

ческая профилактика ротавирусной инфекции и колибактериоза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 06.02.02 / Я. П. Яромчик ; Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслесского. – Минск, 2010. – 24 с. 10. Kneyber, M. Treatment and prevention of respiratory virus infection / M. Kneyber, H. Moll, R. Groot // Eur. J. Pediatr. – 2000. – Vol. 159 (6). – P. 399–411. 11. Antimicrobial therapy for wound infected after catastrophic earthquakes / I. N. Mishkin [et al.] // N. Engl. J. Med. – 2010. – Vol. 363. – P. 2571–2573.

Статья передана в печать 29.03.2018 г.

УДК 619:579.842.14

ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ БАКМАССЫ САЛЬМОНЕЛЛ ПРИ ИХ ГЛУБИННОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ

Медведев А.П., Вербицкий А.А., Асташонок Ю.О., Огурцова К.А.

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

В статье показана динамика накопления бакмассы сальмонелл при их глубинном культивировании, что является основанием для целенаправленной корректировки этого процесса. **Ключевые слова:** сальмонеллы, выживаемость, рост, концентрация, фазы роста, реактор, культивирование, серотип, динамика.

THE DYNAMICS OF SALMONELLA ACCUMULATION DURING IN-DEPTH CULTIVATION

Medvedev A.P., Viarbitski A.A., Astaschonok Y.O., Ogurchova K.A.

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

The article presents information on dynamics of in-depth accumulation of salmonella biomass that serves as ground for optimization of this process. **Keywords:** salmonella, viability, growth, concentration, growth phase, reactor, cultivation, serotype, dynamics.

Введение. Впервые глубинный метод выращивания патогенных бактерий был апробирован Н.Е. Лебедевым (1950). Автор доказал возможность культивирования бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в реакторах с применением принудительной аэрации растущей культуры и ее перемешивания [12, 18].

Использование метода глубинного культивирования явилось революционным достижением в биологии. Метод дал возможность наращивать большое количество биомассы за короткий промежуток времени и тем самым поставил производство биопрепаратов на промышленные рельсы [12, 14, 15, 16].

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 [1, 4, 5].

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

В лаг-фазе число клеток остается постоянным ввиду отсутствия клеточного деления, которое начинается в первой половине фазы логарифмического роста. Для большинства бактерий длительность этой фазы, как впрочем, и других фаз, составляет примерно четыре часа. Состояние бактериальных клеток позволяет оценивать эту фазу как период приспособления, адаптации бактерий к питательной среде. Продолжительность этого периода зависит от возраста засеваемой культуры, количества посевного материала, состава среды, условий культивирования [3, 5].

Логарифмическая или экспоненциальная фаза характеризуется максимальной скоростью деления клеток. Продолжительность генерации в этой фазе различна для разных видов бактерий. Например, для сальмонелл она равна 20–30 минут, кишечной палочки – 15–17 минут, стафилококков – 25–35 минут, туберкулезной палочки – 19–20 часов.

Стационарная фаза характеризуется постоянством концентрации микробных клеток в среде, что объясняется равновесием скорости размножения и отмирания бактерий [16, 17].

В фазе гибели бактерий число погибших микроорганизмов нарастает в связи с истощением питательной среды, накоплением продуктов метаболизма, что ведет к потере способности к размножению и росту клеток [12, 18].

При периодическом культивировании в экспоненциальной фазе роста микроорганизмам присуще нормальное функциональное состояние. Однако в этой фазе культуры менее устойчивы к воздействию различных факторов: повышенной температуре, изменению pH, ионизирующему облучению и др. [5].

В стационарной фазе происходит истощение питательной среды, накопление продуктов метаболизма, что вызывает остановку роста, бактерии переходят в состояние покоя, снижается их физиологическая активность, утрачивается ряд ферментов, уменьшаются размеры и уплотняются оболочки клеток. Снижение физиологической активности бактерий сопровождается повышением их устойчивости к воздействию внешних неблагоприятных факторов [5].

Глубинное культивирование, по сравнению со статистическим и поверхностным, ускоряет рост и раз-

витие микроорганизмов, позволяет получать гомогенную культуру, клетки которой равномерно распределены в культуральной жидкости по объему ферментера и в каждый момент времени находится в одинаковых условиях.

Культивирование бактерий в ферментерах – это их управляемое выращивание, т.е. лимитирование, ингибирование или стимулирование роста осуществляемое определенными воздействиями в известные моменты роста популяции. Без определения динамики роста, размножения и накопления микроорганизмов, в том числе и сальмонелл, при глубинном культивировании осуществлять их управляемое выращивание затруднительно [17, 18].

Литературные данные послужили поводом для проведения опытной работы, целью которой явилось определение динамики накопления сальмонелл при их глубинном культивировании, что имеет важное значение при необходимости целенаправленной корректировки этого процесса.

Материалы и методы исследований. В опытной работе использовали производственные штаммы сальмонелл: *S. dublin*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*, которые по биологическим свойствам соответствовали роду *Salmonella*.

Для выращивания микроорганизмов использовали бульон Хоттингера, приготовленный из основного перевара Хоттингера. Перевар готовили из нетрадиционного сырья, являющегося продукцией птицепредприятий – куриных голов, которые пропускали через мясорубку и получали фарш. На 1 кг фарша добавляли 1,5 литра дистиллированной воды, подогретой до температуры 40–42°C, тщательно перемешивали и смесь подщелачивали химически чистым 10%-ным раствором натрия гидроксида. На 1 литр смеси добавляли 150–200 г очищенной от оболочек, измельченной на мясорубке железы крупного рогатого скота и 80 см³ химически чистого хлороформа. После добавления ингредиентов смесь перемешивали и вели переваривание при температуре 40–42°C в течение 4–5 суток. В процессе переваривания смесь перемешивали 3–4 раза в сутки и ежедневно корректировали pH в пределах 7,8–8,0 добавлением 10%-ного раствора натрия гидроксида. По истечении срока переваривания фарш превращался в рыхлый сероватый осадок, над которым верхний слой жидкости имел соломенно-желтый цвет и являлся переваром Хоттингера. Из перевара готовили бульон Хоттингера по общеизвестной методике.

Культивирование сальмонелл осуществляли в реакторах, оснащенных механической мешалкой, снабженных подачей стерильного воздуха, терморегуляторами. Общий объем питательной среды 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°C, перемешивая через каждые два часа. Концентрация бактерий в среде составила для *S. choleraesuis*, *S. dublin* и *S. typhimurium* 2 млрд м.т./см³, а *S. abortusovis* – 1 млрд м.т./см³.

Выживаемость сальмонелл в баллонных культурах характеризовалась следующими данными: *S. choleraesuis* – 74%, *S. dublin* – 72%, *S. typhimurium* – 79%, *S. abortusovis* – 60% от общего количества бактерий, выращенных в жидкой питательной среде.

Каждый серотип сальмонелл культивировали в отдельном реакторе. Условия роста характеризовались следующими показателями: температура – 37±0,5°C, 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, ГИСК им. Л.А. Тарасевича, а жизнеспособность сальмонелл – путем титрования и высева культур на мясо-пептонный агар в чашках Петри.

Культуры сальмонелл, находящиеся в фазе логарифмического и стационарного роста, а также в фазе гибели, высевали на мясо-пептонный агар и высева культивировали в течение 20 часов с последующим подсчетом S- и R-форм колоний, образовавшихся на поверхности среды.

Тинкториально-морфологические свойства сальмонелл определяли путем микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму.

Результаты исследований. В результате 18-часового выращивания сальмонелл концентрация микробных тел в 1 см³ 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 часов. Затем через 6, 8 и 10 часов с момента засева бактерий в реакторы их концентрация 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 наблюдалась в отношении *S. dublin* и *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.

В процессе глубинного культивирования было установлено, что изменяются размеры сальмонелл. Так, в лаг-фазе увеличиваются размеры клеток, а в логарифмической фазе бактерии приобретают исходные размеры. В стационарной фазе роста клетки увеличиваются в длину, прекращается их деление. В фазе гибели появляются инволюционные формы бактерий, т.е. они приобретают форму кокков.

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 до конца роста определяется общей массой как жизнеспособных, так и погибших клеток.

Сальмонеллы всех сероваров, высеянные на поверхность мясо-пептонного агара в фазе логарифмического роста, образуют в среднем 5% колоний в R-форме, в фазе стационарного роста – 10%, а в фазе гибели – 25% колоний R-типа.

Заключение. Глубинное культивирование сальмонелл представляет собой способ периодического выращивания микроорганизмов, который применяют при производстве биопрепаратов с целью получения бакмассы патогенов в промышленном масштабе.

Концентрация жизнеспособных клеток сальмонелл при их глубинном выращивании достигает максимума в фазе логарифмического роста, а затем в фазе стационарного роста их выживаемость снижается, что связано с истощением питательных веществ в среде и накоплением продуктов метаболизма, отрицательно влияющих на рост и размножение бактерий.

Между накоплением жизнеспособных сальмонелл, их размером и диссоциацией бактерий наблюдается прямая зависимость. Так, в фазе логарифмического роста бактерии приобретают размеры, характерные для вида, в стационарной фазе – клетки увеличиваются в длину, появляются шарообразные, т.е. инволюционные, формы бактерий, количество которых в фазе гибели нарастает.

При глубинном культивировании процесс диссоциации сальмонелл интенсифицируется по мере нарастания продолжительности их культивирования.

Литература. 1. Павлович, С. А. Микробиология с вирусологией и иммунологией / С. А. Павлович. – Минск : Вышэйшая школа, 2005. – 799 с. 2. Практикум по общей микробиологии : учебное пособие для студентов вузов по специальности "Ветеринарная медицина" / А. А. Солонко [и др.] ; ред. А. А. Гласкович. – Минск : Ураджай, 2000. – 280 с. 3. Микробиология и иммунология : для студентов сельскохозяйственных вузов по специальности "Ветеринарная медицина", "Зоотехния" : в 2 ч. Ч. 1. Общая микробиология и иммунология / А. А. Солонко [и др.]. – Минск : Пион, 2002. – 248 с. 4. Заерко, В. И. Разработка и внедрение универсальной технологии изготовления, контроля и применения вакцин против пастереллеза животных : автореферат дис. ... доктора ветеринарных наук : 16.00.03 / В. И. Заерко. – Москва, 2000. – 47 с. 5. Баснакьян, И. А. Морфологические особенности в сопоставлении с физико-биологическими закономерностями жизнедеятельности микроорганизмов при периодическом и непрерывном культивировании. Микробиология / И. А. Баснакьян, Г. П. Дубинина. – 1974. – № 7. – С. 3–8. 6. Ахмедов, А. М. Сальмонеллезы молодняка / А. М. Ахмедов. – Москва : Колос, 1983. – 240 с. 7. Медведев, А. П. Влияние качества посевного материала на рост сальмонелл при глубинном культивировании / А. П. Медведев, С. В. Даровских, А. М. Юдасин // Ученые записки : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии", посвященной 80-летию основания УО ВГАВМ, 4-5 ноября 2004 года, г. Витебск / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2004. – Т. 40, ч. 1. – С. 253–254. 8. Медведев, А. П. Выживаемость сальмонелл при периодическом культивировании / А. П. Медведев, С. В. Даровских // Ученые записки : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии", посвященной 80-летию основания УО ВГАВМ, 4-5 ноября 2004 года, г. Витебск / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2004. – Т. 40, ч. 1. – С. 251–252. 9. Медведев, А. П. Контроль процесса культивирования сальмонелл в реакторах / А. П. Медведев, С. В. Даровских, А. М. Юдасин // Ученые записки : сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии", посвященной 80-летию основания УО ВГАВМ, 4-5 ноября 2004 года, г. Витебск / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2004. – Т. 40, ч. 1. – С. 254–255. 10. Медуницин, Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницин. – Москва : Триада-Х, 1999. – 272 с. 11. Павлович, С. А. Основы иммунологии / С. А. Павлович. – Минск : Вышэйшая школа, 1997. – 116 с. 12. Медведев, А. П. Основы получения противобактериальных вакцин и сывороток : монография / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2010. – 196 с. 13. Анисимова, Л. В. Контроль процесса глубинного культивирования кампилобактерий / Л. В. Анисимова // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс – информация. – Москва, 1982. – С. 3–4. 14. Виестур, У. Э. Культивирование микроорганизмов / У. Э. Виестур, М. Ж. Кристансон, Е. С. Былинкина. – Москва, 1980. – 232 с. 15. Система культивирования микроорганизмов / В. И. Заерко [и др.] // Ветеринарная биотехнология : настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 110–113. 16. Карпов, А. А. Масштабирование процессов культивирования микроорганизмов / А. А. Карпов, Е. А. Рубан, А. Я. Самуйленко // Ветеринарная биотехнология : настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 190–192. 17. Глубинное культивирование кампилобактерий в условиях производства / В. П. Шишов [и др.] // Передовой научно-производственный опыт в биологической промышленности : экспресс – информация. – Москва, 1983. – С. 10–14. 18. Вербицкий, А. А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 236 с.

Статья передана в печать 28.04.2018 г.