

СИЗОНЕНКО
Марина Николаевна

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
НОВЫХ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА ЛИСТЕРИЙ
ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЛИСТЕРИОЗА
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

06.02.02 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология
03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена
в ФГАОУ ВО «Северо-Кавказский федеральный университет»

Научные руководители:

доктор ветеринарных наук, профессор **Тимченко Людмила Дмитриевна**
доктор ветеринарных наук **Заерко Виктор Иванович**

Официальные оппоненты:

Васильев Дмитрий Аркадьевич – доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина», заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы.

Телишевская Любовь Яковлевна – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», ведущий научный сотрудник отдела безопасности кормов и кормовых добавок.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2018 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И.Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел. (495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

Ездакова Ирина Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Технология изготовления бактериальных вакцин – многопрофильный процесс, складывающийся из различных этапов, направленных на получение эффективных ветеринарных биопрепаратов (Павленко И.В., 2003). Несмотря на устоявшиеся технологические регламенты и четко отработанные механизмы производства вакцин, как в процессе культивирования, так и на этапе сублимационного высушивания возникают определенные трудности, в том числе касающиеся и «Вакцины сухой, живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма “АУФ”» (Светлакова Е.В., 2003; Павленко И.В., 2013). Культивирование микроорганизмов является основополагающим элементом получения бактериальных препаратов на всех этапах их промышленного производства – от поддержания штамма до получения биомассы. Однако нестандартность и ухудшение качества питательных сред сказываются на снижении объемов наращиваемой бактериальной массы, необходимой для производства биопрепаратов (Рябов В.Г., Генкель В.К., Волкова Н.В., 1996; Геладзе В.Ш., Ситьков В.И., Заерко В.И. и др., 1998; Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э., 2002; Султанов З.З., 2008; Waguespack M., 1986; Corrigan P.J., Seneviratna P., 1989). Решение проблемы повышения эффективности производственного культивирования микроорганизмов видится в использовании стимуляторов роста, о действии которых сообщается рядом исследователей (Тутов И.К., Ситьков В.И., 1998; Олиферова Э.В., 2000; Веревкина М.Н., Дмитриев А.Ф., 2004; Панова Н.В., 2006; Ткаченко И.Н., 2009; Пенькова Н.И., 2010; Телишевская Л.Я., Букова Н.К., Комаров А.А., Ночевный В.Т., 2016; Macfarlane D.E., Elian-Jones T.E., 1980). В то же время немногочисленность сообщений о стимуляторах роста листерий оставляет проблему их разработки и использования в процессе производства бакпрепаратов актуальной.

Производство живых вакцин сталкивается с проблемой снижения жизнеспособности микроорганизмов при сублимационном высушивании, что актуально и для листерий (Светлакова Е.В., 2003; Павленко И.В., 2003; Павленко И.В., Раевский А.А., Нежута А.А., Дадасян А.Я., 2011). Данная проблема может быть решена путем разработки и оптимизации защитных сред высушивания (Нежута А.А., Токарик Э.Ф., Самуйленко А.Я. и др., 2002; Балинер Л.М., 2003; Павленко И.В., 2003; Светлакова Е.В., 2003), в том числе за счет добавления к ним различных веществ, зачастую являющихся составными компонентами известных стимуляторов роста.

Все вышеизложенное обуславливает актуальность тематики исследований и диктует необходимость разработки новых эффективных стимуляторов роста,

обеспечивающих повышение количества биомассы листерий при их производственном культивировании, а также изучения их влияния на жизнеспособность листерий в составе защитной среды высушивания.

Степень разработанности темы. Разработке и апробации в промышленных условиях стимуляторов роста листерий посвящены немногочисленные работы следующих авторов: Л.И. Трусовой, Л.Я. Телишевской (1973), В.И. Заерко, Н.И. Каменского (1995), И.К. Тутова, В.И. Ситькова (1998), М.Н. Веревкиной (2000), Е.В. Светлаковой (2003), Н.В. Пановой (2006). При этом мнения об эффективности данных стимуляторов роста разноречивы, что открывает перспективы для дальнейшего поиска наиболее эффективных стимулирующих добавок, положительно влияющих на широкий спектр показателей адаптационного потенциала микроорганизмов и позволяющих повысить выход их биомассы. В качестве стимулирующих компонентов для микроорганизмов отдается предпочтение веществам различной природы, среди которых представляют интерес пептидные комплексы, фрагменты нуклеиновых кислот и биогенные стимуляторы (Грачева И.М., Гаврилова Н.М., Иванова Л.А., 1980; Мосичев М.С., Складнев А.А., Котов В.Б., 1982; Смирнова Г.А., Раскин Б.М., Мельникова В.А., Целигорова Е.Л., 1985; Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э., 2002; Панова Н.В., 2006; Ткаченко И.Н., 2009; Павленко И.В., 2013; Телишевская Л.Я., Букова Н.К., Комаров А.А., Ночевный В.Т., 2016; Siddiqi R., Khan M.A., 1982; Amezaga M.R., Davidson I., McLaggan D. et al., 1995). На этапе лиофилизации с целью повышения жизнеспособности микроорганизмов предлагается вносить в защитные среды высушивания широкий перечень веществ (Самуйленко А.Я., Рубан Е.А., 2000; Нежута А.А., Токарик Э.Ф., Самуйленко А.Я., 2002; Franks F., 1977). При этом Б.И. Бланков, Д.Л. Клебанов (1961), Т. Морити (1969), А. Ergun, Н. Girgin, D. Eren (1982/1983) обращают внимание на защитное действие пептидов, входящих в состав различных субстанций.

Известны немногочисленные разработки И.В. Павленко (2003), И.В. Павленко, А.А. Раевского, А.А. Нежуты, А.Я. Дадасян (2011) и Е.В. Светлаковой (2003) в области усовершенствования процесса сублимационного высушивания листерий. Так, Е.В. Светлакова (2003) сообщает о стимуляторе роста на основе чайного гриба, добавление которого эффективно на разных этапах производственного цикла как при культивировании, так и при сублимационном высушивании листерий. Наряду с вышеизложенным эти исследования позволяют прогнозировать возможность такого же действия наиболее эффективных из разрабатываемых нами стимуляторов роста листерий при производстве вакцины.

Цель исследования: разработать стимуляторы роста листерий на основе природного сырья и оценить эффективность их использования в процессе приготовления вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.

Задачи исследования:

1. Изучить ростостимулирующий эффект по отношению к *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ» гидролизатов, изготовленных из яблок, зебрины повислой, эмбрионально-яичной массы перепелов.

2. Изыскать рациональные пути получения эффективного стимулятора роста листерий из эмбрионально-яичной массы перепелов «СРМП», направленные на оптимизацию набора и количественного содержания биологически активных веществ, обладающих ростостимулирующими свойствами по отношению к микроорганизму.

3. Определить оптимальную стимулирующую дозу ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов и СРМП.

4. Изучить биологические свойства *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ» при добавлении ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов и СРМП к производственной питательной среде.

5. Применить наиболее эффективные из полученных стимуляторов роста на разных этапах культивирования листерий при изготовлении экспериментальной серии вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных и оценить ее качество.

6. Исследовать жизнеспособность листерий при добавлении СРМП к защитной среде высушивания при изготовлении вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.

Научная новизна работы. Доказано, что ферментативный гидролизат из эмбрионально-яичной массы перепелов по сравнению с гидролизатами из яблок и зебрины повислой обладает более высоким стимулирующим действием по отношению к *Listeria monocytogenes*.

Впервые на основе инкубационного перепелиного яйца с использованием рациональных технологических приемов его переработки, направленных на получение биологически активной субстанции, содержащей комплекс компонентов, в том числе низкомолекулярных, а именно пептидов, фрагментов нуклеиновых кислот, биогенных стимуляторов, аминокислот, а также микро-, макроэлементов и витамина В₁, разработан новый эффективный стимулятор роста листерий «СРМП».

Разработана эффективная технология применения озона в биотехнологическом цикле получения стимулятора роста листерий «СРМП» с целью дезинфекции сырьевого объекта, а также повышения в нем количества белка, как предшественника многих биологически активных веществ, и нуклеиновых кислот, обуславливающих

качество итогового препарата.

Впервые подтверждено выраженное стимулирующее действие СРМП в количестве 1% к объему среды по отношению к *Listeria monocytogenes* при сохранении ее биологических свойств, что обуславливает целесообразность использования данного стимулятора на всех этапах культивирования микроорганизма при производстве вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.

Установлено, что вакцина против листериоза сельскохозяйственных животных, полученная из биомассы, выращенной на питательной среде с использованием стимулятора роста листерий «СРМП» на всех этапах культивирования, отвечает всем требованиям нормативной документации по изготовлению и проверке качества вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных (Технологический регламент по изготовлению и контролю вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ», СТО №00482861–0079–2012 Ставропольской биофабрики).

Доказано положительное влияние СРМП при добавлении к защитной среде высушивания на жизнеспособность листерий в вакцине против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» при ее лиофилизации и хранении, при соответствии вакцины всем нормативным требованиям.

Приоритетность выполненных исследований подтверждена патентами №2525637 РФ от 23.06.2014 «Питательная среда плотная для культивирования возбудителя листериоза», №2535980 РФ от 20.10.2014 «Способ получения стимулятора роста *Listeria monocytogenes* из активированной эмбрионально-яичной массы перепелок».

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследований вносят определенный вклад в микробиологическую и биотехнологическую науку, в частности в разделы о культивировании микроорганизмов, питательных средах, источниках сырья для биотехнологических целей и управлении его качеством. Полученные стимуляторы роста могут быть использованы для получения биомассы микроорганизмов, в частности листерий, на любом этапе культивирования на предприятиях микробиологической промышленности и в лабораторной работе микробиологов. Данные о влиянии озонирования на перепелиный эмбрион в процессе инкубации могут быть использованы в биотехнологических целях. Стимулятор роста листерий «СРМП» может быть применен для повышения жизнеспособности бактерий в процессе лиофильной сушки вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных путем его добавления к защитной среде высушивания вакцины. Представленные выше рекомендации и материалы диссертации используются в

процессе научной и производственной деятельности, внедрены и подкреплены актами о внедрении следующих организаций: ФГУП «Ставропольская биофабрика», проблемная научно-исследовательская лаборатория экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии НИИ прикладных биотехнологий Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета, ООО НПО «СайТЭК», бактериологический отдел клинко-диагностической лаборатории ГБУЗ СК «ГДП №3». Результаты исследований внедрены и используются в учебном процессе Северо-Кавказского федерального университета на кафедре ботаники, зоологии и общей биологии при проведении лабораторных занятий по дисциплине «Микробиология»; Ставропольского государственного аграрного университета при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий на кафедре эпизоотологии и микробиологии; Чеченского государственного университета при чтении лекций и проведении лабораторных занятий по дисциплинам «Частная микробиология», «Медицинская микробиология», «Промышленная микробиология», «Физиология роста микроорганизмов», «Основы биотехнологии»; Чеченского государственного педагогического университета при проведении занятий по дисциплинам «Микробиология», «Основы биотехнологии», «Экология микроорганизмов». Результаты исследований по действию озона на перепелиный эмбрион в процессе инкубации использованы в базовой части государственного задания №2014/216 по теме «Разработка технологий комплексных ветеринарных биопрепаратов на основе экологически чистого регионального сырья животного, растительного и микробного происхождения» в 2014–2016 годах и положены в основу патента №2504359 РФ от 20.01.2014 «Регенерирующая композиция для ухода за кожей».

Методология и методы исследования. При выполнении работы применен стандартный общепринятый комплекс методов: бактериологических, биотехнологических, гистологических, гематологических, морфометрических, физико-химического контроля, световой микроскопии, контроля качества вакцины согласно СТО №00482861–0079–2012. Используются оригинальные методы, такие как озонирование инкубационных яиц и гомогенизация эмбрионального сырья под высоким давлением. Применены общепринятые методы научного познания: синтез, анализ, взаимосвязь, взаимообусловленность, измерение, интерпретация, обобщение, сравнение, наблюдение. Для обеспечения достоверности и объективности использованы статистические и математические методы обработки полученных данных.

Положения, выносимые на защиту:

1. Гидролизаты, изготовленные на основе яблок, зебрины повислой и эмбрионально-яичной массы перепелов, обладают в разной степени выраженным стимулирующим эффектом по отношению к *Listeria monocytogenes* за счет комплекса биологически активных соединений, как имеющихся в составе сырья, так и полученных в результате технологических манипуляций. Наибольший стимулирующий эффект отмечен при использовании препарата «СРМП», что позволяет рекомендовать его для вакцинного производства.

2. Предложенный комплекс биотехнологических манипуляций позволил получить биологически активный препарат «СРМП», содержащий в своем составе пептиды, фрагменты нуклеиновых кислот, аминокислоты, а также микро-, макроэлементы, витамин В1, биогенные стимуляторы, обеспечивающие его стимулирующие свойства в дозе 1% на всех этапах культивирования листерий при изготовлении вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, при сохранении основных биологических свойств микроорганизма.

3. Препарат «СРМП» целесообразно использовать в составе среды высушивания вакцины для повышения жизнеспособности *Listeria monocytogenes* как во время сублимационного высушивания, так и в процессе хранения вакцины.

Степень достоверности. Исследования выполнены в лабораторных условиях на откалиброванном сертифицированном оборудовании с использованием стандартизированных реактивов и общепринятых методик. Полученные результаты обработаны с помощью программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

Апробация результатов. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ РАН (г. Ростов-на-Дону, 2010 г., 2011 г.); на Международной научно-практической интернет-конференции «Управление функциональными системами организма» (г. Ставрополь, 2010 г.); на 17-й Всероссийской научно-методической конференции по патологической анатомии животных «Современные проблемы патологической анатомии, патогенеза и диагностики болезней животных» (г. Москва, 2011 г.); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2012 г.); на Международной научно-практической конференции «Современные проблемы теории и практики инновационного развития АПК» (г. Нальчик, 2011 г.); на IV Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (г. Ростов на Дону, 2011 г.); на VII Международной научно-практической конференции

«Перспективные исследования науки и техники» (Польша, г. Пшемысль, 2011 г.), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных» (г. Ставрополь, 2012 г.); на Международной научной интернет-конференции «Физико-химическая биология» (г. Ставрополь, 2012 г., 2014 г.); на научно-практической конференции с международным участием «Инновации молодых ученых» (г. Ставрополь, 2012 г.); на IV съезде ветеринарных фармакологов и токсикологов России «Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации» (г. Москва, 2013 г.); на IV Международной научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии» (г. Минск – г. Ставрополь, 2014 г.); на II Международной студенческой научно-практической конференции «Биотехнология: взгляд в будущее» (г. Ставрополь, 2016 г.); на VI Международной научно-практической конференции «Современные достижения биотехнологии. Новации пищевой и перерабатывающей промышленности» (г. Ставрополь, 2016 г.); на научно-практической конференции молодых ученых ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (г. Ставрополь, 2017 г.). Разработанные стимуляторы роста микроорганизмов были представлены на XIII Международной специализированной выставке «Мир биотехнологии – 2015» (г. Москва, 2015 г.), награждены дипломом и золотой медалью.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа является результатом научных исследований соискателя. Сбор и анализ литературы, планирование, организация и проведение исследований, а также статистическая обработка результатов выполнялись автором лично. Доля участия соискателя при выполнении работы составляет 85%.

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 25 печатных работ, в том числе 5 – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени, 3 патента на изобретение РФ и монография.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 158 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 22 рисунками, в том числе 6 микрофотографиями, 18 таблицами. Работа состоит из введения, глав обзора литературы, собственных исследований, а также заключения, выводов, практических предложений, списка сокращений и условных обозначений и

приложений. Список использованной литературы содержит 288 источников, в том числе 67 – зарубежных авторов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по диссертационной работе проводились в период с 2010 по 2017 годы на кафедре прикладной биотехнологии, кафедре ботаники, зоологии и общей биологии, на базе лаборатории экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета, в условиях ФКП «Ставропольская биофабрика» и ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт». В работе использована производственная документация ФКП «Ставропольская биофабрика» и ФГБУ «Центр ветеринарии».

Для изготовления ферментативных гидролизатов использовали следующее сырье: инкубационные яйца перепелов породы Фараон (внеэмбриональные и эмбриональные ткани), культивируемое в лабораторных условиях декоративное растение зебрина повислая (*Zebrina pendula*), яблоки сезонные. Инкубацию перепелиных яиц осуществляли в инкубаторе ИЛБ-0,5 (Россия) в течение 8 суток.

Для повышения биотехнологических потенциалов сырья использовали методику получения тканевых препаратов по В.П. Филатову (1955). Гидролизаты готовили по методике Ю.А. Козлова (1950). Аминный азот определяли в соответствии с МУК 4.2.2316–08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Сухой остаток определяли с помощью анализатора влагосодержания MB 25 Ohaus (Швейцария). Анализ микро- и макроэлементов проводили методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на приборе ААС марки Perkin Elmer 2280 (США) (Ягодин Б.А., Дерюгин И.П., Жуков Ю.П., 1987). Анализ свободных аминокислот осуществляли методом тонкослойной хроматографии (Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч., 1980). Витамины выявляли с помощью качественных реакций (Полюдек-Фабини Р., Бейрих Т., 1981).

Для изготовления нового стимулятора роста листерий «СРМП» использовали инкубационные яйца перепелов породы Фараон (внеэмбриональные и эмбриональные ткани), инкубированные в течение 8 суток. Озонирование перепелиных яиц проводили при помощи бытового озонатора «Гроза» (Россия). Гомогенизацию содержимого яиц проводили на лабораторном миксере Sterilmixer 12 (PVI, Италия) и гомогенизаторе высокого давления APV Lab Series Homogenizers 2000 (Германия). В процессе изготовления СРМП использован кислотный гидролиз с помощью соляной

кислоты с концентрацией 0,5% в объеме субстанции. Биологическую активность промежуточной субстанции, отражающую наличие биогенных стимуляторов, оценивали способом К. Бакирджиева (Калашник И.А., 1990). Исследование бактерицидного действия озона на микрофлору скорлупы перепелиных яиц осуществляли в процессе их инкубации согласно «Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях» (1990). Оценку влияния озона на перепелиные эмбрионы проводили с помощью измерения их массы на электронных весах ВЛТЭ-150 (Россия), длины тела электронным штангенциркулем ЩЦЦ-II 0–250 0,01 (Россия), вычислением индекса Кетле I (Трунова А.П., 2008), гистологическими исследованиями (Сулейманов С.М., Паршин П.А., Жарова Ю.П., 2000). Фотографирование гистологических препаратов осуществляли при помощи комплекса визуализации изображения на базе микроскопа «Микмед-2» (Россия) и цифровой фотокамеры «Olympus-5060» (Япония).

В промежуточных и итоговой субстанциях определяли общий азот и содержание пептидов по методикам, изложенным в ГОСТ 13805–76, содержание белков (Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К., 1991), количество РНК и ДНК – при помощи флуориметра Qubit 2.0, Life Technologies (США). Размер частиц в субстанциях определяли с помощью анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания). В итоговом препарате определяли аминный азот, сухой остаток, микро- и макроэлементы, витамины (В₁, В₂, РР) по методикам, использованным при оценке качества ферментативных гидролизатов, а аминокислоты – при помощи автоматического анализатора аминокислот ARACUS (ABACUS, Германия).

Микрофотографирование мазков, окрашенных по методу Грама, а также морфологию и размер бактериальных клеток оценивали с помощью программного обеспечения Zen 2012 Pro на бинокулярном микроскопе исследовательского уровня Axio Imager 2 (A2) Carl Zeiss Microscopy (Германия).

Способность сбразивать углеводы, бета-гемолитическую активность листерий и их подвижность определяли по методикам, представленным в МУК 4.2.1122–02, а каталазную активность – в соответствии с методикой, изложенной в ГОСТ 30425. Изготовление вакцин против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» и контроль их качества осуществляли согласно ТР 00482861–0061–2009 «Технологический регламент по изготовлению и контролю вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма “АУФ”» и СТО №00482861–0079–2012. Данные, полученные в ходе экспериментов, обработаны с помощью программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Приготовление гидролизатов из зебрины повислой, яблок, эмбрионально-яичной массы перепелов, их состав и апробация в качестве стимуляторов роста листерий

Зебрина повислая, яблоки, инкубационные перепелиные яйца подвергались ферментативному гидролизу с использованием панкреатина. Предварительно зебрину повислую и восьмисуточные инкубационные яйца активировали по методу В.П. Филатова путем помещения в холодильную камеру для выработки биогенных стимуляторов. Наиболее высокий уровень аминного азота отмечен у ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов ($151,3 \pm 4,3$ мг%), а сухой остаток – у яблок ($6,0 \pm 0,2$). В десяти пробах каждого гидролизата был определен уровень наиболее значимых для метаболизма микроорганизмов микро- и макроэлементов (Таблица 1).

Таблица 1 – Микро- и макроэлементный состав гидролизатов (M \pm m)

Наименование гидролизата	Микро- и макроэлементы (мкг/мл)								
	Zn	Fe	Cu	Mn	Co	Ca	Na	K	Mg
ФГ из зебрины повислой	0,3 \pm 0,06	-	-	0,3 \pm 0,08	-	0,7 \pm 0,06	359,4 \pm 7,0	1320,5 \pm 6,1	33,1 \pm 0,6
ФГ из яблок	5,6 \pm 0,19	3,3 \pm 0,14	-	0,5 \pm 0,07	-	43,5 \pm 0,5	687,2 \pm 6,2	1276,2 \pm 8,5	20,4 \pm 0,4
ФГ из эмбрионально-яичной массы перепелов	0,2 \pm 0,07	2,3 \pm 0,17	0,10 \pm 0,05	-	-	6,9 \pm 0,2	408,6 \pm 4,7	750,5 \pm 8,0	32,2 \pm 0,8

Установлено наличие витаминов В₁, В₂ и РР в гидролизате из эмбрионально-яичной массы перепелов. В гидролизате из яблок отмечено наличие витаминов В₁ и В₂. В гидролизате из зебрины повислой обнаружены витамины В₂ и РР. Во всех пробах гидролизатов обнаружены аминокислоты: аспарагин, аспарагиновая кислота, валин, лизин, цистин, треонин, изолейцин, аргинин, метионин, а в ферментативных гидролизатах из яблок и зебрины повислой – еще и глутаминовая кислота. Особенности физико-химического состава всех полученных гидролизатов обуславливают их потенциальные свойства как стимуляторов роста микроорганизмов, что позволяет прогнозировать их эффективность в процессе культивирования не только листерий, но и широкого спектра других микроорганизмов. Для апробации полученных гидролизатов в качестве стимуляторов роста микроорганизмов было изучено их стимулирующее действие на *Listeria monocytogenes* (Таблица 2). Гидролизаты добавляли непосредственно к агару Хоттингера в дозе 1%.

Из результатов Таблицы 2 видно, что при добавлении к питательной среде гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов количество колоний *L. monocytogenes* увеличилось на 25,4% по сравнению с контролем. Ферментативные гидролизаты из зебрины повислой и яблок оказали более слабое стимулирующее действие, количество колоний на питательной среде с добавлением гидролизатов

увеличилось по сравнению с контролем на 12,9% и 9,0% соответственно.

Таблица 2 – Ростовые качества питательных сред с добавлением ферментативных гидролизатов ($M \pm m$)

Питательная среда	Количество чашек Петри	КОЕ <i>Listeria monocytogenes</i> , выросшие при посеве 100 м.к.
Агар Хоттингера с ФГ из зебрины повислой	5	74,3±2,3*
Агар Хоттингера с ФГ из яблок	5	71,7±2,1*
Агар Хоттингера с ФГ из эмбрионально-яичной массы перепелов	5	82,5±2,8*
Контроль (агар Хоттингера)	5	65,8±1,8

Примечание: * ($P \leq 0,05$) – статистически достоверные результаты по отношению к контролю. Эксперимент проводился в десяти повторах.

Таким образом, инкубационные перепелиные яйца являются наиболее перспективным сырьем для приготовления стимулятора роста микроорганизмов. Однако, по нашему мнению, для полного раскрытия всех биологических потенций данного сырья необходимо проведение дополнительных биотехнологических манипуляций, позволяющих получить максимальное количество известных и новых биологически активных веществ со стимулирующим эффектом.

Экспериментальное обоснование применения метода озонирования для повышения качества эмбрионально-яичной массы перепелов

Технологические манипуляции при разработке нового стимулятора роста листерий были направлены, в первую очередь, на получение и повышение в препарате количества биологически активных веществ с потенциальным стимулирующим эффектом, к которым помимо биогенных стимуляторов отдельные авторы относят пептиды, нуклеиновые кислоты и их фрагменты. На этапе работы с сырьем был поставлен ряд задач, решение которых, на наш взгляд, может способствовать повышению качества стимулятора роста листерий. Первая задача – повышение биотехнологических потенций сырья за счет повышения выживаемости эмбрионов и накопления в них белка – источника пептидов, а также других биологически активных веществ, в частности нуклеиновых кислот и биогенных стимуляторов. Вторая задача – обеспечение чистоты сырья на протяжении всей инкубации яиц. Для решения данных задач был подобран комплекс методов прижизненного воздействия на эмбрион, складывающийся из примененного на разных этапах инкубации озонирования и получения биогенных стимуляторов по В.П. Филатову. Выбор озона обусловлен многочисленными сообщениями о его микробоцидном эффекте, а также биостимулирующем действии на эмбрионы птиц. При этом отсутствуют данные о дозах озона, оказывающих одновременно микробоцидный и биостимулирующий эффект на перепелиный эмбрион.

Установлено, что пятикратное озонирование перепелиных яиц (до инкубации и

на 3-и, 5-е, 7-е, 8-е сутки инкубации) в течение 15 минут (производительность озона 300 мг/ч) в закрытом полиэтиленовом мешке объемом 35 л является эффективным приемом, обеспечивающим обеззараживание их скорлупы и исключающим дальнейшее ее обсеменение на всех этапах инкубации. При этом озон в выбранной схеме не оказал негативного влияния на выживаемость и развитие перепелиного эмбриона. На тотальных поперечных серийных гистологических срезах эмбрионов не установлено каких-либо признаков нарушения развития. Значения индекса Кетле I, позволяющего оценивать пропорциональность развития у озонированных эмбрионов, не выходят за пределы значений этого критерия у неозонированных. Кроме того, отмечено биостимулирующее действие озона в выбранной схеме, заключающееся в увеличении длины на 7,1% и массы тела на 8,7% у эмбрионов, подвергавшихся озонированию, по сравнению с неозонированными. После озонирования в гомогенате из эмбрионов повысилось количество общего азота на 17,4%, свободного белка – на 12,6%, пептидов – на 21,8%, РНК – на 13,8% и ДНК – на 16,9% по сравнению с гомогенатом из эмбрионов неозонированных яиц. Таким образом, озонирование перепелиных эмбрионов по выбранной схеме в качестве биотехнологического приема целесообразно при изготовлении стимулятора роста листерий.

**Технология приготовления нового стимулятора роста листерий
из эмбрионально-яичной массы перепелов «СРМП»
и его качественные характеристики**

В основу технологии СРМП положено несколько принципов, в частности многоуровневое обеспечение стерильности препарата, оптимизация ростовых процессов перепелиных эмбрионов, заключающаяся в повышении выхода белковой массы и нуклеиновых кислот в сырье, трансформация полученных белковых соединений в пептиды, высвобождение из клеток нуклеиновых кислот и их дефрагментация.

Технология приготовления СРМП включает в себя три этапа.

Первый этап представлен:

- озонированием перепелиных яиц в процессе инкубации, итогом чего является повышение уровня белка – источника пептидов и уровня нуклеиновых кислот, а также первичной дезинфекцией яиц с учетом высокой вероятности обсемененности сырья;
- воздействием на перепелиный эмбрион жизненно неблагоприятных факторов для накопления в его тканях биогенных стимуляторов.

В соответствии с отработанной схемой яйца озонировали, после чего выдерживали в холодильной камере при температуре 2–4°C в течение 7 суток. Данный прием позволил повысить биологическую активность промежуточной субстанции на 16%

за счет образования биогенных стимуляторов.

Второй этап представлен:

– гомогенизацией и диспергированием эмбрионально-яичной массы перепелов с целью разрушения клеток для повышения в промежуточной субстанции уровня биологически активных соединений (пептидов, нуклеиновых кислот), а также для дополнительного обеспечения ее чистоты;

– кислотным гидролизом для дополнительного расщепления белковых соединений и нуклеиновых кислот с целью повышения уровня пептидов и нуклеотидов (нуклеозидов), а также обеспечения прозрачности препарата.

Скорлупу яиц обрабатывали спиртовым раствором йода, облучали в течение 15 минут УФЛ. Далее яйца вскрывали, их содержимое гомогенизировали в течение 5 минут на лабораторном миксере при 12500 об/мин. Полученную после первичной гомогенизации массу смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1:3 для уменьшения вязкости раствора, после чего пятикратно измельчали на гомогенизаторе высокого давления при 1000 атмосфер. После гомогенизации под высоким давлением в субстанции исчезли частицы размером выше 1000 нм. Уменьшение количества пиков размерности частиц на графике с трех (до гомогенизации) (Рисунок 1) до двух (после гомогенизации) (Рисунок 2) свидетельствует о повышении однородности субстанции.

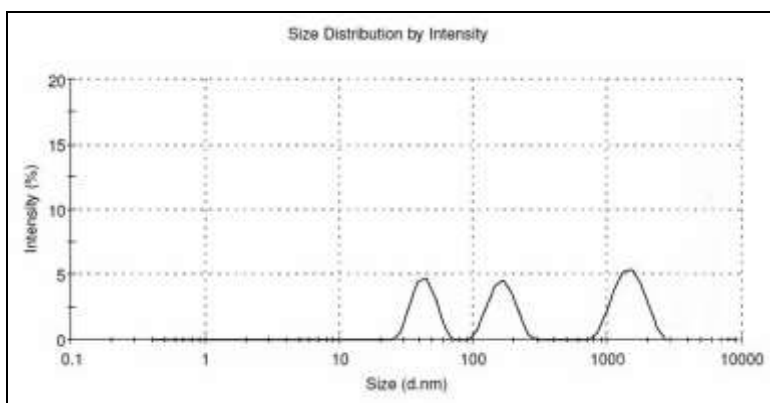


Рисунок 1 – Размер частиц субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов до гомогенизации под высоким давлением

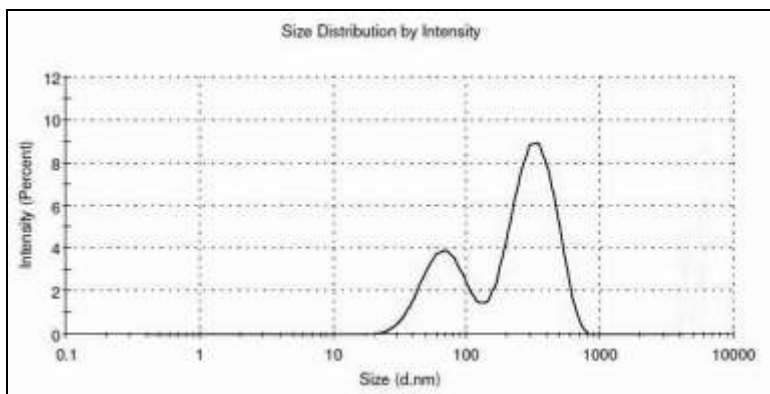


Рисунок 2 – Размер частиц субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов после гомогенизации под высоким давлением

Субстанция после вторичной гомогенизации представляет собой непрозрачную жидкость желто-розового цвета с мелкозернистым осадком. Учитывая еще достаточ-

ное количество белка в полученной субстанции ($13,4 \pm 0,4$ мг/мл) и ее внешний вид, был дополнительно проведен кислотный гидролиз с учетом рекомендаций И.В. Ржепаковского, С.С. Аванесян, Л.Д. Тимченко (2016) в нашей модификации, которая заключалась в снижении концентрации соляной кислоты в объеме субстанции до 0,5%. Субстанцию автоклавировали при 125°C в течение 30 минут. После этого смесь охлаждали и нейтрализовали 10%-ным раствором NaOH. Полученный гидролизат центрифугировали при 8000 об/мин в течение 15 минут с целью очищения от балластных веществ и фильтровали через бязь.

На третьем технологическом этапе гидролизат фасовали в стерильные флаконы. Итоговая стерильность СРМП достигалась автоклавированием при 120°C в течение 30 минут. Готовый препарат представляет собой стерильную прозрачную жидкость коричневого цвета.

Для подтверждения целесообразности использования комплекса технологических приемов в СРМП проведена оценка физических и химических свойств по следующим показателям: размер частиц, общий азот, аминный азот, свободный белок, пептиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты, микро-, макроэлементы, витамины B_1 , B_2 , РР.

На графике (Рисунок 3), отражающем размер частиц СРМП, пик с максимальной «интенсивностью» находится в диапазоне от 40 до 150 нм.

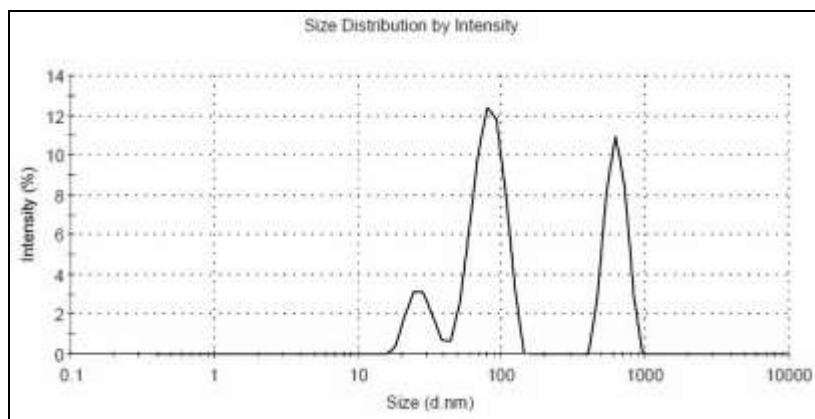


Рисунок 3 – Размер частиц СРМП

Это свидетельствует о дополнительном, по сравнению со степенью измельчения на этапе гомогенизации, уменьшении размеров частиц после кислотного гидролиза. В СРМП количество свободного белка в 24 раза ниже по сравнению с данным показателем до проведения гомогенизации под высоким давлением и кислотного гидролиза, при увеличении количества пептидов в 2,8 раза. Количество РНК и ДНК в препарате снизилось после проведения гидролиза в 4,3 и 2,3 раза соответственно. Сравнение уровня общего азота в субстанции до проведения гомогенизации под высоким давлением ($4,3 \pm 0,1$ мг/мл) и в итоговом препарате ($3,5 \pm 0,1$ мг/мл) свидетельствует о переходе 81,4% азотистых веществ в СРМП, что в целом подтверждает рациональность технологии его изготовления (Таблица 3).

Таблица 3 – Количество общего азота, свободного белка, аминного азота, пептидов, нуклеиновых кислот в СРМП, (M±m)

Количество общего азота, мг/мл	Количество аминного азота, мг/мл	Количество свободного белка, мг/мл	Количество пептидов, мг/мл	Нуклеиновые кислоты	
				РНК, мг/мл	ДНК, мкг/мл
3,5±0,1	0,93±0,03	0,82±0,07	14,6±0,5	0,18±0,01	5,2±0,2

Примечание: Эксперимент проводился в десяти повторях.

Исследование химического состава СРМП показало наличие в нем набора микро- и макроэлементов (Таблица 4), 18 аминокислот (Таблица 5), а также витамина В₁.

Таблица 4 – Содержание микро- и макроэлементов в СРМП, (M±m)

СРМП	Микро- и макроэлементы, мкг/мл								
	Zn	Fe	Cu	Mn	Co	Ca	Na	K	Mg
	0,2±0,09	1,6±0,11	-	-	-	20,5±0,3	353,3±4,2	516,6±5,4	16,1±0,5

Примечание: Эксперимент проводился в десяти повторях.

Таблица 5 – Аминокислотный состав СРМП, (M±m)

СРМП	Аминокислоты		СРМП	Аминокислоты	
		мкг/мл			мкг/мл
	аспарагиновая кислота	450,8±13,6		изолейцин	14,3±0,4
	треонин	22,4±0,7		лейцин	26,9±0,7
	серин	41,6±1,4		тирозин	20,8±0,6
	глутаминовая кислота	86,2±2,8		фенилаланин	18,0±0,6
	глицин	17,9±0,6		гистидин	94,7±2,6
	аланин	27,5±0,8		триптофан	45,9±1,3
	валин	17,2±0,6		лизин	35,0±1,1
	цистеин	0,5±0,02		аргинин	28,2±0,9
	метионин	10,1±0,3		пролин	60,3±1,7

Примечание: Эксперимент проводился в десяти повторях.

Особенности культивирования *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ» с применением гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов и СРМП в процессе производства вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных

Апробацию СРМП в качестве стимулятора роста *Listeria monocytogenes* проводили в сравнении с ферментативным гидролизатом из эмбрионально-яичной массы перепелов (ФГЭП). На первом этапе апробации для ФГЭП и СРМП выявлена оптимальная стимулирующая доза – 1% к объему среды. При этом на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП в этой дозе количество колоний превышает контроль в 1,3 раза, а с добавлением СРМП – в 1,7 раза. На втором этапе исследование эффективности стимуляторов в дозе 1% осуществляли путем культивирования *L. monocytogenes* на флаконах с бульоном Хоттингера с последующим пересевом на агар Хоттингера и подсчетом колоний. При этом число колоний, выросшее на чашках с культурой, культивируемой с добавлением ФГЭП, превышает контроль в 1,9 раза, а с добавлением СРМП – в 2,3 раза (Таблица 6).

Таблица 6 – Ростовые качества бульона Хоттингера с добавлением ФГЭП и СРМП, (M±m)

Посев на агар Хоттингера	Количество чашек Петри с агаром Хоттингера	Количество колоний листерий, выросших из 10 ⁻⁶ разведения
Культура с добавлением ФГЭП (1%)	5	35,1±0,3*
Культура с добавлением СРМП (1%)	5	42,8±0,1*
Контроль – без стимуляторов	5	18,3±0,1

Примечание: * (P<0,05) – статистически достоверные результаты по отношению к контролю. Эксперимент проводился в десяти повторах.

В обоих случаях на бульоне Хоттингера отмечался характерный рост *L. monocytogenes* в виде равномерного помутнения среды. После пересева культуры на агар Хоттингера *L. monocytogenes* образует мелкие, круглые, полупрозрачные, слабывыпуклые, с ровным краем колонии в S-форме, имеющие голубоватый оттенок, что полностью соответствует культуральным свойствам данного микроорганизма (Рисунок 4).

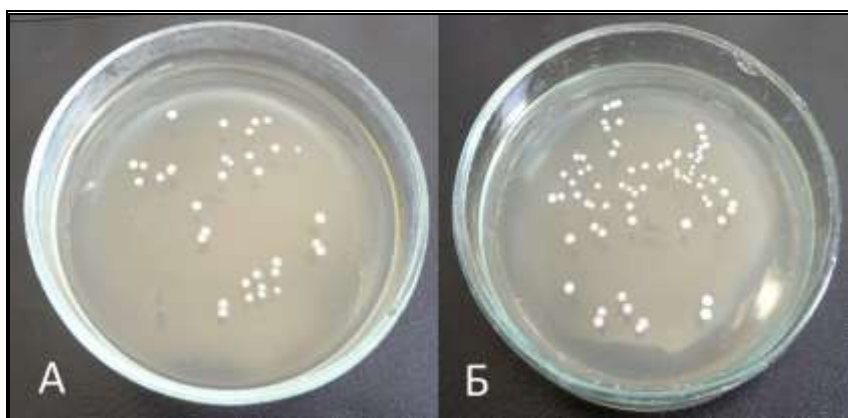


Рисунок 4 – Колонии *L. monocytogenes*. Культивирование на агаре Хоттингера при пересеве культуры с бульона Хоттингера: А – с добавлением ФГЭП; Б – с добавлением СРМП

В мазках, приготовленных с бульона Хоттингера с добавлением ФГЭП, СРМП и без добавок (контроль), *L. monocytogenes* представляет собой грамположительную, прямую или слегка изогнутую палочковидную бактерию с закругленными краями, шириной 0,3–0,5 мкм и длиной 1–2 мкм. Клетки располагаются в препарате параллельно или под углом друг к другу, группами или одиночно, что соответствует морфологическим особенностям бактерии, представленным в определителе Д. Берджи (1997). Культура *L. monocytogenes*, предварительно выращенная на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП, СРМП и без добавок (контроль), на средах Гисса сбраживает с образованием кислоты без газа рамнозу, маннозу, сахарозу, глюкозу, мальтозу, не утилизирует арабинозу, лактозу, маннит, инозит, ксилозу, что является характерными биохимическими свойствами микроорганизма. Исследуемые субстанции не повлияли на каталазоположительность *L. monocytogenes*, что подтверждено качественной реакцией, и на ее подвижность на ПЖА, где культура демонстрирует характерный рост вдоль линии укола. Микроорганизм сохранил гемолитическую активность, о чем свидетельствует образованный им умеренно выраженный гемолиз на кровяном агаре. Таким образом, СРМП на предварительных этапах исследования оказал

более высокий ростостимулирующий эффект, чем ФГЭП, при сохранении основных биологических свойств *L. monocytogenes*, что подтверждает целесообразность использования комплекса технологических приемов при его изготовлении. Это обуславливает выбор СРМП для дальнейшей апробации в качестве стимулятора роста листерий при изготовлении вакцины.

Для получения второй генерации культуру, выросшую на флаконах с бульоном Хоттингера с добавлением СРМП (первая генерация), заседали в баллоны с этой же средой, куда также был добавлен стимулятор в количестве 1%. После посева выросшей культуры на чашки Петри с агаром и подсчета колоний листерий выявлено, что их количество в 1,5 раза выше по сравнению с числом колоний, выросших на среде без добавок (Таблица 7).

Таблица 7 – Ростовые качества бульона Хоттингера с добавлением СРМП при получении второй генерации *Listeria monocytogenes*, ($M \pm m$)

Вариант второй генерации	Вторая генерация на агаре Хоттингера	Количество чашек Петри с агаром Хоттингера	Количество колоний листерий, выросших из 10^{-6} разведения
1	Бульон Хоттингера с СРМП (1%)	5	$34,5 \pm 0,1^*$
2	Контроль – бульон Хоттингера	5	$22,7 \pm 0,2$

Примечание: * ($P < 0,05$) – статистически достоверные результаты по отношению к контролю. Эксперимент проводился в десяти повторях.

Далее баллонную культуру, выращенную на бульоне Хоттингера с СРМП, заседали в ферментер объемом 300 л со средой, содержащей 1% стимулятора. Полученную после культивирования и центрифугирования биомассу листерий взвешивали. Биомасса листерий, выращенная на производственной питательной среде, служившей контролем, составила 600 г (2 г с 1 л), а на среде с добавлением СРМП – 800 г (2,7 г с 1 л), то есть ее прирост составил 25%.

Таким образом, добавление СРМП эффективно на всех этапах культивирования листерий при производстве вакцины. Однако максимальный стимулирующий эффект проявился на начальном этапе культивирования листерий.

Из полученной бактериальной массы были изготовлены опытная и контрольная серии вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, соответствующие всем предъявляемым требованиям нормативной документации. Также СРМП не повлиял на иммуногенность и безвредность вакцины.

Выживаемость листерий и качество вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных при добавлении СРМП к среде высушивания

СРМП использовали для решения проблемы выживаемости микроорганизма при лиофилизации. Для этого его добавляли к готовой многокомпонентной сахарозо-желатиново-пептонно-тиомочевинно-глутаматной среде высушивания в количестве

1% от объема, смешивали с биомассой листерий и подвергали лиофилизации. Установлено, что в контрольной производственной вакцине доля жизнеспособных клеток после сублимации составила 67%, а в опытной – 80%, то есть при добавлении к среде высушивания вакцины СРМП выживаемость листерий после сублимации повысилась на 13%. При этом препарат не оказал негативного влияния на безвредность, иммуногенность вакцины и другие показатели ее качества. Положительные результаты получены по выживаемости микробных клеток в процессе хранения вакцины: к концу срока хранения вакцины (через 12 месяцев) выживаемость листерий в опытной серии была на 13,3% выше по сравнению с производственной серией.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из всех изготовленных стимуляторов роста листерий СРМП является наиболее перспективным. Технологические приемы, используемые при его изготовлении, позволили добиться в составе стимулятора уникального комплекса биологически активных веществ, который делает его применение эффективным на разных этапах производства вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.

ВЫВОДЫ

1. Ферментативные гидролизаты из яблок, зебрины повислой и эмбрионально-яичной массы перепелов обладают в разной степени выраженным стимулирующим эффектом по отношению к *Listeria monocytogenes* за счет содержания комплекса биологически активных веществ. При этом стимулирующее действие гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов на 16,4% выше, чем гидролизата из яблок, и на 12,5% выше, чем гидролизата из зебрины повислой.

2. Разработанный комплекс биотехнологических манипуляций, включающий процесс инкубации перепелиных яиц, управляемый с помощью озонирования, метод получения тканевых препаратов по В.П. Филатову, гомогенизацию под высоким давлением и кислотный гидролиз, позволил изготовить новый эффективный препарат «СРМП» для стимуляции роста листерий, обладающий биогенной активностью и содержащий белково-пептидный комплекс, нуклеиновые кислоты, их фрагменты, 18 аминокислот, 6 микро- и макроэлементов, витамин В₁.

3. Использование в технологическом цикле приготовления СРМП метода озонирования по разработанной методике оказывает бактерицидный эффект на яйца и биостимулирующее действие на перепелиный эмбрион, заключающееся в увеличении его длины, массы, уровня пептидов и нуклеиновых кислот в эмбрионально-яичной массе, а пятикратная гомогенизация под давлением 1000 атмосфер, в сочетании с кислотным гидролизом, позволили повысить в итоговом препарате уровень пептидов в 2,8 раза, а также обеспечили размеры частиц 17–150 и 400–1000 нм.

Уровень нуклеиновых кислот на разных технологических этапах изменчив и в итоговом препарате составил: РНК - $0,18 \pm 0,01$ мг/мл, ДНК - $5,2 \pm 0,2$ мкг/мл.

4. Оптимальной стимулирующей дозой ФГЭП и СРМП является 1% к объему питательной среды. При культивировании листерий на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП количество колоний превышает контроль в 1,3 раза, а с добавлением СРМП – в 1,7 раза.

5. При добавлении ФГЭП и СРМП в дозе 1% к производственной питательной среде субстанции не оказывают негативного влияния на биологические свойства (культуральные, морфологические, тинкториальные, биохимические, гемолитические, подвижность) *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ».

6. На всех этапах культивирования при производстве вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных СРМП оказал стимулирующий эффект на *Listeria monocytogenes*. При глубинном культивировании с СРМП выход общей биомассы листерий увеличился на 25% по сравнению с выходом при использовании производственной питательной среды. Изготовленная опытная серия вакцины соответствует всем предъявляемым требованиям нормативной документации.

7. Добавление 1% СРМП к среде высушивания вакцины повышает жизнеспособность листерий после лиофилизации на 13%, а к концу срока годности вакцины (через 12 месяцев) – на 13,3% по сравнению с этими же показателями при использовании традиционной защитной среды высушивания.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Разработанный стимулятор роста листерий «СРМП» может быть использован на всех этапах культивирования *Listeria monocytogenes* при изготовлении вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных на биопредприятиях для повышения объемов получаемой бактериальной массы.

2. Препарат «СРМП» рекомендуется использовать в качестве добавки к защитной среде высушивания при изготовлении сухой живой вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных для повышения жизнеспособности листерий в процессе лиофилизации и хранения.

3. Материалы диссертационной работы могут использоваться в научных целях, при чтении лекций и проведении лабораторно-практических занятий по микробиологии и биотехнологии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ

1. Сизоненко, М.Н. Озонирование как биотехнологический этап приготовления нового стимулятора роста микроорганизмов «СРМП» / М.Н. Сизоненко, Л.С. Катунина // Ветеринарная патология. – 2013. – №2 (44). – С. 31–35.

2. **Сизоненко, М.Н.** Влияние нового стимулятора роста микроорганизмов «СРМП» на биологические свойства *Listeria monocytogenes* вакцинный штамм «АУФ» / М.Н. Сизоненко, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский // Аллергология и иммунология. – 2013. – Т. 14. – №3. – С. 198.
3. **Сизоненко, М.Н.** Содержание РНК и ДНК в новом стимуляторе роста микроорганизмов «СРМП» / М.Н. Сизоненко, Л.Д. Тимченко // Аллергология и иммунология. – 2014. – Т. 15. – №3. – С. 240.
4. Ржепаковский, И.В. Оценка качества нового тканевого препарата «НИКА-ЭМ» / И.В. Ржепаковский, Л.Д. Тимченко, С.И. Писков, Л.Л. Духина, Д.А. Арешидзе, С.С. Аванесян, **М.Н. Сизоненко**, М.А. Козлова // Ветеринарная патология. – 2016. – №2 (56). – С. 54–60.
5. **Сизоненко, М.Н.** Влияние биологически активных субстанций на основе эмбриональных тканей перепелов на биологические свойства *Listeria monocytogenes* / М.Н. Сизоненко, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, Л.С. Катунина // Ветеринарная патология. – 2017. – №1 (59). – С. 34–39.

Патенты на изобретения

6. Патент №2525637 РФ. Питательная среда плотная для культивирования возбудителя листериоза / Л.С. Катунина, А.Н. Куличенко, И.С. Тюменцева, Е.В. Жданова, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, **М.Н. Сизоненко** и др. // заяв. 12.11.2012, опубл. 20.08.2014. – Бюл. №23.
7. Патент №2535980 РФ. Способ получения стимулятора роста *Listeria monocytogenes* из активированной эмбрионально-яичной массы перепелок / Л.Д. Тимченко, **М.Н. Сизоненко**, И.В. Ржепаковский, И.Н. Ткаченко, В.Н. Вакулин. // заяв. 22.03.2013, опубл. 20.12.2014. – Бюл. №35.
8. Патент №2504359 РФ. Регенерирующая композиция для ухода за кожей / П.А. Омелянчук, С.В. Вилинская, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, В.Н. Вакулин, **М.Н. Сизоненко** // заяв. 21.11.2012, опубл. 20.01.2014. – Бюл. №2.

Монографии

9. Тимченко, Л.Д. Новые ветеринарные препараты на основе эмбриональных тканей птиц / Л.Д.Тимченко, И.В. Ржепаковский, Д.А. Арешидзе, С.И. Писков, **М.Н. Сизоненко**. – Ставрополь: Изд-во ИП Светличная, 2016. – 128 с.

Публикации в других изданиях

10. **Сизоненко, М.Н.** Изучение культуральных и морфологических свойств *Listeria monocytogenes* штамм АУФ под влиянием ферментативного гидролизата на основе *Zebrina pendula* / М.Н. Сизоненко, О.А. Романенко // Тез. докл. VI ежегод. науч. конф. студ. и аспирант. ЮНЦ РАН. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2010. – С. 43–44.
11. Романенко, О.А. Перспективы разработки новых стимуляторов роста микроорганизмов из нетрадиционного биологического сырья / О.А. Романенко, **М.Н. Сизоненко** // Тез. докл. VI ежегод. науч. конф. студ. и аспирант. ЮНЦ РАН. – Ростов-на-

Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2010. – С. 39.

12. Романенко, О.А. Современные проблемы производства бактериальных вакцин / О.А. Романенко, **М.Н. Сизоненко** // Управление функциональными системами организма: Мат-лы Международ. научно-практической интернет конф., посвящен. 80-летию каф. физиологии СтГАУ. – Ставрополь: Изд-во СтГАУ, 2010. – С. 26–28.

13. **Сизоненко, М.Н.** Разработка гидролизатов из нетрадиционного сырья с целью применения их в качестве стимуляторов роста микроорганизмов и оценка их качества / М.Н. Сизоненко, О.А. Романенко // Тез. докл. VII ежегод. науч. конф. студ. и аспирант. ЮНЦ РАН. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 44.

14. **Сизоненко, М.Н.** Исследование биологической активности ферментативных гидролизатов из яблок и зебрины повислой (*Zebrina pendula*) на белых крысах / М.Н. Сизоненко, И.В. Ржепаковский // Современные проблемы патологической анатомии, патогенеза и диагностики болезней животных: Мат-лы 17-й Всеросс. научно-методич. конф. по пат. анатомии животных. – М: Изд-во ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 2011. – С. 196–198.

15. **Сизоненко, М.Н.** Аминокислотный состав ферментативных гидролизатов из нетрадиционного сырья, используемых в качестве стимуляторов роста *Listeria monocytogenes* / М.Н. Сизоненко // Современные проблемы теории и практики инновационного развития АПК: Мат-лы Международ. научно-практической конф. – Нальчик: Изд-во ООО «Полиграфсервис и Т», 2011. – С. 135–137.

16. Тимченко, Л.Д. Перепелиные яйца как новое сырье для приготовления стимуляторов роста микроорганизмов / Л.Д. Тимченко, **М.Н. Сизоненко** // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины: Мат-лы IV Междунар. научно-практ. конф. – Ростов н/Дону: Изд-во СКНЦ ВШ ЮФУ, 2011. – С. 34–35.

17. Тимченко, Л.Д. Содержание микро и макроэлементов в новых стимуляторах роста микроорганизмов из нетрадиционного сырья / Л.Д. Тимченко, В.И. Заерко, **М.Н. Сизоненко**, О.А. Романенко // Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami – 2011: Mater. VII Międzynarod. naukowo-praktycznej конф. – Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia, 2011. – Vol. 42. – S. 54–57.

18. **Сизоненко, М.Н.** Содержание аминокислот, микро- и макроэлементов в ферментативном гидролизате и фильтрате из активированной эмбрионально-яичной массы перепелов, используемых в качестве стимуляторов роста *L.monocytogenes* / М.Н. Сизоненко, Л.Д. Тимченко // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Мат-лы Всерос. научно-практ. конф. с международным участием. – Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2012. – С. 182.

19. Тимченко, Л.Д. В-витаминный состав в новых стимуляторах роста микроорганизмов из нетрадиционного сырья / Л.Д. Тимченко, В.И. Заерко, **М.Н. Сизоненко**, О.А. Романенко, И.Н. Ткаченко. // Физико-химическая биология: Мат-лы междунар. научн. интернет-конф. – Ставрополь: Изд-во СтГМА, 2012. – С. 27–29.

20. **Сизоненко, М.Н.** Озонирование перепелиных яиц при инкубации с биотехнологической целью как метод их дезинфекции / М.Н. Сизоненко, Л.С. Катунина // Инновации молодых ученых: Мат-лы научно-практич. конф. с межд. участием, посвященной 75-летию СтГМА. – Ставрополь: Изд-во СтГМА, 2012. – С. 63–66.
21. Тимченко, Л.Д. Влияние нового стимулятора роста «СРМП» на качество вакцины против листериоза животных / Л.Д. Тимченко, **М.Н. Сизоненко** // Актуальные вопросы ветеринарной фармакологии, токсикологии и фармации: Мат-лы 4 съезда вет. фармакологов и токсикологов России. – М: Изд-во «Истоки», 2013. – С. 562–564.
22. **Сизоненко, М.Н.** Влияние озона на морфологические особенности перепелиного эмбриона / М.Н. Сизоненко, Ю.М. Добрыня // Физико-химическая биология: Мат-лы междунар. научн. интернет-конф. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2014. – С. 16–18.
23. **Сизоненко, М.Н.** Озонирование инкубационных яиц как путь повышения биотехнологических потенциалов эмбрионального сырья / М.Н. Сизоненко, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский // Современные достижения биотехнологии: Мат-лы IV Международ. науч.-практич. конф. – Минск-Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2014. – С. 195–198.
24. Фомина, И.О. Влияние биологически-активной субстанции «СРМП-СВ» в составе защитной среды высушивания на выживаемость микроорганизмов при лиофилизации вакцины против листериоза животных / И.О. Фомина, **М.Н. Сизоненко** // Биотехнология: взгляд в будущее: Мат-лы II международ. студенческой научно-практич. конф. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2016. – С. 39–41.
25. **Сизоненко, М.Н.** Некоторые гематологические показатели морских свинок при использовании вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, сублимированной с модифицированной средой высушивания / М.Н. Сизоненко, И.В. Ржепаковский, С.И. Писков // Современные достижения биотехнологии. Новации пищевой и перерабатывающей промышленности: Мат-лы VI международ. научно-практич. конф. – Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2016 г. – С. 330–332.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГОСТ – Государственный стандарт;
 ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;
 КОЕ – колониобразующая единица;
 М – среднеарифметическая величина;
 м.к. – микробная клетка;
 МУК – методические указания;
 ПЖА – полужидкий агар;
 Р – вероятность различия;
 РНК – рибонуклеиновая кислота;
 СРМП – стимулятор роста микроорганизмов перепелиный;
 СТО – стандарт организации;
 ТР – технологический регламент;
 УФЛ – ультрафиолетовые лучи;
 ФГ – ферментативный гидролизат;
 ФГЭП – ферментативный гидролизат эмбрионально-яичной массы перепелов;
 m – средняя квадратическая ошибка.