

THE NUTRIENT MEDIUM FOR INDICATION AND CULTIVATION OF MYCOBACTERIA

Kalashnyk M.V.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov, Ukraine

The aim: development of solid medium for cultural study of tuberculosis.

*Materials and methods. The nutrient medium was made based on eggs with certain ratio of components. The Lowenstein-Jensen medium has been used as control. Elective properties of prepared nutrient media was studied using reference strains of mycobacteria *M. bovis* (strain Vallee), *M. tuberculosis* (strain H37Rv), *M. avium* (strain *M. avium* IECVM-UAAS) and atypical culture of mycobacteria of IV group by Runyon classification (*M. fortuitum*) and with 10 samples of biomaterial from cattle reacting on tuberculin (PPD) for mammals on troubled for tuberculosis farm. Pre-seeding processing of biomaterial samples was carried out by A. P. Alikaeva's method. Suspensions of mycobacteria cultures and samples of biomaterials has been seeded on nutrient media. Growth activity of mycobacteria colonies was controlled during 90 days with in an interval of 5–7 days.*

*The results of investigations. The initial growth of reference cultures *M. bovis* and *M. tuberculosis* was observed on 10th-15th day, *M. avium* — on 7th-10th day, *M. fortuitum* — on 3th-5th day after inoculation. Initial growth of colonies of the tuberculosis agent *M. bovis* was observed on 13th-19th day and in case of atypical mycobacteria cultures — on 5th-10th day from samples of biological material.*

*Initial growth of reference cultures has been noted on the control medium on 16th-20th, 10th-13th, and 5th-7th days respectively. The culture *M. bovis* was grew on 21th-29th day from biomaterial samples and atypical mycobacteria — on 6th-15th day. Atypical cultures of mycobacteria were classified to the II, III and IV groups by Runyon classification.*

*Intensity of growth was higher than 50 colonies in one test-tube of *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* on the test medium. The massive growth was in certain test-tubes. Analogous results of growth of mycobacteria colonies were obtained from biomaterial on 29th-38th day after seeding.*

*The same intensity of mycobacteria colonies growth was determined on control medium for *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. avium* cultures on 31th-38th day and for samples of biological material from cattle on 52th-60th day.*

Conclusions. The nutrient medium for indication and cultivation of mycobacteria that was developed provides earlier growth of reference strains of mycobacteria for 3–7 days than control and isolation of epizootic cultures from biomaterial. The developed nutrient medium can be used for conducting of the cultural investigation on tuberculosis in veterinary practice.

Keywords: tuberculosis, bacteriological diagnostic, mycobacteria, biomaterial, nutrient media, elective properties, rate and intensity of growth.

УДК 619: 615: 37.012

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ МЯСНЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ САЛЬМОНЕЛЛ

Самуйленко А.Я., Раевский А.А., Еремец Н.К., Школьников Е.Э., Анисимова Л.В.,
Соловьев Л.Б., Павленко И.В., Коротеева Л.А., Тимофеев С.В.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Российская Федерация, e-mail: vnitibp@mail.ru

В статье изложены материалы исследований по культивированию вакцинных штаммов сальмонелл в питательных средах на основе перевара Хоттингера. Определены основные технологические параметры процесса глубинного управляемого культивирования, изготовлены опытные серии вакцины, определены оптимальные сроки хранения.

Ключевые слова: гидролизаты, сальмонеллы, вакцинные штаммы, культивирование, вакцина.

Важнейшим из условий при производстве вакцинных и диагностических препаратов, а также при проведении бактериологических исследований являются полноценные питательные среды и их основы. В биологической промышленности в качестве основы питательной среды используют мясо высших категорий качества, которое во все времена было и остается ценным и дорогим пищевым продуктом. И именно поэтому внимание исследователей в медицине и ветеринарии постоянно направлено на изыскание более дешевых и доступных источников белка для приготовления бактериологических питательных сред и их основ. Для этого используют растительные белки, отходы рыбной промышленности, белки молока, продукты переработки куриных эмбрионов и др.

Наряду с этим в настоящее время проводятся исследования по усовершенствованию технологии культивирования микроорганизмов для получения баккультур, используемых в дальнейшем при производстве вакцинных и диагностических препаратов.

Материалы и методы. В наших исследованиях мы сосредоточили свои усилия на оптимизации условий культивирования вакцинных штаммов сальмонелл.

Для выращивания сальмонелл использовали лабораторные ферментеры АНКУМ-2М вместимостью 0,01 м³, оснащенные системами автоматического контроля и регулирования основных параметров культивирования (температура, pH, eH, pO₂).

В процессе культивирования изучали морфологию сальмонелл в окрашенных по Граму мазках, накопление биомассы – по оптической плотности на КФК-2 при длине волны 540 нм и с использованием блока оптической плотности (БОП-5) аппаратуры АНКУМ-2М, жизнеспособность культуры – методом последовательных десятичных разведений на чашках Петри, культурально-биологические свойства – по способности роста на МПА, МПБ, средах Гисса.

Динамику роста при культивировании бактерий (максимальная удельная скорость и длительность фаз роста) рассчитывали графическим методом.

В качестве тест-культуры использовали вакцинный штамм *Salmonella choleraesuis* № 370.

Оптимизированную питательную среду готовили на основе перевара Хоттингера.

Оптимальную дозу засеваемого материала подбирали из расчета 50, 100, 250 и 500 млн.м.к. в одном кубическом см питательной среды. Засевные культуры использовали из расплодки в экспоненциальной и стационарной фазах роста.

Результаты исследований. Анализ процесса культивирования сальмонелл по существующим технологиям позволил сделать заключение о не оптимальности технологических параметров (pH, eH, pO₂ и др.). При этом было получено низкое накопление сальмонелл штамма № 370 – 9,09 млрд.м.к./см³, а концентрация живых клеток составила 5,62 млрд.м.к./см³.

В процессе исследований были выявлены значимые параметры процесса культивирования: окислительно-восстановительный потенциал (eH) – на фазе приспособления; температура, концентрация глюкозы и уровень растворенного в культуральной жидкости кислорода (pO₂) – в течение всего процесса.

Разработанный режим управляемого культивирования сальмонелл включает в себя уменьшение eH в культуральной жидкости после засева; регулирование pH с помощью подачи 10 %-ного раствора гидроокиси натрия; регулирование уровня растворенного в культуральной жидкости кислорода (pO₂) изменением подачи воздуха на аэрацию и скорости вращения мешалки; дробную подачу 40 %-ного раствора глюкозы при лимитировании роста сальмонелл источником углерода; добавление пропинола Б-400 для пеногашения.

Использование усовершенствованного управляемого процесса культивирования относительно контрольной питательной среды показал увеличение накопления биомассы сальмонелл, штамм № 370, в 3 раза, живых клеток – в 2,7 раза.

При культивировании сальмонелл, штамм № 370, с использованием экспериментальной питательной среды и разработанного режима получено более высокое накопление сальмонелл (45,8 млрд.м.к./см³) и наибольшая концентрация жизнеспособных клеток (26,05 млрд.м.к./см³) за счет увеличения продолжительности фаз логарифмического роста (4,77 ч) и высокой удельной скорости роста (1,23 ч⁻¹).

Все полученные культуры сальмонелл были типичными по своим морфологическим и основным культурально-биохимическим свойствам.

Применение усовершенствованного управляемого процесса культивирования сальмонелл в сочетании с использованием оптимизированной питательной среды на основе перевара Хоттингера позволило увеличить накопление жизнеспособных сальмонелл, штамм № 370, в 4,6 раза по сравнению с контролем.

Из полученной биомассы сальмонелл были приготовлены опытные серии вакцин. Через 9 месяцев хранения, у вакцин, выращенных в оптимизированной питательной среде, было отмечено незначительное снижение концентрации жизнеспособных сальмонелл, штамм № 370, (84,5 %), тогда как концентрация жизнеспособных клеток этого же штамма, выращенного в контрольной питательной среде, составила 66,7 %.

Выводы. Таким образом, разработан усовершенствованный управляемый процесс культивирования сальмонелл, при этом выявлены значимые параметры процесса культивирования.

Использование разработанного режима процесса культивирования в сочетании с оптимизированной питательной средой на основе перевара Хоттингера дало значительное увеличение накопления биомассы и концентрации живых клеток по сравнению с контролем.

Также выявлена лучшая сохранность опытной серии вакцины через 9 месяцев хранения по сравнению с контрольными образцами.

Лучший результат получен при засеве культурой, находящейся в экспоненциальной фазе роста, в количестве 5–10 % от объема питательной среды в ферментере.

Список литературы

1. Галиакберова Н.И., Алимов А.М., Макеев Х.Н. Изыскание питательной среды и оптимизация условий культивирования сальмонелл: сб. докл. Междун. конф. молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». - Щелково, 2001. - С. 103-106.
2. Клыков С.П. и др. Влияние скорости роста культур на выживаемость сальмонелл // Биотехнология. - 1996. - № 1. - С. 35-39.
3. Заерко В.И. Производство живых вакцин против сальмонеллеза животных на пилульных средах из непещевого сырья: Автореф. дисс...канд. вет. наук // М., 1996. - 18 с.
4. Равилов А.З. и др. Микробиологические среды. - Казань: ФЭН, 1999. - 398 с.
5. Школьников Е.Э. и др. Культивирование сальмонелл в питательных средах на основе перевара Хоттингера. Мат. Межд.научн.-практ. конф. «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов». - Щелково., 2014. - С152-155.

USE OF THE MEDIUM BASED ON MEAT HYDROLYSATES FOR THE SALMONELLAS' CULTIVATION

Samujlenko A.Ya., Raevskii A.A., Eremets N.K., Shkolnikov E.E., Anisimova L.V., Solovyov L.B., Pavlenko I.V., Koroteeva L.A., Timofeev S.V.
All-Russian Scientific-Research and Technological Institute of Biological Industry RAAS,
Shchelkovo, Russian Federation

The paper presents the results of research concerning the cultivation of Salmonella vaccine strains in nutrient media based on Hottinger's broth. The main technological parameters of deep-managed cultivation were defined, pre-production series of vaccines were obtained and the optimal storage time was determined.

Keywords: Hydrolysates, Salmonella, vaccine strains, cultivation, vaccine.

УДК 619:579.842.11

**КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭШЕРИХИЙ ШТАММА *E. COLI* VL-613
ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА СИМБИОТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ**

*Самуйленко А.Я., Школьников Е.Э., Раевский А.А., Еремец В.И.,
Соловьев Л.Б., Анисимова Л.В., Еремец Н.К., Павленко И.В.*

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», г. Щелково, Российская Федерация, e-mail: vnitibr@mail.ru

*В статье приведены результаты исследований по культивированию штамма *E. coli* VL-613 для получения симбиотического препарата. Определены значимые технологические параметры глубинного управляемого культивирования штамма VL-613. Изготовлены опытные серии симбиотического препарата.*

Ключевые слова: эшерихии, штамм, культивирование, симбиотический препарат, технологические параметры.

Производство мяса птицы и свинины требует сбалансированного кормового рациона по основным показателям, в которых кроме других компонентов обязательным является включение в рацион кормления одной из незаменимых аминокислот – лизина.

В практике кормления продуктивных животных проблему дефицита лизина решают путем ввода в состав рациона компонентов животного происхождения, а также синтетического лизина.

Применение синтетического лизина повышает стоимость продукции животноводства и птицеводства, а также влияет на качество получаемого продукта.

Альтернативным подходом к решению проблемы восполнения дефицита незаменимой аминокислоты в рационах кормления продуктивных животных и птиц является использование симбиотического препарата на основе штамма *E. coli* VL-613, который в тонком отделе кишечника синтезирует достаточное количество необходимого лизина.

Культивирование в жидких питательных средах эшерихий штамма VL-613, обладает рядом недостатков: процесс культивирования эшерихий производится в неуправляемом режиме, т.е. без регулирования окислительно-восстановительного потенциала, количества растворенного в культуральной жидкости кислорода, *pH*, продолжителен (6–12 часов); температура культивирования находится в большом диапазоне (25–37 °С); и не обеспечивает стабильного накопления жизнеспособных клеток; трудоемок; не позволяет использовать современное оборудование и приборы, что сказывается на качестве конечного продукта, а также на эффективности производства.

Целью исследования являлось сокращение времени культивирования, снижение себестоимости препарата, а также повышение качества и стабильности получения симбиотического препарата на основе штамма *E. coli* VL-613.

Методы исследования. Технология получения симбиотического препарата осуществляют следующим образом.

В стерильный ферментер, который снабжен системой автоматического контроля и регулирования основных технологических параметров (температура, обороты мешалки, *pH*, *pO₂*, *eH*), загружают жидкую питательную среду на основе перевара Хоттингера.

Готовая стерильная питательная среда должна содержать 160–180 мг% аминного азота и иметь *pH* 7,4–7,6 ед.

Результаты исследований. В ферментер с питательной средой инокулируют 18–24-часовую матриксную культуру эшерихий (*E. coli*, штамм VL-613), выращенную в жидкой питательной среде по составу аналогичному со средой основного культивирования в соотношении 5–10 % от объема питательной среды в ферментере и культивируют при 37±1 °С в течение 4–6 часов.