты физико-химического и биохимического контроля питательных сред из куриных голов для тест-штаммов бактерий (*S. aureus*, *E. coli*) явились основанием для культивирования на этих средах производственных штаммов сальмонелл и последующего изучения их биологических свойств.

Производственные штаммы сальмонелл выращивали в МПБ, МППЖА и на МПА. Из выращенных культур нами приготовлены препараты-мазки, окрашенные по Граму, и подвергнуты микроскопии. В поле зрения микроскопа все сероварианты сальмонелл были морфологически аналогичны друг другу. Они представляли собой грамотрицательные палочки с закругленными концами шириной 0,5—1 мкм, длиной 0,5—4 мкм. Бактерии располагались одиночно, беспорядочно, небольшими скоплениями. По морфологии незначительно отличались бактерии штамма *S. abortusovis*, которые были более тонкими и стройными.

В МПБ при росте и размножении сальмонеллы вызывали помутнение среды и образование осадка серо-белого цвета. В отличие от *S. choleraesuis*, *S. dublin* и *S. typhimurium*, *S. abortusovis* вызывали сравнительно менее значительное помутнение питательной среды и образование менее обильного осадка.

В полужидком агаре при посеве бактерий уколом наблюдали интенсивный рост по уколу в виде серо-белого стержня и менее интенсивный - по всему объему среды, что свидетельствовало о подвижности микроорганизмов.

На поверхности МПА сальмонеллы формировали колонии от 2 до 4 мм в диаметре. Бактерии *S. abortusovis* образовывали колонии величиной не более 2 мм. Колонии были с ровными краями, выпуклой блестящей поверхностью, полупрозрачными, сочными, серо-белого цвета с голубоватым оттенком. Слизистого вала вокруг колоний замечено не было.

На агаре Эндо сальмонеллы формировали нежные розоватые колонии, на среде Левина — прозрачные с голубоватым оттенком, на среде Плоскирева — мелкие бесцветные, на висмут-сульфитном агаре колонии имели черный цвет с металлическим блеском, за исключением колоний, образованных *S. choleraesuis*, которые были зеленоватыми.

Биохимическая активность сальмонелл характеризовалась способностью их ферментировать глюкозу, маннит, сорбит, арабинозу, дульцит.

Бактерии не расщепляли лактозу, сахарозу, салицин, адонит. Штаммы сальмонелл, выращенные на опытных средах, образовывали сероводород и не выделяли индол.

Антигенную структуру бактерий определяли в РА с монорецепторными сальмонеллезными агглютинирующими О- и Н-сыворотками. Бактерии *S. choleraesuis* давали положительную реакцию агглютинации с сыворотками О — 6,7; Н-с, 1,5; *S. dublin* — О — 1; 9; 12; Н-g, p; *S. typhimurium* — О-1; 4; Н-i, 1,2; *S. abortusovis* — О-1; Н-b, e, n, x.

Диссоциацию сальмонелл определяли не только просмотром колоний в отраженном проходящем свете, но пробой кипячения. Пробу кипячения ставили с культурой, состоящей из колоний в S-форме. Культуру смывали физраствором, устанавливали концентрацию 1 млрд м.т./см³ и прогревали в водяной бане при 100°С в течение часа, а затем выдерживали при комнатной температуре в течение суток.

Штаммы сальмонелл, выращенные на питательных средах из куриных голов, выдерживали пробу кипячения, т. е. самоагглютинации зарегистрировано не было. При подкожном заражении белых мышей смывом с МПА концентрацией 1 млрд м.к./см³ в дозе 0,1 см³ бактерии *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. typhimurium* вызывали гибель животных в течение 4—5 суток, а бактерии *S. abortusovis* — 7 суток.

Результаты изучения биологических свойств производственных штаммов сальмонелл, выращенных на опытных питательных средах, сведены в таблицу 1.

Таблица 1 - Биологические свойства производственных штаммов сальмонелл, выращенных на средах из куриных голов

Свойства	Показатель	Характеристика
Морфологические	Окраска по Граму	Грамотрицательные палочки с закругленными концами размером от 0,5 до 4 мкм, располагающиеся одиночно, беспорядочно, небольшими скоплениями
Культуральные	Рост на МПА	Круглые колонии от 2 до 4 мм в диаметре с выпуклой поверхностью серо-белого цвета с голубоватым оттенком
	Рост в МПБ	Диффузное помутнение среды, образование на дне пробирки обильного осадка серо-белого цвета
	Рост в ПЖА	Интенсивный рост по уколу и менее интенсивный по всему объему среды
	Рост на среде Эндо	Колонии с розоватым оттенком
	Рост на среде Левина	Прозрачные колонии с голубоватым оттенком
	Рост на среде Плоскирева	Мелкие бесцветные колонии
	Рост на висмут-сульфит агаре	Колонии черного цвета с металлическим блеском
Биохимические	Ферментативная активность	Бактерии <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. abortusovis</i> расщепляли глюкозу, маннит, сорбит, арабинозу, дульцит, ксилозу и не ферментировали лактозу, салицин, адонит.
	Образование H ₂ S	Все штаммы сальмонелл образовывали сероводород
	Образование индола	Все штаммы не продуцировали индол
Патогенные	Заражение белых мышей подкожно смывом с агара в дозе 0,1 см ³	Мыши, зараженные культурой <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. dublin</i> , <i>S. typhimurium</i> , пали через 4—5 суток, а мыши, зараженные <i>S. Abortusovis</i> , - в течение 7 суток
Антигенные	РА с агглютинирующими сальмонеллезными O- и H-сыворотками	<i>S. choleraesuis</i> — 0 — 6,7; H-c, 1. <i>S. dublin</i> — 0 — 1, 9, 12; H-g, p. <i>S. typhimurium</i> — 0 — 1, 4; H-i, 1,2. <i>S. abortusovis</i> — 0 — 1, 4; H-b, e, n, x.
Проба кипячения	Кипячение 1 млрд м.т./см ³ взвеси в течение часа	Самоагглютинации бактерий не обнаружено

Заключение. Результаты опытной работы позволяют заключить, что производственные штаммы сальмонелл (*S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*), выращенные на питательных средах из куриных голов, по морфологическим, культуральным, патогенным и антигенным свойствам являются типичными для рода *Salmonella* и соответствуют паспортным данным на эти штаммы. Необходимо заметить, что производственные штаммы сальмонелл с положительным результатом культивировал В.И. Заерко (1966) в средах, приготовленных из

куриных эмбрионов, кровяных сгустков, глобулина, казеина, фибрина. Нами же впервые доказана возможность культивирования производственных штаммов сальмонелл без изменения их биологических свойств на питательных средах, приготовленных на основе гидролизата из куриных голов.

Литература. 1. Вербицкий, А. А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 236 с. 2. 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. 3. Система культивирования микроорганизмов / В. И. Заерко [и др.] // Ветеринарная биотехнология : настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 110–113. 4. Телишевская, Л. Я. Разработка методов изготовления гидролизатов для питательных сред / Л. Я. Телишевская, С. П. Сергеева // Аграрная наука. – 2000. – № 10. – С. 22–23. 5. Ткаченко, Н. Н. Разработка и оценка качества новых питательных сред и стимуляторов роста микроорганизмов на основе активированных гидролизатов из молок рыб и вермикюльтуры : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Н. Н. Ткаченко ; Ставропольский государственный университет. – Ставрополь, 2009. – 16 с.

Статья передана в печать 12.09.2017 г.

УДК 619:579.017.8:579.842.14

ПОЛУЧЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО АНТИГЕНА НА СРЕДАХ ИЗ НЕТРАДИЦИОННОГО СЫРЬЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

*Медведев А.П., *Огурцова К.А., **Кулешов Д.Б.

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

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

*В статье показана возможность получения сальмонеллезного антигена на средах из нетрадиционного сырья и применения его для гипериммунизации продуцентов лечебно-профилактической сыворотки против сальмонеллеза животных. **Ключевые слова:** сальмонеллез, штаммы, антиген, куриные головы, питательные среды, волю, гидролиз, сыворотка, активность.*

DEVELOPING AN ANTIGEN OF SALMONELLAE ON MEDIA FROM UNCONDITIONAL SUBSTANCES AND ITS USE FOR SPECIFIC SERUM CONSTRUCTION

*Medvedev A.P., *Ogurtsova K.A., **Kuleshov D.B.

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

**OJCM «BelVitinipharm», Vitebsk, Republic of Belarus

*The article presents possible developing a salmonella antigen from unconditional substances for manufacturing a hyperimmune serum. **Keywords:** salmonellae, strains, antigen, chicken heads, nutrient media, oxen, hydrolysis, serum, activity.*

Введение. Сальмонеллы – широко распространенная в природе группа микроорганизмов, среди которых имеются патогенные, условно-патогенные и сапрофиты. В настоящее время известно более 3000 серовариантов сальмонелл. Международный сальмонеллезный центр ежегодно регистрирует 15 – 20 новых серотипов. Патогенные и условно патогенные бактерии являются возбудителями инфекционной болезни под общим названием «сальмонеллез», которая наносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам страны.

В качестве специфических средств в борьбе с сальмонеллезом используют вакцины, лечебно-профилактические гипериммунные сыворотки, иммуноглобулины, бактериофаги. Наиболее востребованными препаратами являются вакцины и сыворотки. В Республике Беларусь их производство осуществляет ОАО «БелВитунифарм». Однако, для серийного приготовления этих биопрепаратов нужны качественные питательные среды. Кстати, они необходимы для получения антибиотиков, кислот, ферментов, витаминов и т.д., а также проведения различных научно-исследовательских работ.

В биологической промышленности для выращивания сальмонелл, предназначенных для приготовления антигена для гипериммунизации волов-продуцентов специфической сыворотки, используют бульон Хоттингера, потребность в котором исчисляется сотнями литров. Бульон традиционно готовят из говяжьего мяса, являющегося ценным пищевым продуктом высокой стоимости, что экономически невыгодно. Поэтому замена мяса дешевым белоксодержащим сырьем и приготовление из него питательных сред – важная научная задача, которая может быть решена путем проведения целенаправленных исследований.

В связи с отмеченным, целью нашей работы явилось получение сальмонеллезного антигена на средах из нетрадиционного сырья и использование его для гипериммунизации проду-