

Передбачувана корисна модель відноситься до загальної біотехнології та ветеринарної мікробіології і може бути використана для готування мікробіологічних поживних середовищ для нарощування біомаси штаму збудника бешихи свиней,

Збудник бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* є культурою, вимогливою до умов живлення. При активації штаму після тривалого зберігання велике значення має швидкість нарощування біомаси. Як правило, для наукових і комерційних цілей застосовують традиційні поживні середовища на основі м'ясної сировини. М'ясопептонний бульйон (МПБ) і м'ясопептонний агар (МПА) з переварення Хоттінгера забезпечують хороший ріст мікроорганізмів без зміни їх культуральних і біологічних властивостей. Гідролізати кільки і рибного борошна також широко застосовуються при виробництві сухих поживних середовищ для культивування мікроорганізмів, оскільки білки риби за своєю будовою та амінокислотному складу найбільш подібні до білків м'яса і здатні задовольнити потреби мікроорганізмів в органічних сполуках азоту. Проте, пошук високоякісних і недорогих поживних середовищ є актуальним завданням.

Відомий Штам бактерій *Erysipelothrix rhusiopathie* M2-BK для виготовлення інактивованої вакцини проти бешихи свиней [див. Пат. №10833 У, Україна, С12N1/20, А61К39/02]. Як поживне середовище використовують МПБ Хоттінгера. Відомо, що м'ясні середовища мають недоліки, обумовлені їхньою нестандартністю, низьким коефіцієнтом використання продукту, тривалістю виготовлення, також необхідністю додавання до них інших інгредієнтів: пептону, печінкових та дріжджових екстрактів, глюкози, сироватки крові тощо.

Відомо Поживне середовище для вирощування мікроорганізмів [див. П. №2089609, А, С12N1/20, RU], що містить джерело азотного живлення, хлористий натрій, агар. Як джерело азоту використовують панкреатичний гідролізат кормового рибного борошна із вмістом амінного азоту $4,4 \pm 0,2\%$, загального азоту $12 \pm 0,5\%$. Істотним недоліком є те, що цей гідролізат має високу вартість через необхідність ввезення із-за кордону.

Відомо Поживне середовище „Аквамедіа” для культивування мікроорганізмів [див. Пат. №34711 У, С12N1/20, UA], в якому поживною основою є суміш лужного гідролізату з молюсків з кислотним гідролізатом з рибної сировини у співвідношенні 3:1 - 1:3. Кінцева концентрація вмісту амінного азоту складає 60-120мг %. До складу середовища також входять глюкоза або мальтоза, пептон та агар. Недоліком відомого середовища є недостатня для культивування штаму збудника бешихи свиней кінцева концентрація вмісту амінного азоту.

В основу корисної моделі Поживне середовище для культивування штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* поставлена задача шляхом використання продуктів морського генезу сконструювати поживне середовище, яке забезпечить ріст штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* для готування ефективної вакцини.

Поставлене завдання досягається тим, що для культивування вакцинного штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* готують поживне середовище, що складається з рибного автолізату, в який додатково вводять 20-50% лужного мідійного гідролізату.

Мідійний гідролізат і автолізат кільки отримують відповідно до відомих технологій [див. Крутченский Г.В., Кулясова В.Е. К вопросу получения белковых гидролизатов из моллюска леды // Известия ТИНРО. - 1976. - 99. - С. 102-104; Лихварь Н.А. Сухие питательные среды из свежих и замороженных отходов рыбной промышленности. Ученые записки ДагНИВИ по производству питательных сред. Махачкала, 1956, 2].

Автори досліджували рівень формування біомаси промислового штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* №286 на різних середовищах (Таблица 1).

Таблица 1

Оцінка інтенсивності росту промислового штаму збудника бешихи свиней *E. rhusiopathie* №286 (за 5-бальною шкалою)

Поживні середовища	Інтенсивність росту в залежності від форми середовища		
	тверда	рідка	напіврідка
М'ясопептонний агар Хоттінгера (еталон)	5	5	2
Гідролізат №1 кільки лужний	3	0	1
Гідролізат №2 кільки лужний	4	2	2
Гідролізат кільки кислотний	4	1	2
Автолізат кільки	3	1	2
Мідійний гідролізат	3	3	2

Як видно з Таблиці 1, культура проявляла на всіх середовищах, крім еталонного, невисоку інтенсивність росту, що свідчить про її вимогливість до умов живлення. На деяких середовищах до того ж відзначали поліморфізм паличок збудника бешихи свиней: з'являлися подовжені ланцюжки *E. rhusiopathie*, що є ознакою несприятливих умов культивування, зокрема із-за незбалансованого елементів живлення.

Надалі досліджували середовища, які крім гідролізату кільки містили гідролізат мідій в об'ємі від 0 до 50% (Таблица 2). Культивували штаму за стандартними температурними умовами протягом 48 годин. Оптичну щільність вимірювали на фотоелектрокалориметрі при довжині хвилі 545нм і товщині кювети 5мм. Контрольним зразком при вимірюванні було незасіяне середовище такого ж складу.

Таблица 2

Залежність рівня накопичення біомаси бактерій *E. Rhusiopathie* від вмісту мідійного гідролізату в поживному середовищі

Поживне середовище	Оптична щільність суспензії мікробних клітин залежно від вмісту мідійного гідролізату			
	0%	20%	30%	50%
Комерційний гідролізат кільки + мідійний	$0,081 \pm 0,001$	$0,163 \pm 0,002$	$0,180 \pm 0,01$	$0,233 \pm 0,01$

гідролізат + 1% глюкози (еталон)				
Автолізат кількі власного виготовлення + мідійний гідролізат (дослід)	0,063±0,007	0,130±0,005	0,155±0,01	0,238±0,001
Різниця % до еталону	-22	-20	-14	-2
HCP ₀₅ = 0,006				

Як видно з Таблиці 2, додавання в поживне середовище мідійного гідролізату в кількості 20% від об'єму забезпечувало подвоєння біомаси як в еталонному середовищі (0,163 проти 0,081), так і в досліді (0,130 проти 0,063), а внесення 50% мідійного гідролізату в середовище потроювало приріст. При цьому різниця між дослідним і еталонним середовищами, незважаючи на відсутність в дослідному середовищі глюкози, із збільшенням вмісту мідійного гідролізату поступово зменшувалась.

Завдяки високому вмісту амінного азоту (показник поживності середовищ для вирощування мікроорганізмів) гідролізат з морепродуктів є цінною сировиною для біотехнологічних виробництв. Автолізат рибний містить в 4-10 разів більше амінного азоту, ніж необхідно для продуктивного росту промислових штамів. Мідійний гідролізат при вмісті в середовищі 20%, подвоює бактерійну масу. Таким чином поєднання рибного автолізату і лужного мідійного гідролізату дозволяє одержувати збалансоване поживне середовище для культивування збудника бешихи свиней.

Приклад реалізації способу

Виготовляли дослідну серію вакцини проти бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie* №286 в об'ємі 3дм³. Попередньо визначили, що рН рибного гідролізату складав 6,0, а вміст амінного азоту - 740мг %. У мідійному гідролізаті рН складав 7,7, а вміст аміноного азоту - 247мг %. З цих компонентів готували рідкі та тверді поживні середовища за стандартним прописом для МПБ. У склад середовища для культивування промислового штаму на пропонуваному поживному середовищі входила суміш рибного автолізату і 20% за об'ємом лужного мідійного гідролізату, пептон ферментативний - 1% до загального об'єму, калій фосфорнокислий - 0,3%, натрій фосфорнокислий - 1,8%, рН середовища становив 7,3-7,4. Штам висівали в пробірки з рідким середовищем, потім пересівали у флакони з таким самим середовищем і культивували у відповідних умовах. По закінченні культивування визначали типовість та чистоту культури мікроскопією мазків з середовищ та встановлювали концентрацію мікробних клітин.

Культура промислового штаму збудника бешихи свиней, що отримана на середовищах з гідролізатів, у порівнянні із середовищами, отриманими з м'ясної сировини, не відрізнялись за культурно-морфологічними властивостями і відповідала вимогам паспортних даних на штам. Концентрація мікробних клітин у 1см³ повинна складати не нижче 50млн. Авторами отримані наступні дані: на поживних середовищах з морепродуктів концентрація мікробних клітин складала 50млн., а на середовищах, виготовлених з переваренню Хоттінгера - 70млн.

Інактивацію мікробних культур проводили з використанням формальдегіду в концентрації 0,4%. Перевірку повноти інактивації проводили шляхом посівів одержаної вакцини на поживні середовища, мікроскопією пофарбованих за Грамом мазків. Контроль на нешкідливість вакцини проводили на 5 білих мишах масою 18-20г, вводячи їм внутрішньочеревно по 0,3см³. Спостереження за тваринами терміном 16 діб показали, що вакцина є нешкідлива: піддослідні тварини залишалися живими, нормально харчувалися, змін у поведінці не відмічено.

Контроль імунногенної активності проводили на тихий же білих мишах після щеплення вакциною. Мишей заражали контрольним штамом збудника бешихи свиней у смертельній дозі. Всі контрольні миші (10 голів), що не були щеплені, загинули впродовж 4-6 діб, всі вакциновані вижили протягом 10 діб. Виходячи з результатів цих досліджень, зроблено висновок, що виготовлена вакцина є імунногенно-активною.

Таким чином, поживне середовище з використанням продуктів морського генезу, що сконструйовано, забезпечує ріст штаму збудника бешихи свиней *Erysipelothrix rhusiopathie*, придатного для готування ефективної вакцини.