

DOI: 10.37925/0039-713X-2025-4-34-37

УДК 619:579.869.2:636.4:57.082.26

Подбор питательной среды для культивирования штаммов *Erysipelothrix rhusiopathiae*



Н.Д. БАЛАХНИН, аспирант, ведущий специалист лаборатории профилактики болезней свиней, e-mail: balahnin@arriah.ru, А.А. ФРОЛОВЦЕВА, кандидат вет. наук, научный сотрудник лаборатории профилактики болезней свиней, e-mail: frolovtseva@arriah.ru, Д.А. БИРЮЧЕНКОВ, кандидат вет. наук, заведующий лабораторией профилактики болезней свиней, e-mail: biruchenkov@arriah.ru, ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (Владимир)

В работе представлены результаты изучения процесса культивирования штаммов *Erysipelothrix rhusiopathiae*, а также подбора оптимальной питательной среды и ростостимулирующих добавок.

Ключевые слова: рожа свиней, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, культивирование, питательная среда, ростостимулирующие добавки.

Selection of a nutrient medium for cultivation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains

N.D. BALAKHNIN, postgraduate student, leading specialist at the laboratory for the prevention of swine diseases, e-mail: balahnin@arriah.ru, A.A. FROLOVTSEVA, candidate of veterinary sciences, researcher at the laboratory for the prevention of swine diseases, e-mail: frolovtseva@arriah.ru, D.A. BIRYUCHENKOV, candidate of veterinary sciences, head of the laboratory for the prevention of swine diseases, e-mail: biruchenkov@arriah.ru, Federal Center for Animal Health Protection (Vladimir)

The paper presents the results of studying the cultivation process of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains, as well as the selection of optimal nutrient medium and growth-stimulating additives.

Key words: porcine erysipelas, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, cultivation, nutrient medium, growth-stimulating additives.

■ Введение

Промышленное свиноводство является одной из стратегически важных и интенсивно развивающихся отраслей народного хозяйства. Наряду с увеличением количества поголовья свиней, содержащихся в специализированных комплексах по выращиванию и откорму, интенсификацией процессов воспроизводства животных наблюдается рост числа инфекционных заболеваний поголовья. Отдельной строкой следует обозначить такую патологию, как рожа свиней [2, 5, 9].

Рожа свиней – инфекционное заболевание, сопровождающееся при остром течении явлениями септицемии и воспалительной эритемой кожи, а при хроническом –

эндокардитом и некрозами кожи [1, 3, 5, 13]. Широкое распространение рожи в природе указывает на многообразие источников этой инфекции для свиней [7, 15].

Основным методом предупреждения как массовых вспышек, так и отдельных случаев рожи свиней в хозяйствах остается специфическая иммунопрофилактика [8, 13]. Эффективность вакцинопрофилактики во многом зависит от качества выпускаемых биопрепаратов, которое определяется свойствами штаммов микроорганизмов, технологией культивирования и условиями производства [12, 14]. Одним из важнейших элементов разработки таких биологических препаратов является питательная среда для культивирования,

позволяющая получить достаточное количество биомассы бактерий со стабильными биологическими показателями [6, 10, 11].

Цель работы – подобрать питательную среду и ростостимулирующие добавки для оптимизации процесса культивирования и получения биомассы бактерий *E.rhusiopathiae*.

■ Материалы и методы

В работе использовали штаммы *E.rhusiopathiae*, депонированные в ГКШМ ФГБУ «ВНИИЗЖ».

Для культивирования *E.rhusiopathiae* применяли соево-казеиновый бульон (СКБ) на основе энзиматического гидролизата казеина и сои (Sigma или HiMedia), сердечно-моз-

говой бульон (СМБ) (HiMedia), бульон на основе триптического гидролизата мяса по Хоттингеру (ТГХ) с концентрацией аминного азота 250 мг% и мясо-пептонный бульон (ФГБУ «ВНИИЗЖ»).

В качестве ростостимулирующей добавки в питательные среды вводили сыворотку крови лошади (НПО «Микроген»).

Рабочий посевной материал штаммов *E.rhusiopathiae* высевали в чашки Петри с плотной питательной средой на основе сердечно-мозгового бульона с добавлением сыворотки крови лошади и инкубировали при температуре 37,0±0,5°С в течение 48 часов. Единичные колонии бактерий *E.rhusiopathiae*, выросшие на агаре, ресуспендировали в стерильном фосфатно-буферном растворе с pH 7,2–7,4, и полученная бактериальная суспензия служила расплодочным материалом.

Культивирование бактерий проводили в жидкой питательной среде в конических колбах в орбитальном шейкере-инкубаторе при 180 об./мин. в течение 48 часов при температуре 37,0±0,5°С.

В процессе культивирования осуществляли качественную оценку получаемой культуры, изучая ее морфологические свойства, определяли концентрацию микробных клеток и чистоту роста.

Концентрацию живых микробных клеток определяли методом титрования на плотных питательных средах и выражали в lg КОЕ/см³. Высев культуры проводили после внесения расплодочного материала и каждые два часа в процессе культивирования [13].

Расчет параметров культивирования производили по формуле:

$$N=C/(N_1+0,1xN_2xD),$$

где N – искомое значение КОЕ, C – сумма колоний на всех чашках Петри с плотной питательной средой, N₁ – количество чашек Петри первого разведения, N₂ – количество чашек Петри второго разведения, D – коэффициент первого разведения.

■ Результаты и обсуждение

Известно, что при производстве противобактериальных вакцин одной из главных задач является получение максимального количества биомассы за возможно короткое время. Прежде чем приступить к наработке

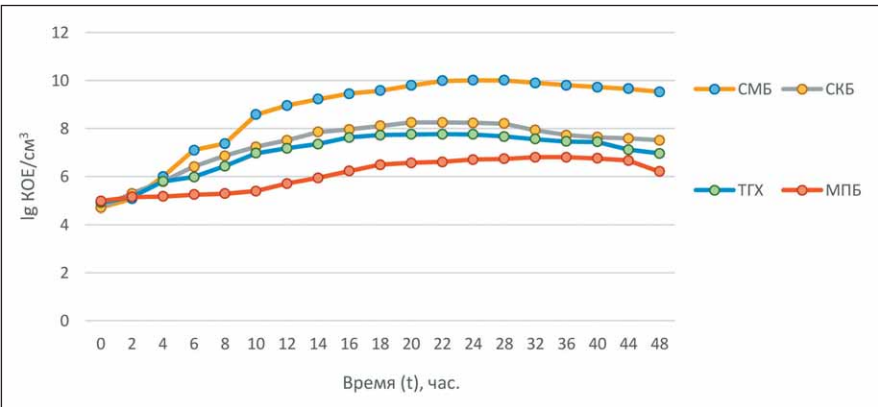


Рис. 1. Динамика роста бактерий *E.rhusiopathiae* на различных питательных средах

Таблица 1. Основные параметры роста бактерий *E.rhusiopathiae*

Параметр роста	Питательная среда			
	СМБ	СКБ	ТГХ	МПБ
Лег-фаза, ч.	0,45±0,1	0,7±0,1	0,65±0,1	0,5±0,1
Стационарная фаза, ч.	22	20	18	24
X ₀ , lg КОЕ/см³	4,7±0,2	4,7±0,2	4,9±0,2	4,97±0,2
X, lg КОЕ/см³	10±0,2	8,25±0,2	7,76±0,2	6,8±0,2

Примечание. Здесь и далее: лег-фаза – продолжительность лег-фазы, стационарная фаза – время выхода культуры на стационарную фазу, X₀ – начальная концентрация живых микробных клеток, X – максимальная концентрация живых микробных клеток.

бактериальной массы, необходимо подобрать оптимальную питательную среду для культивирования возбудителя рожи свиней.

Для выращивания бактерий *E.rhusiopathiae* используют различные питательные среды, содержащие ростостимулирующие добавки, такие как сыворотка крови животных и др. Поэтому при подборе оптимальной питательной среды для культивирования *E.rhusiopathiae* необходимо было решить следующие задачи:

- изучить ростовые свойства некоторых питательных сред, используемых при работе с бактериями *E.rhusiopathiae*;
- изучить ростостимулирующие свойства сыворотки крови лошади и определить необходимое содержание данного компонента в питательной среде.

На первом этапе работы проводили подбор питательной среды, оптимальной по количественному и качественному составу, для культивирования *E.rhusiopathiae*. Бактерии выращивали на различных питательных средах, при этом изучали такие основные параметры, как кинетическая кривая роста микроорганизма, время культивирования и накопление возбудителя в питательной среде. Результаты этих исследований представлены на рисунке 1 и в таблице 1.

Анализ данных рисунка 1 и таблицы 1 показал, что при исполь-

зовании мясо-пептонного бульона наблюдали длительную переходную фазу роста продолжительностью 10 часов с момента внесения расплодочного материала. Максимальное накопление бактерий в суспензии составило 6,8±0,2 lg КОЕ/см³ к 24-му часу культивирования.

При применении бульона на основе триптического гидролизата мяса по Хоттингеру и соево-казеинового бульона накопление возбудителя составило 7,76±0,2 и 8,25±0,2 lg КОЕ/см³ к 18-му и 20-му часу культивирования соответственно.

При культивировании бактерий *E.rhusiopathiae* на сердечно-мозговом бульоне экспоненциальную фазу роста наблюдали на протяжении восьми часов, а накопление возбудителя в питательной среде по истечении 22 часов выращивания составило 10,0±0,2 lg КОЕ/см³.

В результате проведенных исследований установлено, что все питательные среды обеспечивали процесс роста бактерий *E.rhusiopathiae*. В то же время полученные данные указывают на то, что питательная среда на основе сердечно-мозгового бульона является наиболее перспективной для производства бактериальной массы *E.rhusiopathiae*.

На следующем этапе исследований изучали влияние процентного содержания сыворотки крови лошади в среде культивирования

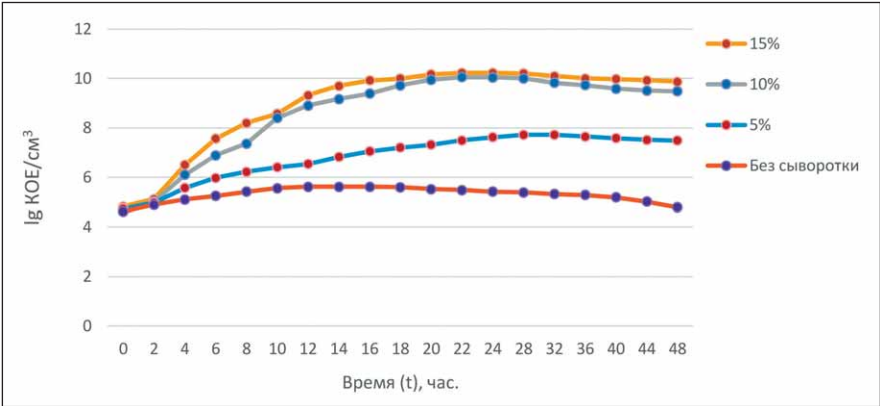


Рис. 2. Влияние количества сыворотки крови лошади в питательной среде на рост бактерий *E.rhusiopathiae*

Таблица 2. Влияние сыворотки крови лошади на динамику роста возбудителя рожи свиней

Параметр роста	Содержание сыворотки крови лошади в питательной среде, %			
	0	5	10	15
Экспоненциальная фаза, ч.	8±1	24±1	14±1	10±1
Стационарная фаза, ч.	12	28	22	20
X ₀ , lg КОЕ/см³	4,62±0,2	4,73±0,2	4,69±0,2	4,82±0,2
X, lg КОЕ/см³	5,62±0,2	7,72±0,2	10,05±0,2	10,23±0,2

на основе сердечно-мозгового бульона на рост бактерий *E.rhusiopathiae*. Сыворотку крови лошади вносили в колбы с СМБ в количестве 5%, 10% и 15% от общего объема среды. Контролем служила питательная среда без добавления указанного компонента.

Данные, представленные на рисунке 2, свидетельствуют о том, что сыворотка крови лошади стимулирует рост возбудителя рожи свиней.

Так, в среде, содержащей 5% сыворотки крови, максимальное накопление бактерий достигло 7,72±0,2

lg КОЕ/см³, а фаза логарифмического роста длилась до 24 часов. При этом в среде с добавлением 10% и 15% сыворотки крови лошади титр увеличился до 10,05±0,2 lg КОЕ/см³ (к 22-му часу культивирования) и 10,23±0,2 lg КОЕ/см³ (к 20-му часу культивирования) соответственно. Продолжительность стационарной фазы роста составила 14±1 и 10±1 час (табл. 2).

При микроскопии мазков, приготовленных из бульонных культур, окрашенных по Грамму, возбудитель рожи свиней представлял со-

бой грамположительные мелкие короткие прямые палочки, расположенные одиночно.

Сыворотка крови лошади имеет непосредственное влияние на ростовые показатели микроорганизма. Так была выявлена зависимость процентного содержания сыворотки, которая стимулирует рост бактерий. Отказ от сыворотки в свою очередь не обеспечивает рост микроорганизма. В контрольном образце питательной среды без сыворотки лошади к 12 часам культивирования количество бактерий в среде составило 5,62±0,2 lg КОЕ/см³.

Таким образом было определено процентное содержание сыворотки лошади в питательной среде, которое оказывает стимулирующее действие на рост бактерий *E.rhusiopathiae*. Оптимальное содержание данного компонента в среде составляет 10%.

■ Заключение

В ходе проведенных исследований был оптимизирован процесс культивирования бактерий *E.rhusiopathiae* с использованием ряда питательных сред.

Результаты исследования таких параметров, как продолжительность экспоненциальной фазы, накопление микробных клеток и время культивирования, указывают на дальнейшее перспективное использование питательной среды на основе сердечно-мозгового бульона.

Определено оптимальное содержание сыворотки крови лошади в питательной среде, которое составляло 10% от общего объема среды.

Литература

1. Бакулов И.А., Ведерников В.А., Семинихин В.А. Рожа свиней// Эпизоотология с микробиологией: Учебник и практикум. М.: Колос, 1997. 480 с.

2. Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Шепелин А.П., Алешкин В.А. Состояние и тенденции развития клинической и санитарной микробиологии в Российской Федерации и проблема импортозамещения. Клиническая лабораторная диагностика, 2015. №8. <https://cyberleninka.ru/article/n/sostoyanie-i-tendentsii-razvitiya-klinicheskoy-i-sanitarnoy-mikrobiologii-v-rossiyskoy-federatsii-i-problema-importozamescheniya>.

3. Евглевский А.А., Будкин Е.И., Ситникова О.Б., Петров Г.Е., Попов В.С. Проблемы инфекционной патологии свиней в современных условиях. Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2014. №2. <https://cyberleninka.ru/article/n/problemy-infektsionnoy-patologii-sviney-v-sovremennyh-usloviyah>.

4. Краснопольский Ю.М., Борщевская М.И. Технология производства иммунобиологических препаратов. Фармацевтическая биотехнология, 2009.

5. Кузьменко М.А., Цатурян Л.Г., Скляр О.Д., Пивоварова О.С. Характеристика некоторых производственных и контрольных штаммов *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Ветеринарный врач, 2022. №4. <https://cyberleninka.ru/article/n/harakteristika-nekotorykh-proizvodstvennykh-i-kontrolnykh-shtamov-erysipelo-thrix-rhusiopathiae>.

6. Н.И. Дубакин. Антиген для диагностики рожи свиней. Патент №117052. Изобретение разработано в окружной военно-ветеринарной лаборатории №419 МВО/Н.И. Дубакин, А.Э. Левенштерн. 29 мая 1957 года. №573881/30 в Комитете по делам изобретений и открытий при Совете Министров СССР.

7. Потехин А.В., Шадрова Н.Б., Прунтова О.В., Русалеев В.С., Евграфова В.А. Биохимические, антигенные и протеомические свойства российских и белорусских изолятов возбудителя инфекционного ринита кур *Avibacterium paragallinarum* (Biberstein and White, 1969). Сельскохозяйственная биология, 2020. №4. <https://cyberleninka.ru/article/n/biohimicheskie-antigennye-i-pro>

teomicheskie-svoystva-rossiyskih-i-belorusskih-izolyatov-vozbuditelya-infektsionnogo-rinita-kur.

8. Семенов С.В. Проведение ветеринарных профилактических мероприятий в свиноводстве. Сельскохозяйственные науки и агропромышленный комплекс на рубеже веков, 2013. №4. <https://cyberleninka.ru/article/n/provedenie-veterinarnyh-profilakticheskikh-meropriyatiy-v-svinovodstve>.

9. Фирсова М.С., Евграфова В.А., Потехин А.В. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum*. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2019-2-29-12-16>.

10. Шепелин А.П., Домотенко Л.В., Дятлов И.А., Миронов А.Ю., Алешкин В.А. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области

производства питательных сред. Клиническая лабораторная диагностика, 2015. №6. <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennye-podhody-k-probleme-importozamescheniya-v-oblasti-proizvodstva-pitatelnyh-sred>.

11. Шепелин А.П., Полосенко О.В., Марчихина И.И., Шолохова Л.П., Ажермачева Н.И., Ершова М.Г., Плетяева Е.Д. Клинические испытания питательных сред для накопления сальмонелл. Клиническая лабораторная диагностика, 2018. №9. <https://cyberleninka.ru/article/n/klinicheskie-ispytaniya-pitatelnyh-sred-dlya-nakopleniya-salmonell>.

12. S.M. Deshmukh. Update on infectious coryza in birds: New trends in epidemiology, etiological characteristics, diagnostics, therapeutic and preventive achievements/S.M. Deshmukh, H.S. Banga, S. Sodhi, R.S. Brar.

J. Dairy Vet. Anim. Res., 2015. Vol. 2(3). P. 86–92. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2015.02.00037>.

13. Bender J.S., Irwin K.K., Shen H.G., Schwartz K.J., Oprissnig T. Genotypes, serotypes and surface protective antigen types of *Erysipelothrix* spp. associated with slaughterhouse condemnation. J. Vet. Diagn. Invest., 2011. 23(1):42–139. DOI: 10.1177/104063871102300126.

14. Van K., Chang B.J., Riley T.V. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Veterinary Microbiology, 2010. 140(3–4): 17–405. DOI: 10.1016/j.vetmic.2009.08.012. PMID: 19733019.

15. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток/Пер. с англ. М.: Мир, 1978.

16. Ж.Дж. Берман. Таксономическое руководство по инфекционным заболеваниям/Ж.Дж. Берман. 2012. С. 61–63.



ШЕЛКОВСКИЙ БИОКОМБИНАТ

СОЗДАВАЯ ЗДОРОВОЕ БУДУЩЕЕ!

ПЕСТИСТОП

Вакцина против классической чумы свиней
культуральная живая сухая



Преимущества:



Надежна и нереактогенна для свиней любого возраста, в том числе супоросных свиноматок и новорожденных поросят



Защита против классической чумы свиней до 12 месяцев



Отвечает требованиям ВОЗЖ



www.biocombinat.ru



E-mail: comerc@biocombinat.ru



+7 495 134-58-85