

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СЕВЕРО-КАВКАЗСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

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)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор ветеринарных наук, профессор
Тимченко Людмила Дмитриевна
доктор ветеринарных наук
Заерко Виктор Иванович

Ставрополь – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

	СТР.
ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Современные проблемы производства вакцин и пути их решения	12
1.2. Питательные потребности и особенности культивирования листерий	23
1.3. Стимуляторы роста микроорганизмов и технологические подходы к их получению.....	34
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	43
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	43
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	53
3.1. Приготовление гидролизатов из зебрины повислой, яблок, эмбрионально-яичной массы перепелов, их состав и апробация в качестве стимуляторов роста листерий.....	53
3.2. Технологические подходы к получению нового стимулятора роста листерий на основе эмбрионально-яичной массы перепелов и оценка его качества.....	63
3.2.1. Экспериментальное обоснование применения метода озонирования для повышения качества эмбрионально-яичной массы перепелов	63
3.2.2. Технология приготовления нового стимулятора роста листерий из эмбрионально-яичной массы перепелов «СРМП» и его качественные характеристики.....	73
3.3. Особенности культивирования <i>Listeria monocytogenes</i> штамма «АУФ» с применением гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов и СРМП в процессе производства вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.....	90
3.4. Качество вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, изготовленной с использованием СРМП в процессе культивирования <i>Listeria monocytogenes</i>	100
3.5. Выживаемость листерий и качество вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных при добавлении СРМП к среде высушивания.....	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ.....	120
ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ....	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	124
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	154

ВВЕДЕНИЕ

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» (приложение А), №2535980 РФ от 20.10.2014 «Способ получения стимулятора роста *Listeria monocytogenes* из активированной эмбрионально-яичной массы перепелок» (приложение Б).

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» (приложение В, приложение Г), проблемная научно-исследовательская лаборатория экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии НИИ прикладных биотехнологий Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета, ООО НПО «СайТЭК», бактериологический отдел клинико-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 (приложение Д).

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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Современные проблемы производства вакцин и пути их решения

Рост поголовья и повышение продуктивности сельскохозяйственных животных напрямую зависят от эффективности профилактических и оздоровительных мероприятий против инфекционных заболеваний. Специфическая профилактика является одной из наиболее успешных мер в борьбе с инфекционными болезнями. От качества используемой вакцины зависит успешность вакцинации [63].

По мнению ряда ученых, наиболее желательно использование живых вакцин, так как они обеспечивают более прочный, напряженный и продолжительный гуморальный и клеточный иммунитет [59; 200; 201].

На территории Российской Федерации изготавливается большое количество вакцин, в том числе живых. Одной из востребованных является вакцина для профилактики листериоза [118], так как проблема листериоза актуальна для животноводства 82 стран, включая Российскую Федерацию [15; 35; 86; 150; 177; 230; 234; 235; 244; 272; 277].

Листериоз – это инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Listeria*. Инфекция уступает сальмонеллезам и кампилобактериозам по количеству выявленных случаев, при этом значительно превосходит их по тяжести клинического течения и проценту летальных исходов [262], нанося значительный ущерб животноводству, и представляя серьезную угрозу здоровью людей [27; 116; 216; 249].

Так, по данным ФГБУ «Центр ветеринарии», с 2010 по 2017 годы на территории Российской Федерации зарегистрировано 58 неблагополучных пунктов по заболеваемости листериозом сельскохозяйственных животных и птицы, что подтверждает актуальность борьбы с данным заболеванием.

На сегодняшний день в основе борьбы с листериозом лежит специфическая профилактика, которую осуществляют с применением инактивированных и живых вакцин [116; 251].

Несмотря на достоинства живых сухих вакцин, существует ряд нерешенных производственных проблем, в том числе и для вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных. Так И.В. Павленко [116; 117; 118] обращает особое внимание на проблему снижения и нестабильности накопления бактериальной массы при производстве сухой живой вакцины из слабовирулентного штамма «АУФ» для профилактики листериоза сельскохозяйственных животных. Исследователь отмечает важность данной проблемы, поскольку на этапе накопления бактериальной массы происходит синтез антигенов, и связывает ее с нестандартностью питательных сред и мясных гидролизатов. Кроме того, тот же автор отмечает недостаточную стабильность сухих препаратов, выражающуюся в снижении жизнеспособных микроорганизмов в процессе сублимационного высушивания и хранения вакцин [117; 118].

Наращивание биомассы при производстве вакцин непосредственно связано с процессом культивирования бактерий. Поэтому одной из первоочередных и актуальных проблем микробиологии является совершенствование процесса культивирования микроорганизмов [112; 116; 193].

Культивирование микроорганизмов – это посев исследуемого материала на питательные среды с целью получения чистой культуры микробов для всестороннего изучения их свойств, определения видовой принадлежности и производственного использования. От процесса культивирования зависит эффективность микробиологического производства и качество получаемого продукта. Культивирование – один из важнейших этапов в промышленной и экспериментальной микробиологии [151; 211].

Главной целью процесса культивирования является наращивание объема бактериальной массы при сохранении морфологических, культуральных и биохимических свойств, независимо от видовой принадлежности микроорганизмов. Поэтому ведущая роль в культивировании отводится правильно подобранным питательным средам, обеспечивающим большой выход функционально активной культуры [82; 193].

Питательными средами называют различные субстраты, применяемые в

микробиологической практике. С их помощью происходит выделение, накопление, хранение, транспортировка микроорганизмов, а также культивирование с целью получения чистых культур, исследования биологических свойств, обмена веществ, получения ценных продуктов метаболизма [49].

Основные проблемы культивирования микроорганизмов в настоящее время связаны именно с микробиологическими питательными средами. Вопросы качества, стандартизации, экономической стоимости питательных сред являются не до конца решенными, что обуславливает их актуальность [134; 176; 193].

Широкий выбор микробиологических питательных сред на данный момент не решает проблем обеспечения научных и практических учреждений нашей страны стандартными питательными средами. Иногда на практике применяют среды лабораторного и производственного изготовления, используя низкокачественные или плохо стандартизуемые компоненты. Зачастую из-за отсутствия систематического внутрилабораторного контроля питательных сред, качество серийных образцов в некоторых случаях оставляет желать лучшего [33; 134; 176].

Поскольку среды применяются в крупномасштабном производстве для выпуска больших объемов биопрепаратов, к таким средам предъявляют дополнительные требования, касающиеся их качества, технологии изготовления и экономических показателей. Однако в производственных условиях вопрос стабильности сред особо трудно решаем, т.к. химический состав большинства питательных сред известен не полностью, и избежать колебаний качественного состава таких сред очень трудно [119].

Одна из причин снижения качества питательных сред, а, следовательно, и наращивания биомассы антигена, может быть связана с тем, что в качестве их основы используется природное сырье преимущественно животного происхождения. Качество животного сырья в последнее время нередко ухудшается по ряду причин, в том числе в связи с антропогенным воздействием на окружающую среду, ухудшением экологической обстановки, бесконтрольным применением химиотерапевтических препаратов в сельском хозяйстве, что усложняет стандартизацию как самого сырья, так и питательных сред. Сырье зачастую содержит анти-

биотики, химикаты, нитраты, токсические продукты, оказывающие негативное влияние на среды, что, как следствие, отрицательно отражается на культивировании и приросте биомассы микроорганизмов [134; 146; 231; 254; 276; 286; 287]. Также на питательные среды может оказывать действие качество воды, входящей в их состав [101].

При изготовлении питательных сред могут использоваться компоненты, содержащие примеси и побочные продукты, которые могут оказывать влияние на рост и активность культивируемых микроорганизмов. Одни из них могут оказывать положительное влияние на процесс ферментации (белки, аминокислоты, органические кислоты, минеральные вещества и другие), другие могут тормозить процессы жизнедеятельности микроорганизмов [26; 95; 195].

Ингибиторные эффекты могут быть связаны с непоследовательным смешением ряда компонентов и нарушением их соотношения, определенными марками агар-агара, действием жирных кислот, содержащихся, в том числе, в пептоне, агаре, казеине и даже вате [97; 270; 275].

Культивирование микроорганизмов нередко происходит с неизвестными ингибирующими и лимитирующими рост факторами, затрудняющими управление их жизнедеятельностью и совершенствование методов культивирования. Поэтому необходимо изучение и учет популяции микроорганизмов в каждом конкретном случае и в разных фазах роста, что во многом определяет успех культивирования [116].

Несмотря на существование большого количества питательных сред, в настоящее время ведутся исследования по созданию новых и оптимизации традиционных сред с учетом метаболических особенностей отдельных видов микроорганизмов, направленных на поддержание характеристик определенных штаммов микроорганизмов, увеличение выхода бактериальной массы и удешевление производства при изготовлении разнообразных биопрепаратов. Универсальных сред, одинаково подходящих всем микроорганизмам, не существует, их качественно-количественный состав часто подбирается эмпирически, без обоснования использования тех или иных компонентов. На сегодняшний день решение этой пробле-

мы состоит, главным образом, в использовании современных знаний о микробном метаболизме [134].

По мнению ряда авторов, решением проблемы снижения выхода бактериальной массы, обусловленным снижением качества питательных сред, может являться создание новых питательных основ из экологически чистого, бюджетного сырья, добавление к традиционным питательным средам специальных добавок или использование стимуляторов роста микроорганизмов [18; 90; 116; 119; 173; 176; 193].

Первый путь решения проблемы – это изыскание принципиально нового, экологически чистого, доступного сырья для приготовления питательных основ и конструирования микробиологических сред. В настоящее время разработано большое количество питательных сред на основе сырья растительного, животного и микробного происхождения [31; 72; 90; 173; 176; 193].

Второй путь решения проблемы, позволяющий рассчитывать на увеличение прироста биомассы микроорганизмов, это внесение питательных добавок и стимуляторов роста, созданных с учетом метаболических и питательных особенностей бактерий, на основе биологически полноценного сырья и наиболее эффективных методов его переработки [28; 119; 256]. В отличие от питательных добавок стимуляторы вносятся в питательные среды в минимальных дозах, не существенно меняя их состав и обеспечивая увеличение скорости роста и высокое накопление общей бактериальной массы в результате стимулирующего действия [109]. Поэтому, по мнению ряда авторов, использование стимуляторов роста является наиболее перспективным решением [28; 112; 119].

Не менее важной проблемой при производстве живых вакцин является снижение жизнеспособности микроорганизмов после сублимационного высушивания [17; 107; 118; 152].

Сублимационное высушивание – широко распространенный метод, позволяющий длительно без заметных изменений сохранять жизнеспособность, морфологические, культуральные, физиологические свойства, а также биохимическую активность клеток и производственную ценность [7; 54].

Сублимационное высушивание является заключительной стадией производства живых биопрепаратов. Защитные среды, используемые на этом этапе, играют важную роль, так как влияют как на процесс высушивания бактериальной массы, так и на сохранность ее иммуногенных свойств [117].

Однако при лиофилизации происходит отмирание некоторой части микроорганизмов, поэтому необходимо создание условий с целью сохранения наибольшего процента жизнеспособных клеток после высушивания [17].

Так, одной из возможных причин недостаточной эффективности вакцин против листериоза животных [86], в том числе сухой живой вакцины из слабовирулентного штамма «АУФ» для профилактики листериоза сельскохозяйственных животных [15], может являться снижение жизнеспособности листерий в процессе сублимационного высушивания и хранения вакцины. Поэтому для обеспечения высокой эффективности вакцины после сублимационной сушки и при последующем хранении, необходима разработка и подбор оптимальных защитных сред высушивания [117].

Одним из важнейших факторов, влияющих на выживаемость и сохранение микроорганизмов в процессе высушивания, является защитная среда. Разработка и использование эффективных защитных сред привела к значительным успехам в повышении выживаемости микроорганизмов в процессе лиофильного высушивания [107; 149; 221; 260].

Для снижения негативного влияния процесса лиофильного высушивания на выживаемость клеток, необходим подбор защитной среды с качественно и количественно оптимальным набором компонентов. При подборе компонентов защитной среды учитывают концентрацию бактериальных клеток в суспензии, ее эвтектические характеристики, а также параметры температурного воздействия при замораживании и высушивании [19].

По мнению ряда авторов, главное свойство защитных веществ – их способность к образованию водородных связей, с помощью которых они оказывают влияние на свободную и связанную воду, а также взаимодействуют с белками в системе [21; 263, 264].

К другим стабилизирующим свойствам защитных веществ относят:

- способность к образованию хелатных связей с бивалентными ионами металлов, которые участвуют в сохранении специфичности структуры биомолекул [257];
- способность ингибировать действие гидролитических и окислительно-восстановительных ферментов [100; 259];
- стабилизацию SH-связи в белке [253];
- препятствие свободнорадикальных повреждений белков [224; 265];
- обеспечение необходимых для биообъекта значений pH за счет своей буферной емкости [271].

По мнению А.А. Нежуты [107], защитные вещества для сублимационного высушивания биоматериалов очень разнообразны; к ним относятся:

- вещества со сравнительно небольшой молекулярной массой, обладающие гидрофильными свойствами (сахара, аминокислоты и их соли, органические кислоты и неорганические соли);
- вещества с небольшой молекулярной массой, обладающие окислительно-восстановительной активностью (аскорбиновая, трикарбоновые кислоты, их соли, лецитин, глутатион, тиомочевина и некоторые неорганические соединения);
- высокомолекулярные природные (белки, крахмал и его производные, желатин) и синтетические соединения (декстраны, поливинилпирролидоны различных молекулярных масс), а также сложные жидкости биологической природы (молоко, сыворотка крови и т.д.).

Защитные вещества различаются по способности проникать в клетку и делятся на эндоцеллюлярные, экстрацеллюлярные и смешанного типа [240]. Эндоцеллюлярные вещества являются низкомолекулярными и могут свободно проникать в мембрану клетки и ее цитоплазму [261]. Экстрацеллюлярные вещества обычно являются высокомолекулярными (за исключением сахаров), обладают поверхностно-активными свойствами [21; 261].

Обладая гидрофильными свойствами, углеводы могут изменять характер поведения растворов при низких температурах [264], предотвращая этим действие

повреждающих факторов при замораживании и высушивании биоматериалов [279].

Сахара и полиспирты обладают стабилизирующим действием, направленным в основном на поверхность клеток [264; 285]. Присутствие сахаров в защитной среде высушивания снижает, а иногда и подавляет повреждение высушенных микробных клеток кислородом воздуха [47].

Защитный эффект аминокислот и их солей формируется за счет нейтрализующего действия аминогрупп на карбонильные соединения, образующиеся в процессе хранения сухих препаратов [266]. Аминокислоты в составе защитной среды изменяют структуру воды в системе: наиболее прочно связанная вода присоединяется к группам с наибольшей плотностью заряда, таким как группы лизина, аргинина, глутамата, аспартата [105]. Аминокислоты, углеводы, полиспирты в составе защитных сред проявляют свое действие, в основном, в термостабильности высушенных биообъектов [279].

Соли являются необходимым компонентом защитной среды, так как поддерживают осмотическое равновесие в системе. Однако их действия на биообъект при сублимационной сушке противоречивы. Так катионы кальция и магния могут оказывать стабилизирующее влияние на биообъекты. При этом другие вещества могут снижать стабилизирующую эффективность сахаров, что особенно характерно для марганца, меди, железа и солей натрия [21]. Некоторые ионы металлов (кальций, ртуть, свинец) могут связываться со специфическими функциональными группами мембранных белков, тем самым изменяя проницаемость мембраны [70].

Защитное действие высокомолекулярных соединений изучено мало, по мнению ряда исследователей [100; 261; 266], оно заключается в прочном связывании внеклеточной воды и части воды, которую как бы «выдавливают» из клеток, замедляя рост кристаллов. Кроме того, эти соединения обволакивают клетку, создают полимерную оболочку, которая придает ее поверхности механическую устойчивость к воздействию кристаллов льда.

Перспективными являются стабилизаторы, в состав которых входят альбу-

мин, пептон, аминокептид и другие гидролизаты белков [225]. За счет высокой степени гидрофильности эти соединения предохраняют клетки от сильного обезвоживания, а также поддерживают необходимое содержание влаги в сухих препаратах в процессе хранения [282].

Отдельными исследователями сообщается, что гидролизаты белков обеспечивают высокую термостабильность высушенных препаратов [225; 248; 282].

Механизм защитного действия гидролизатов белков сложен и основан на способности аминокислот связываться с белками и нуклеиновыми кислотами клеток, стабилизируя при этом молекулярную структуру их ферментативных центров [25]. Отдельные авторы считают, что стабилизирующим действием обладают входящие в состав гидролизатов как высокомолекулярные (полипептиды) вещества, так и низкомолекулярные (пептиды с малой молекулярной массой, аминокислоты и их соли). Защитное действие высокомолекулярных соединений (белков, полисахаридов) и их гидролизатов связывают с предохранением от повреждений поверхности мембраны [25; 100].

Есть мнение, что гидролизаты белков за счет наличия в их составе пептидов определенной длины обладают специфическими защитными свойствами [238]. По мнению Т. Морити [100], пептоны содержат в своем составе активные пептиды (с молекулярной массой 1900–3100 Да), являющиеся ингибиторами гидролиза, и предотвращают повреждение клеток в процессе замораживания, высушивания и хранения сухих препаратов.

Кроме того, белковые гидролизаты обладают восстановительными свойствами, могут более активно реагировать с кислородом, чем лабильные участки биоматериала, тем самым тормозя окисление последних, поэтому они получили распространение в качестве добавок к средам высушивания [114; 115]. Однако есть данные, что активные восстановители при их высокой концентрации в защитной среде могут оказывать токсическое действие по отношению к биоматериалу [255].

Важно отметить, что эффективность компонентов, входящих в состав сред высушивания и выполняющих защитные и стабилизирующие функции, зависит от

их концентрации. Так наличие моно- и низкомолекулярных олигосахаридов (сахароза, лактоза, глюкоза и др.) в составе защитной среды эффективно в концентрации 3–10% [149]. Высокомолекулярные соединения – полисахариды (декстран, декстрин, агароза), желатин и поливинилпирролидон, соли альгиновой кислоты, которые создают защитные барьеры для клеток, эффективны в концентрации 1–2%, а в большем количестве (за исключением полисахаридов) способствуют ухудшению удаления влаги при высушивании. Тиомочевина, натриевые соли аскорбиновой, лимонной, глутаминовой кислот необходимы в количестве 1–3% [107; 149].

По мнению ряда исследователей, для достижения максимального защитного эффекта защитная среда высушивания должна быть сложной, многокомпонентной и сочетать в себе коллоидные и гидрофильные свойства [21; 241; 266].

В соответствии с «Технологическим регламентом по изготовлению и контролю вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма “АУФ”» (ТР 00482861–0061–2009) в условиях производства используют многокомпонентную сахарозо-желатиново-пептонно-тиомочевинно-глутаматную защитную среду [185]. Однако И.В. Павленко [116] отмечает, что использование традиционной защитной среды высушивания для листерий может приводить к значительной гибели (до 70%) жизнеспособных клеток в процессе лиофильного высушивания и при длительном хранении вакцины.

Исходя из этого, необходима разработка новых и оптимизация уже имеющихся сред высушивания, поиск компонентов, добавление которых в минимальных количествах будет оказывать стабилизирующее действие, и повышать адаптационный потенциал бактерий, не существенно изменяя классический состав среды. Существуют немногочисленные сообщения об оптимизации среды высушивания листерий, в том числе путем внесения дополнительных защитных веществ.

Так, предложенная И.В. Павленко [116] защитная среда высушивания для листерий, содержащая в своем составе 1,5% желатина, 5% сахарозы и 3% декстрана, позволила повысить сохранность жизнеспособных микроорганизмов в вак-

цине в процессе длительного хранения по сравнению с использованием традиционной защитной среды высушивания.

Существуют единичные сообщения об универсальных субстанциях, повышающих адаптационный потенциал листерий на разных этапах производственного цикла изготовления вакцины, как при культивировании, так и при лиофилизации. Так, Е.В. Светлакова [152] путем внесения в производственную защитную среду для листерий 0,9%-го раствора хлорида натрия и 3% стимулятора роста на основе чайного гриба ТС-1, отмечала повышение жизнеспособности листерий в процессе сублимационного высушивания. Поиск подобных субстанций является перспективным решением вышеизложенных проблем, в том числе в экономическом плане.

Таким образом, несмотря на достижения в области производства вакцин, задача получения высокоэффективных и стабильных биопрепаратов решена не полностью в том объеме, который необходим для постоянно повышающихся требований к качеству как препаратов, так и технологии их производства. Производство вакцин, в том числе против листериоза сельскохозяйственных животных, сталкивается с определенными трудностями. К ним относится проблема наращивания биомассы микроорганизмов, напрямую зависящая от качества питательных сред, и проблема сохранения жизнеспособности бактериальных клеток на этапе сублимационного высушивания вакцины.

Решение данных проблем связано с подбором оптимальных питательных сред для производственного культивирования микроорганизмов, использованием различных стимуляторов роста, применение которых представляется нам наиболее перспективным решением, а также подбором оптимальных защитных сред для сублимационной сушки, введением в них новых компонентов, что позволит получить эффективные ветеринарные биопрепараты.

1.2. Питательные потребности и особенности культивирования листерий

Требования к качеству питательных сред постоянно растут, и основной их задачей является удовлетворение метаболических потребностей микроорганизма [112].

Для процессов роста и размножения микроорганизмы должны получать вещества, необходимые им для получения энергии и биосинтеза клеточных компонентов. Содержание этих питательных веществ в культуральной среде должно быть в количествах и соотношениях, отвечающих специфическим потребностям данного микроорганизма. Физиология микроорганизмов крайне разнообразна, а, следовательно, также разнообразны и их специфические потребности в питательных веществах [134].

Не все ингредиенты культуральных сред можно назвать питательными веществами. Некоторые из них необходимы для обеспечения оптимального окислительно-восстановительного баланса, осмотического давления, рН и т.д. Так буферные растворы используют для поддержания определенного уровня рН, а поваренную соль – для создания более благоприятного осмотического давления.

Питательными веществами принято считать только те химические соединения, которые участвуют во внутриклеточных обменных процессах [119].

В первую очередь элементы, необходимые для роста микроорганизмов, включающиеся в состав питательной среды, определены из химического состава микробной клетки, который, в принципе, одинаков у всех живых организмов. Так 80–90% общей массы клеток представлены водой и только 10–20% приходится на сухое вещество, которое включает макро- и микроэлементы. К макроэлементам относятся: азот, углерод, водород, кислород, калий, натрий, кальций, сера, фосфор, магний, железо. К микроэлементам – цинк, медь, кобальт, марганец, молибден и др, большинство из которых необходимы клетке в следовых количествах [5; 77; 134]. Источники макро- и микроэлементов играют существенную роль в активировании различных ферментативных процессов бактериальной клетки, необхо-

димы ей для конструктивного метаболизма, являются практически общими для всех микроорганизмов [134].

Среди элементов наибольшее биогенное значение имеет углерод, который входит в состав почти всех органических соединений микробной клетки [46].

Для подавляющего большинства микроорганизмов основными легкодоступными источниками углерода и энергии являются сахара, спирты, соли органических кислот, а также углерод, который входит в состав таких азотсодержащих соединений как белки, пептоны и аминокислоты. Углеродосодержащие субстраты с одной стороны выступают источником энергии, выделяющейся при их окислении, с другой вовлекаются в окислительно-восстановительные реакции в клетке [116]. Говоря о потребности микроорганизмов в органических источниках углерода, необходимо отметить, что степень гетеротрофности наиболее присуща патогенным микроорганизмам, живущим в организме человека и животных, поэтому состав питательных сред для их культивирования особенно сложный. Среды включают белки, продукты их гидролиза (пептиды, аминокислоты), фрагменты нуклеиновых кислот, витамины и др. [134].

Азот необходим микроорганизмам в первую очередь для построения аминокислот и белков. Источниками азота для микроорганизмов служат органические и неорганические соединения, которые обладают высокой реакционной способностью. Большие запасы азота содержатся в органических соединениях (азот белков, пептидов, аминокислот, нуклеиновых кислот и продуктов их распада). Белки, являющиеся высокомолекулярными соединениями, не проникают в клетку бактерий, поэтому для усвоения подобных веществ необходимо их разложение до низкомолекулярных соединений. [46; 79; 98; 118; 134]. Пептоны, полученные в результате воздействия протеолитических ферментов на белки животного или растительного происхождения, могут использоваться не только как источники азота, но и как источник углерода и энергии. Наряду с пептонами используют субстраты, полученные в результате кислотного гидролиза белка, содержащие в составе пептиды и свободные аминокислоты [74; 149]. Исследователи А. J. Sussman и С. Gilvard [281] отмечают более активное потребление микроорганизмами

полипептидов, нежели свободных аминокислот, что связывают с автономным транспортом полипептидов в клетку. Кроме того, некоторые пептиды необходимы микроорганизмам для токсинообразования [202; 247].

Так, гидролизаты мяса включают широкий спектр пептидов до 1500 D [180] и в составе питательных сред стимулируют максимальную скорость роста микроорганизмов широкого круга [172]. Исследования по влиянию пептидов из панкреатических гидролизатов мяса и белков крови показали, что *Listeria monocytogenes* потребляет пептиды с молекулярной массой выше 1000, 920–980 и 72–780 D [182].

Источниками водорода для микроорганизмов служит глюкоза, аминокислоты, органические кислоты [134; 252].

Потребность в органических формах азота, а также в углероде микроорганизмы удовлетворяют, в основном, за счет аминокислот. Помимо основного назначения – служить источниками азота, углерода и других элементов для пластических целей, аминокислоты используются микроорганизмами для регуляции различных жизненно важных процессов: спорообразования, продукции антигенов, экзотоксинов и др. [180].

Наиболее высокую потребность в аминокислотах обнаруживают патогенные грамположительные микроорганизмы, к которым относятся листерии. Потребность микроорганизмов в аминокислотах определяют двумя основными методами. Первый – заключается в исключении из синтетической среды отдельных аминокислот и наблюдении за ростом изучаемых штаммов, а второй – в выяснении характера потребления аминокислот из полноценной культуральной среды. Однако указанные методы позволяют получить разную информацию [180]. Так, важными для роста листерий и стимулирующими его являются аминокислоты: лейцин, изолейцин, аргинин, глутамин, метионин, валин и гистидин. Исследователь А.М. Алимов [4], изучая влияние на рост листерий отдельных аминокислот и их различных сочетаний, установил, что листерии нуждаются в серосодержащей аминокислоте – цистине. Однако исследования потребления *L. monocytogenes* аминокислот из питательной среды показали, что помимо перечисленных листе-

рии потребляют следующие аминокислоты: триптофан, лизин, фенилаланин, глицин, аланин, треонин, аспарагиновую кислоту [196]. Глутаминовая кислота играет важную роль в аминокислотном метаболизме, легко окисляется и может быть использована с энергетической целью, поэтому ее содержание в питательной среде может превалировать [29; 180].

Важную роль играет сбалансированность аминокислот в среде. Известно, что добавление к среде одной аминокислоты может стимулировать синтез другой. Однако имеются данные, что избыток аминокислот вызывает торможение роста некоторых микроорганизмов. Отмечено конкурирующее действие между отдельными аминокислотами, например валином и изолейцином [180].

Глюкоза как питательный и стимулирующий компонент активно используется в качестве добавки к различным питательным средам [14; 69; 194]. Разными авторами сообщалось о связи между потреблением аминокислот бактериями и наличием в среде источников энергии, в первую очередь – глюкозы, которая необходима для преодоления энергетического барьера при переходе аминокислот через клеточную мембрану [180]. Положительное влияние на рост листерий отмечено также для таких сахаров как мальтоза, сахароза, рамноза, 6-атомный спирт сорбит [183].

Отдельные штаммы листерий при выращивании нуждаются в органических кислотах в основном трикарбонового цикла [178]. Так, Л.И. Трусова и Л.Я. Телишевская [120] на мясо-пептонно-печеночно-сахаро-глицериновом агаре обнаружили стимулирующее действие на рост листерий добавок следующих органических кислот: лимонной, малеиновой, трансаконитовой, малоновой, пировиноградной. Кроме того, отмечено, что для усвоения органических кислот листериям необходима энергия – глюкоза. Стимулирующее действие на рост листерий органических кислот в присутствии глюкозы объясняется тем, что глюкоза выступает в роли донора энергии для активного транспорта кислот через клеточную мембрану [182].

Фосфор является важным питательным элементом микробной клетки. Он обеспечивает нормальное течение энергетического обмена, необходим микроор-

ганизмам для синтеза фосфолипидов, коферментов, нуклеиновых кислот, АТФ и др. Источником фосфора могут служить соли фосфорной кислоты или продукты разложения нуклеиновых кислот [46; 102; 116].

Важные функции в жизнедеятельности клетки выполняют ионы металлов, которые участвуют практически во всех биохимических реакциях, проходящих внутри клетки [208]. Так, их роль связана с функционированием ферментных систем микроорганизмов. Ионы металлов в качестве кофакторов входят в состав ферментов, активируя или стабилизируя их деятельность [181].

Содержание натрия в бактериальных клетках составляет 0,6–1%, его соли участвуют в поддержании осмотического давления в паре среда-клетка [181].

Важную роль в активации различных ферментативных процессов играет магний, стимулируя пептидазы, нуклеазы, фосфатазы, гексакиназы, карбоксилазы, изоцитрикодегидразы и другие ферменты, входит в их состав, образует с ферментными белками комплексные соединения, может выступать в роли кофермента [32]. Магний участвует в поддержании структурной целостности рибосом микробной клетки, а также способствует удержанию на рибосомах матричной и транспортной РНК [130]. Кальций близок к магнию по своей физиологической роли и тоже является активатором ряда ферментов, поэтому эти два элемента во многих случаях могут быть взаимозаменяемы [229].

Большую роль в процессах дыхания микроорганизмов играет железо, которое в качестве активного центра входит в состав ферментных систем дыхательной цепи [181]. Исследователями Л.Я. Телищевой и В.Т. Ночевным [181] доказано положительное влияние ионов железа на рост листерий *in vitro* в концентрации 1–5 мг%, причем как в двух-, так и в трехвалентной форме. По данным С. Sword [283] прибавление к питательной среде соединений железа в концентрации 0,1–100 мг/мл стимулирует рост листерий. При этом автором отмечено более выраженное действие ионов двухвалентного железа на проявление вирулентности листерий *in vivo*. Влияние железа и его соединений на скорость роста листерий также продемонстрировали работы R.E. Cowart, B.G. Foster [232], R.J. Premaratne, W.J. Lin, E.A. Johnson [274]. Отмечена важная роль гемина – производного железа при

культивировании листерий на полусинтетических средах [69; 194]. При низком содержании ионов железа не происходит образования каталазы, пероксидазы и цитохромов. При полном отсутствии металла происходит задержка развития из-за нарушения процессов клеточного окисления [29; 32; 269]. Кроме того, установлено, что в процессе обработки мяса для питательных сред, некоторая часть железа может теряться, что приводит к снижению качества перевара Хоттингера и требует введения дополнительных стимуляторов роста [81].

Немаловажную роль в структуре микробной клетки играет сера, которая входит в состав белков в виде серосодержащих аминокислот. Еще одна функция серы – стимуляция протеолитических ферментов [102]. Для нормального роста листерий необходима органически связанная сера. Сера обычно потребляется в виде сульфата, восстанавливается до уровня сульфида и затем используется для биосинтетических процессов. Главным источником серы является цистин и метионин [14; 39; 180].

Немаловажное значение в жизнедеятельности микроорганизмов играют такие микроэлементы как медь, цинк, марганец, молибден, йод, кобальт, никель и многие другие, они участвуют в регуляции обмена веществ. Им отводится важная роль в образовании витаминов и ферментов, так как они входят в состав активных центров многих из этих веществ [38; 56; 78]. Рядом авторов показано, что в зависимости от концентрации, микроэлементы могут как стимулировать, так и ингибировать рост и развитие бактерий в процессе их культивирования [46; 48; 51].

Ионы цинка и марганца необходимы всем микроорганизмам. Особое значение принадлежит цинку, поскольку РНК- и ДНК- полимеразы относятся к цинк-протеидам. Кроме того, цинк подавляет конъюгацию бактерий, влияет на экспрессию и репрессию бактериальных генов, участвует в метаболизме ферментов нуклеиновых кислот и белков. Марганец выступает кофактором некоторых ферментов [29; 39] и во многих реакциях может заменять магний [181].

Ионы меди входят в состав ряда ферментов, связанных с дыхательными функциями клетки, являются неспецифическими активаторами ферментов. Однако большие количества меди являются токсичными для микроорганизмов [181].

Для питания, роста и размножения микроорганизмы нуждаются в особых дополнительных веществах – «факторах роста», которые не синтезируются сами клетками. В качестве факторов роста могут выступать витамины, аминокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, которые необходимы в малых дозах и используются микробной клеткой для синтеза физиологически-активных веществ, регулирующих внутриклеточный метаболизм [46; 102; 109; 182; 256].

Микробная клетка нуждается в пуриновых и пиримидиновых основаниях или их производных, входящих в состав нуклеиновых кислот. Эти вещества используются клеткой в качестве строительного материала для нуклеотидов и синтеза белков. Так, аденин – одно из пуриновых оснований, входит как в состав нуклеиновых кислот, так и в состав коэнзима А [102; 171]. Н.П. Кулыбой и А.В. Козловым [89] доказано включение пуриновых и пиримидиновых предшественников в нуклеиновые кислоты цианобактерий, и увеличение за счет этого скорости роста культуры. Исследователи R. Siddiqi и M.A. Khan [280] отмечают стимулирующее действие некоторых нуклеиновых оснований по отношению к листериям.

Стимулирующее действие на рост различных микроорганизмов оказывают витамины, которые осуществляют каталитические функции в клетке, выступая в качестве коферментов и простатических групп ферментов. Наиболее важное значение в метаболизме большинства микроорганизмов принадлежит витаминам группы В [29].

По данным исследований, посвященным изучению потребностей листерий в факторах роста, эти микроорганизмы могут расти на полусинтетических средах из гидролизата казеина, неорганических солей и глюкозы в том случае, если к ним добавляются рибофлавин и биотин. При исследовании действия витаминов группы В на интенсивность роста листерий, при их добавлении к основной безвитаминовой среде, выявлено, что для всех штаммов абсолютно необходимым является рибофлавин [194]. Рибофлавин (витамин В₂) входит в состав флавиновых коферментов, участвующих в дыхательных процессах в качестве переносчиков водорода [29; 39; 64]. Также отмечено, что для нормального роста листерий на питатель-

ных средах необходимо наличие тиамина (витамин В₁), который является коэнзимом фермента карбоксилазы и участвует в реакции декарбоксилирования пиروвиноградной кислоты [14; 148; 214].

Важным фактором роста для многих микроорганизмов является никотиновая кислота (РР), входящая в состав коферментов никотин-амиддинуклеотида и никотин-амиддинуклеотид-фосфата, которые являются переносчиками водорода и необходимы клеткам для осуществления окислительно-восстановительных реакций [91].

Проблема нестабильности выхода биомассы является общей для широкого круга микроорганизмов, в том числе и для *Listeria monocytogenes* [33; 116; 119].

Листерии обладают широкими адаптивными способностями, позволяющими размножаться как в окружающей среде, так и в различных субстратах, обладают высокой метаболической пластичностью [177; 246]. Они растут как в аэробных, так и анаэробных условиях, оптимальная температура роста на обычных питательных средах составляет 36–38°C. Особенностью этих микроорганизмов является широкий температурный диапазон, они способны расти при температуре от 4 до 45°C и оставаться жизнеспособными при более низких температурах [69; 288].

Мнения о прихотливости листерий к питательным средам разноречивы. Так, ряд авторов сообщает, что возбудитель листериоза не отличается особой прихотливостью в отношении питательных сред, растет на многих средах, основу которых составляет мясо-пептонный бульон, бульон Хоттингера, мясо-пептонный агар, картофельный агар, мозговой агар, сердечно-мозговой бульон и некоторые синтетические среды [34; 222; 245]. Однако Л.Я. Телишевская, А.В. Сорокин, Л.Г. Цатурян и др. [183] отмечают очень слабый рост листерий в обычных мясных питательных средах (менее 1 млрд/мл), а также чрезвычайно слабый на синтетических средах. При этом, по сообщению С.М. Омаровой [113], листерии могут расти на искусственных питательных средах, при рН от 5,0 до 11,0, оптимальный рН среды для их роста 7,0–7,4. Этот же автор отмечает, что при выращивании микроорганизма постоянно происходит изменение условий: увеличивается плотность

популяции, уменьшается концентрация питательных веществ в субстрате, происходит сдвиг рН среды в кислую сторону в результате накопления кислых продуктов метаболизма в процессе ферментации углеводов, что приводит к задержке роста микроорганизма и в дальнейшем к его остановке. Поэтому необходимо введение в состав среды буферных систем, препятствующих сдвигу рН среды. Для этого используют различные химические соединения, в том числе натрий углекислый, фосфаты натрия и калия и др. [113].

Исследователи А.А. Триполитова и Г.В. Борисова [194] сообщают, что в первые сутки после посева рост листерий не очень интенсивен, что служит поводом для введения в среду различных стимулирующих веществ.

Усиливает рост листерий добавление в питательную среду глюкозы (0,2–1%), однако, по мнению других авторов, это неблагоприятно влияет на культуру из-за ферментации глюкозы и сдвига реакции среды в кислую сторону [222; 243]. Кроме того, по сообщению И.А. Бакулова с соавторами [16], увеличение концентрации глюкозы в питательной среде приводит к снижению активности ферментов в клетках листерий, а также снижает их вирулентность.

Питательная среда, в состав которой входит мясная вода и ферментативный гидролизат крови, обеспечивает стабильный и быстрый рост листерий [122]. Интенсивный рост листерий наблюдается на печеночных средах с добавлением глюкозы (1%), глицерина (2–3%), триптозы, сыворотки крови, яичного белка, а также на картофельном агаре с добавлением глюкозы и глицерина, мясном агаре и бульоне из кроличьего мяса и печени. В качестве элективных сред используют мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) с 0,05% теллуриата калия или 0,01–0,02% теллуриата калия в водном растворе глицерина и флоримицина или полимиксина [14; 69; 194]. Однако есть мнение, что на печеночных средах быстро наступает диссоциация листерий и потеря ими вирулентности, в связи с чем рекомендуется применять их для первичного посева при выделении листерий из исследуемого материала, но не для последующего культивирования и хранения культур [194].

Более интенсивный рост листерий наблюдается на обогащенных средах, а на простых более скудный, особенно трудно бывает получить первые генерации

микроорганизмов при выделении из патологического материала. Штаммы, проведенные через обогащенные питательные среды, в дальнейшем хорошо растут и на простых средах [16]. При этом есть сообщения о том, что *L. monocytogenes*, культивируемая на богатых питательных средах, утрачивает некоторые факторы вирулентности, которые сохраняются при ее росте на бедных средах [227, 228; 278]. Так М.Т. Ripio с соавторами [278], исследуя штаммы *L. monocytogenes* различного происхождения, определили, что штаммы дикого типа не продуцируют гемолизин или лецитиназу при культивировании в богатой среде (сердечно-мозговом бульоне). Поэтому применение различных добавок и стимуляторов роста, не влияющих на патогенность и вирулентность, но при этом повышающих скорость роста листерий, особенно на первых генерациях при ее культивировании, является важным оптимизирующим фактором.

Так, хороший рост листерий достигается при добавлении к классическим питательным средам стимулятора роста из активированной эмбрионально-яичной массы кур «ЭСРМ», прирост культуры в среднем увеличился в 1,4 раза при сохранении основных биологических свойств микроорганизма [119; 126]. Разработан и апробирован на вакцинном штамме листерий стимулятор роста ТС-1 на основе культуральной жидкости чайного гриба. Применение стимулятора приводит к значительному увеличению накопления общей биологической массы и количества живых микробных клеток [28; 121].

Хороший рост листерий отмечен на питательной среде, в качестве основы которой использованы отвары ржаных отрубей, капусты и моркови [124]. Также есть сообщения о высоких показателях роста *L. monocytogenes* на среде с добавлением кукурузного силоса, который обеспечивает питательной среде необходимое количество органических, минеральных веществ, а также определенный набор витаминов [125].

При разработке транспортной, селективной и накопительной питательных сред для листерий Е.В. Алиевой [3] в качестве питательной основы использовалась меласса свекловичная. Исследователь И.В. Павленко [116] заменил традиционные компоненты питательной среды для листерий – автолизат печени крупного

рогатого скота и водорастворимые витамины группы В на дрожжевой экстракт, чем не только снизил себестоимость среды, но и увеличил накопление жизнеспособных клеток более чем в 2 раза.

Исследователем О.В. Полосенко в соавторстве [132] на основе панкреатических гидролизатов и рыбной муки разработан ПАЛКАМ АГАР для выделения листерий, который по чувствительности и скорости роста превосходит импортные аналоги.

Использование И.К. Тутовым, В.И. Бобрышевым, Н.И. Каменским [199] гидролизатов из отходов вакцинно-сывороточного производства (сгустков крови, куриных эмбрионов) для приготовления основы питательной среды при культивировании листерий вакцинного штамма «АУФ» показало, что по чувствительности она не уступает средам из перевара Хоттингера.

Высокие накопительные свойства листерий отмечены при использовании питательной среды с добавлением в качестве стимулятора роста витаминного препарата "ЭКД" (экстракт кормовых дрожжей), характеризующегося высоким содержанием аминокислот и комплекса витаминов, а также глюкозы, входящей в состав среды, обеспечивающей энергетическое питание [123].

Исследователи L. Phan-Thanh и T. Gormon [273] отмечают противоречивость некоторых результатов, представленных разными авторами, относительно питательных потребностей листерий, что, по их мнению, связано с разнообразием генетических и экофизиологических групп бактериальных штаммов.

Таким образом, анализ литературных данных свидетельствует о том, что листерии, как и остальные микроорганизмы, нуждаются в широком перечне самых разнообразных веществ органической и неорганической природы, выполняющих различные функции: трофическую, энергетическую, а также каталитическую. Причем, некоторые вещества могут выполнять двойную роль в зависимости от количества, включенного в питательную среду. Поэтому для успешного роста и размножения листерий питательная среда должна иметь сбалансированный набор всех необходимых микроорганизму веществ в количествах, соответствующих его специфическим потребностям, как трофического характера, так и стимули-

рующих его рост [118].

Обобщая представленные выше литературные сведения, можно сделать вывод, что, несмотря на неприхотливость листерий к питательным средам, большинство традиционных питательных сред для их культивирования не всегда отвечают всем требованиям микроорганизма. Среды зачастую приготовлены из нестандартизированных компонентов, а также не оптимальны по составу, из-за чего прирост биомассы листерий бывает нестабилен. Кроме того, на начальных этапах культивирования при производстве вакцин (получение первых генераций) рост листерий может быть затруднен, что требует дополнительного введения в среду стимулирующих веществ.

1.3. Стимуляторы роста микроорганизмов и технологические подходы к их получению

Значимую роль в технологии культивирования микроорганизмов имеют применяемые факторы и стимуляторы роста [212].

Под «факторами роста» понимают вещества, которые необходимы микробной клетке для жизнедеятельности, но при этом не могут быть ею синтезированы или заменены другими, являются для нее важными источниками питания. Факторы роста необходимы микроорганизму в малых дозах, усваиваются им в нетронутном виде и используются для синтеза физиологически активных веществ, построения клеточных структур, входят целиком в состав протоплазменных веществ, в состав активных центров многих ферментов. К ним относятся различные аминокислоты, витамины, органические и неорганические элементы, пуриновые и пиримидиновые основания и прочие соединения [29; 74; 109; 256]. Если микроорганизм из обычных источников макро- и микроэлементов может самостоятельно строить необходимые ему соединения, то отсутствие факторов роста в питательной среде не окажет никаких вредных последствий для его развития. Если наоборот, микроорганизм не способен синтезировать нужное для его нормального развития вещество, то при его отсутствии в питательной среде нормальное развитие и рост будут затруднены или невозможны [119]. Зачастую микроорганизм недос-

таточно быстро синтезирует необходимые ему соединения, тогда добавление их в питательную среду значительно ускоряет его рост [98]. Факторы роста используются микробной клеткой для построения нуклеотидов, коэнзимов, и других физиологически активных веществ, регулирующих ее обменные процессы, поэтому замедление роста культуры носит вторичный характер, так как является одним из проявлений нарушений метаболизма [119].

Факторы роста вносятся в питательную среду в чистом виде или в составе комплексных источников питания. Потребность микроорганизмов в факторах роста индивидуальна и может меняться в зависимости от условий культивирования [74]. Наряду с обязательными факторами роста, найдены вещества, которые стимулируют рост и размножение микроорганизмов, но при этом их наличие в питательной среде необязательно [119].

Под стимуляторами роста понимают вещества, которые оказывают стимулирующее действие на рост и размножение тех или иных микроорганизмов, действуют как катализатор, но при этом культура растет и в их отсутствии [30].

Мнения о роли факторов и стимуляторов роста в микробной клетке неоднозначны. Так, по мнению М.С. Мосичева, А.А. Складнева, В.Б. Котова [102], факторы роста нельзя рассматривать как катализаторы процесса роста, при этом они необходимы для построения нового клеточного материала. При этом, по другим литературным данным, факторы роста, напротив, не участвуют в пластическом и энергетическом обмене, а лишь обеспечивают регуляцию метаболизма, являясь катализаторами химических процессов, или используются клеткой для построения катализаторов [79; 258]. Возможно, разница мнений связана с тем, что разделение веществ на факторы и стимуляторы роста является условным, поскольку одни и те же вещества могут выступать как в роли фактора, так и стимулятора роста микроорганизма [30].

К известным ростостимулирующим компонентам и их источникам относятся: аммоний молибденовокислый [184], сульфит натрия, гемолизированная кровь [75; 198], источники витаминов группы В, пуриновых, пиримидиновых оснований – дрожжевые экстракты [11; 209; 213], а также ненасыщенные жирные кислоты:

линолевая, линоленовая [99]. В роли стимуляторов роста микроорганизмов могут выступать и такие вещества, как холин, ацетат, олеиновая кислота, дикарбоновые кислоты [64], также пимелиновая кислота, урацил, козимаза, гемин [79]. Ученые выделяют новые факторы роста, так установлено ростостимулирующее действие РНКазы, которая способствует синтезу ДНК, РНК и белка [80]. Есть данные об использовании цитокинов в качестве ростовых факторов некоторых микроорганизмов [144]. Установлено, что пептиды в зависимости от их молекулярной массы могут выступать как в роли ингибиторов, так и стимуляторов роста различных микроорганизмов [182].

К стимуляторам роста микроорганизмов, как и к питательным средам, предъявляются определенные требования. Стимуляторы должны изготавливаться из экологичного доступного сырья с высоким содержанием биологически активных веществ на единицу объема, быть экономически выгодными и не противоречить питательным потребностям микроорганизмов. Поэтому одним из важнейших этапов разработки стимулятора роста микроорганизмов является подбор перспективного биологически-активного сырьевого источника, который в свою очередь должен быть поликомпонентным субстратом живой системы с высоким уровнем обменных процессов, богатым составом, экологически чистым, безвредным, легко воспроизводимым [119; 193].

Из вышесказанного следует, что стимуляторами и факторами роста микроорганизмов, по литературным данным, чаще являются низкомолекулярные вещества, такие как витамины, аминокислоты, органические кислоты, углеводы, которые представлены в легко усвояемой для микроорганизма форме [12; 29; 74; 102; 171]. Для их получения немаловажным условием является не только использование качественного, доступного и дешевого сырья, но и рациональных методов его переработки [193].

На данный момент разработано и внедрено в производство довольно много стимуляторов растительного, животного, микробного происхождения [112]. Стимуляторы роста микроорганизмов добавляются в питательную среду либо в виде индивидуальных веществ, либо в составе поликомпонентных смесей, представ-

ляющих собой экстракты, настои, отвары, автолизаты, гидролизаты из высокоактивного биологического сырья [18; 79; 134]. В пользу поликомпонентных источников ростовых факторов выступает и то обстоятельство, что их использование более удобно, когда неизвестна потребность микроорганизма в конкретном факторе роста и он одновременно нуждается в нескольких [134]. Также, чем шире перечень ростостимулирующих компонентов в стимуляторе роста, тем он более универсален по отношению к микроорганизмам [97; 119]. Кроме того, Н.Г. Баронец [18] при сравнении стимулирующего действия на ряд микроорганизмов растительных экстрактов, содержащих комплекс биологически активных веществ и этих же веществ, внесенных по отдельности, установила, что последние не оказывают такого стимулирующего влияния, как весь комплекс веществ, содержащийся в экстрактах.

По мнению ряда авторов, стимуляторы роста и питательные добавки обладают селективным действием по отношению к большинству микроорганизмов, а при избыточном внесении некоторых из них возможно ингибирование ростовых свойств микроорганизмов [26; 36; 242]. Стимулирующий эффект для широкого круга микроорганизмов при их культивировании может быть достигнут при сочетании различных ростостимулирующих компонентов в одной питательной смеси [97].

Известно довольно много стимуляторов, представленных в форме экстрактов, настоев, аутолизатов. В качестве стимулятора роста микроорганизмов большой популярностью пользуется экстракт кормовых дрожжей (ЭКД), который очень богат витаминами и белками [138]. Так Н.И. Каменский и И.К. Тутов [73] использовали ЭКД в количестве 0,3% в качестве стимулятора роста листерий. В качестве стимулятора роста чумного микроба, возбудителей холеры, бруцеллеза и туляремии был предложен кукурузный экстракт [92]. Для получения стимуляторов роста различных микроорганизмов Н.Г. Баронец [18] использовала водные экстракты растений (слоевища морской капусты, траву пастушьей сумки, фиалки, зверобоя и хвоща, семена льна, корни алтея и солодки, столбики с рыльцами кукурузы, молодые побеги белокочанной капусты, цветки календулы). Стимули-

рующий эффект достигался за счет содержания в экстрактах активных действующих веществ, таких как полисахариды, флавоноиды, витамины, в том числе витамин К, органические кислоты. Установлено стимулирующее действие экстракта солодовых ростков на некоторые виды плесневых грибов [6]. Изучено стимулирующее действие экстракта душицы, листьев осины, листьев липы и плодов боярышника на кишечную палочку [1]. Кроме того, в качестве сырья для приготовления экстрактов используются пивные и хлебные дрожжи, печень, сердце, соя, горох, овес, отруби, морковь, свекла, картофель и др. В процессе изготовления экстрактов необходимо уделять внимание таким критериям как тщательное измельчение сырья, его чистота, свежесть, избегание сильной термической обработки [129; 193; 200; 237].

Одним из распространенных видов предварительной обработки сырья для микробиологических целей является гидролиз – процесс расщепления белка до аминокислот и простейших пептидов, играющих роль экзорегуляторов метаболизма [12; 171]. В микробиологии гидролизаты используют как в качестве основных компонентов питательных сред, так и стимуляторов роста микроорганизмов [8; 49]. Основными составляющими гидролизатов являются аминокислоты и пептиды. Гидролиз проводят преимущественно химическими или ферментативными способами. К химическим способам обработки относится воздействие на белки кислот и щелочей [180].

Кислотный гидролиз позволяет довольно быстро проводить деструктуризацию разных белков, но при этом, в зависимости от условий гидролиза, происходит разрушение некоторых аминокислот. Так триптофан разрушается полностью, цистин – до следовых количеств, частично серин, треонин, аспарагин, глутаминовая кислота, витамины. Кроме того, кислотные гидролизаты содержат в своем составе высокие концентрации солей, меланоидов, а также продукты карамелизации сахаров, поэтому нуждаются в очистке и осветлении [180].

Щелочной гидролиз белков ведет к разрушению метионина, цистеина и витаминов, при этом треонин и триптофан сохраняются [62; 180; 267].

Ферментативный гидролиз проводят при помощи различных ферментов животного (пищеварительные), растительного или микробного происхождения. Состав ферментативных гидролизатов в первую очередь зависит от специфичности используемого фермента, от первичной структуры белка и степени его денатурирования, а также времени гидролиза [180]. За счет щадящей формы гидролиза ферментативные гидролизаты содержат большой набор аминокислот и витаминов в доступной и активной форме [180; 239; 268].

Качество любого гидролизата зависит главным образом от аминокислотного состава сырья, вида гидролиза, выбранного фермента, количества используемой воды, предварительной обработки сырья, длительности гидролиза, условий перемешивания [55; 83; 168; 179; 180; 215]. Поэтому важно для каждого сырьевого субстрата правильно подбирать соответствующий ему, наиболее адекватный вид гидролиза [193]. На сегодняшний день разработан и внедрен большой перечень стимуляторов роста микроорганизмов на основе гидролизатов. Так, В.К. Голшмид с соавторами [37] рекомендовано внесение в питательные среды веществ-стимуляторов на основе гидролизатов крови. На примере *Staphylococcus aureus* и *Shigella flexneri* И.Н. Ткаченко [193] установлен ростостимулирующий эффект ферментативного гидролизата калифорнийских червей и ферментативного гидролизата молока лососевых рыб. Установлено, что при добавлении к питательным средам гидролизатов и экстрактов из водорослей увеличивается рост грибов, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leginella pneumophila* [10; 226]. В качестве стимуляторов роста Н.И. Пеньковой [127] разработаны и апробированы ферментативные гидролизаты из симбионта *Medusomyces gysevii* и растения *Callisia fragrans*, которые обеспечили интенсивный прирост количества и диаметра колоний лактобактерий.

Исследователем В.В. Зайцевым и Ю.Г. Зелютковым [60] изучено влияние щелочного гидролизата торфа в качестве биостимулятора на рост сальмонелл, эшерихий, пастерелл, рожистых бактерий. Рядом авторов совместно с М.Я. Ярцевым [220] установлено, что при добавлении к средам препарата на основе дрожжевого гидролизата и ферментативного казеиново-дрожжевого гидролизата происходит стимуляция роста и накопление производственных штаммов пастерелл.

Разработаны и апробированы в качестве стимуляторов роста *Leptospira pomona* гидролизаты из плодов и кожуры бананов, тканей куриного эмбриона [143], а также экстракт из спирулины с добавлением эмбрионально-яичной массы кур [142]. Также в качестве стимулятора роста лептоспир рядом авторов предложен ферментативный гидролизат мышц (ФГМ), использование которого позволило добиться высокого экономического эффекта при изготовлении вакцины против лептоспироза [167]. На основе культуральной жидкости чайного гриба И.К. Тутовым, В.И. Ситьковым [121], а также М.Н. Веревкиной [28] разработан стимулятор роста ТС-1 (СРМ ТС-1). Добавление стимулятора в совокупности с гидролизатами животного и растительного происхождения к питательным средам обеспечивает прирост биомассы микроорганизмов: листерий, сальмонелл, пастерелл, возбудителя рожи свиней [28; 112; 152].

С целью улучшения ростовых качеств к питательным средам добавляют гидролизаты из рыбо-костной муки, криля, кильки [96] креветок, камчатского краба, исландского гребешка, кукумари [13; 53; 110]. Исследователь М.Р. Аmezaga с соавторами [223] отмечает высокое стимулирующее действие пептона на рост *L. monocytogenes*, полученного при гидролизе животных белков и состоящего из сложной смеси пептидов и аминокислот. Автор отмечает важную роль специфических пептидов в поддержании тургора микробных клеток и стимуляции их роста. В некоторые питательные среды кроме экстрактов и гидролизатов добавляют отвары и настои из дрожжей, печени в качестве дополнительных источников ростовых веществ, содержащие никотиновую, парабензойную, пантотеновую кислоты, а также витамины В, С и другие, которые часто относят к стимуляторам роста микроорганизмов [22; 200].

Несмотря на высокий биологический потенциал сырья, используемого для приготовления стимуляторов роста микроорганизмов, некоторыми авторами предприняты дополнительные попытки его повышения с помощью определенных манипуляций. Так Н.В. Панова [119] при разработке стимулятора роста широкого круга микроорганизма «ЭСРМ» добивалась повышения биологической активности исходного сырья – эмбрионально-яичной массы птиц, при помощи облучения

яиц полупроводниковым низкочастотным лазерным аппаратом и помещением их в холодильную камеру по методу В.П. Филатова [203]. Использование данных манипуляций значительно повысило биологическую активность полученного препарата. Этот же комплекс методов был применен И.Н. Ткаченко [193] при разработке стимулятора роста на основе ферментативного гидролизата калифорнийских червей. Активация калифорнийских червей позволила повысить биологическую активность нативной вермикультуры на 30%. Метод В.П. Филатова в своей работе также использовала Н.И. Пенькова [127] для выработки биогенных стимуляторов в растительном сырье, используемом для приготовления стимулятора роста микроорганизмов.

Таким образом, анализ представленной в данном разделе литературы свидетельствует о том, что грань между содержаниями понятий «стимулятор роста» и «фактор роста» нечеткая. Однако, мы солидарны с исследователями, которые используют понятие «стимулятор роста», подразумевая при этом возможность его влияния на прирост бактериальной массы при добавлении в любую, даже в полноценную, в том числе стандартизованную питательную среду.

Стимуляторы роста являются одним из перспективных оптимизирующих факторов процесса культивирования микроорганизмов. В зависимости от биосинтетических возможностей микроорганизмов, одно и то же вещество может оказывать стимулирующее действие на рост микроорганизма, выступая в роли катализатора химических процессов, или быть необходимым для развития питательным компонентом, используемым для постройки клеточных структур, который микроорганизм не может самостоятельно синтезировать, или же его наличие может быть совсем не обязательным. Многими авторами отдается предпочтение в пользу использования в качестве стимуляторов роста поликомпонентных субстанций биологического происхождения. Особое внимание при изготовлении стимуляторов роста стоит уделить подбору рациональной технологии обработки сырья, для сохранения и повышения в конечном продукте максимального количества биологически-активных веществ, к числу которых относят фрагменты нуклеиновых кислот, пептиды, аминокислоты, микро-, макроэлементы, витамины, и

другие соединения, в том числе низкомолекулярные. В качестве технологических приемов, обеспечивающих соответствующие требования к стимулятору роста, заслуживает внимание гидролиз, а также ряд дополнительных манипуляций, которые обеспечивают наличие в его составе комплекса необходимых для роста микроорганизмов веществ, представленных в доступной форме.

Обобщая все материалы, представленные в обзоре литературы, можно сделать вывод, что производство вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных на этапах культивирования бактерий и их лиофилизации нуждается в дополнительных манипуляциях, позволяющих повысить выход биомассы листерий и их выживаемость на этапе сублимационного высушивания вакцины. Решение данного вопроса отдельными, немногочисленными исследованиями предлагается за счет введения дополнительных биологически активных веществ. Этот факт открывает перспективы для дополнительных изысканий в этой сфере.

Имеются заслуживающие внимания сведения о потребности микроорганизмов в процессе роста и размножения в составных частях нуклеиновых кислот и пептидах. Кроме того, пептиды определенной длины обладают специфическими протективными свойствами. К сожалению, не удалось найти конкретных данных о результатах использования, качественном и количественном составе стимуляторов роста микроорганизмов, содержащих фрагменты нуклеиновых кислот и пептиды как самостоятельно, так и в комплексе с другими биологически-активными веществами.

Вышеизложенное обусловило интерес к разработке стимулятора роста микроорганизмов, основным действующим началом которого являются пептиды и фрагменты нуклеиновых кислот в комплексе с другими биологически активными компонентами, а также к изучению его действия на некоторые биологические свойства листерий при их культивировании и при сублимационном высушивании в процессе производства вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования по диссертационной работе проводились в период с 2010 по 2017 г.г. 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».

Вся экспериментальная работа складывалась из следующих этапов:

1. Изготовление ферментативных гидролизатов из яблок, зебрины повислой, перепелиных яиц, изучение их физических, химических свойств и стимулирующего действия по отношению к *Listeria monocytogenes*.
2. Разработка технологии получения СРМП, изучение его физических, химических свойств и стимулирующего действия по отношению к *Listeria monocytogenes*.
3. Добавление СРМП к питательной и защитной средам при изготовлении опытных серий вакцин против листериоза сельскохозяйственных животных, оценка качества вакцин.

Методика изготовления ферментативных гидролизатов и оценка их качества

Для изготовления ферментативных гидролизатов использовали следующее сырье: инкубационные яйца перепелов породы Фараон (внеэмбриональные и эмбриональные ткани) в количестве 300 штук, культивируемое в лабораторных условиях декоративное растение зебрина повислая (*Zebrina pendula*) – 1 кг, яблоки сезонные – 10 кг.

Для повышения биотехнологических потенциалов сырья мы использовали методику получения тканевых препаратов по В.П. Филатову [203]. Для этого сре-

занные листья зебрины повислой помещали в бумажный пакет и в холодильную камеру на 10 суток при температуре 2–4°C. Перепелиные яйца после инкубирования при температуре 38°C в течение 8 суток также помещали в холодильную камеру на 7 суток при температуре 2–4°C.

Основой для получения ферментативных гидролизатов явились рекомендации, изложенные Ю.А. Козловым [79] с нашими модификациями, которые заключались в разбавлении субстрата водопроводной водой в соотношении 1:3 (одна часть субстрата к трем частям воды), выдерживании субстанции при температуре 45°C, в присутствии панкреатина из расчета 25 ЕД на 200 мл.

Для приготовления одной серии гидролизата каждого вида использовали 30 инкубационных перепелиных яиц, 1 кг яблок, 0,2 кг зебрины повислой.

В готовых гидролизатах определяли: рН, аминный азот, сухой остаток, микро-, макроэлементы, аминокислоты, витамины.

Водородный показатель рН измеряли портативным рН-метром FG2-Kit Mettler Toledo (Швейцария).

Аминный азот определяли методом формольного титрования с доведением раствора до рН=9,1 в соответствии с МУК 4.2.2316–08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [104].

Сухой остаток определяли с помощью анализатора влагосодержания МВ 25 Ohaus (Швейцария).

Анализ микро- и макроэлементов (цинк, железо, медь, марганец, кальций, натрий, калий, магний, кобальт) проводили методом атомно-абсорбционной спектрофотометрии на приборе ААС марки Perkin Elmer 2280 (США) [219].

Анализ свободных аминокислот осуществляли методом тонкослойной хроматографии [210].

Витамины выявляли с помощью качественных реакций [133]. Тиамин (В₁) определяли диазобензолсульфатом, рибофлавин (В₂) реакцией концентрированной соляной кислоты с цинком. Наличие никотиновой кислоты (РР) подтверждали реакцией уксусной кислоты и раствором уксуснокислой меди.

Для тестирования ростовых качеств питательных сред с исследуемыми суб-

станциями использовалась культура *Listeria monocytogenes* вакцинного штамма «АУФ». Для оценки стимулирующего действия всех ферментативных гидролизатов их добавляли к агару Хоттингера в дозе 1% к объему среды, после чего засеивали чашки Петри культурой *L. monocytogenes*, контролем служил агар без добавок. Посевы культивировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов, после чего проводили визуальный контроль роста листерий и подсчет характерных колоний.

Методика изготовления СРМП и оценка его качества

Для изготовления СРМП использовали инкубационные яйца перепелов породы Фараон (внеэмбриональные и эмбриональные ткани) в количестве 1000 штук.

Инкубацию перепелиных яиц осуществляли в инкубаторе ИЛБ-0,5 (Россия) с автоматическим регулированием параметров инкубации в течение 8 суток. Озонирование перепелиных яиц проводили до инкубации и на 3–и, 5–е, 7–е, 8–е сутки в течение 15 минут (производительность озона 300 мг/ч) в закрытом полиэтиленовом мешке объемом 35 л при помощи бытового озонатора «Гроза» (Россия). После инкубации яйца помещали в холодильный шкаф Liebherr medline (Германия) при температуре $2\text{--}4^\circ\text{C}$ на 7 суток. После извлечения яиц из холодильной камеры их обрабатывали спиртовым раствором йода, облучали в течение 15 минут УФЛ, вскрывали и гомогенизировали содержимое в лабораторном миксере Sterilmixer 12 (PVI, Италия) в течение 5 минут. Гомогенат разбавляли дистиллированной водой 1:3 и пятикратно гомогенизировали с помощью гомогенизатора высокого давления APV Lab Series Homogenizers 2000 (Германия) при 1000 атм·сфер.

После гомогенизации под давлением был проведен кислотный гидролиз полученной субстанции с учетом рекомендаций И.В. Ржепаковского, С.С. Аванесян, Л.Д. Тимченко [140] в нашей модификации, которая заключалась в снижении концентрации соляной кислоты в объеме субстанции до 0,5%. Затем субстанцию автоклавировали при 125°C в течение 30 минут при помощи автоклава СПВА-75-1НН Транс-сигнал (Россия). Полученный гидролизат охлаждали и нейтрализовали 10%-ным раствором NaOH, после чего центрифугировали при 8000 об/мин в те-

чение 15 минут на центрифуге Universal 320 и фильтровали через бязь. Для стерилизации препарат повторно автоклавировали 30 минут при 120°C.

Для подтверждения прироста уровня биогенных стимуляторов после помещения инкубированных восьмисуточных перепелиных яиц в холодильную камеру использовали способ К. Бакирджиева [68], основанный на изменении бродильной активности дрожжей под действием испытуемого препарата.

В процессе отработки технологии изготовления СРМП нами дополнительно проведены исследования по доказательству бактерицидного действия озона на микроорганизмы на скорлупе перепелиных яиц в процессе их инкубации. Согласно «Инструкции по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях» [65] со скорлупы перепелиных яиц были сделаны смывы перед закладкой в инкубатор до и после озонирования, а затем на 3-и, 5-е, 7-е, 8-е сутки инкубации только до озонирования. Смывы высевали на чашки Петри с агаром Хоттингера и культивировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ 24 ч, после чего проводили визуальную оценку выросших колоний и оценку мазков, окрашенных по методу Грама, для идентификации микроорганизмов.

Параллельно, для исключения негативного влияния озона на перепелиный эмбрион, проводили его морфометрию и исследовали гистологические особенности. Массу тела перепелиных эмбрионов определяли с помощью электронных весов ВЛТЭ-150 с точностью до 0,001 г (Россия). Длину тела эмбриона определяли с помощью электронного штангенциркуля ШЦЦ-II 0-250 0,01 (Россия). За длину тела эмбриона принимали размер от верхушки черепа до конца хвоста. Вычисляли индекс Кетле I, характеризующий пропорциональность развития организма, который основан на отношении массы тела к его длине [197].

$$I = \frac{P}{L}$$

Гистологические исследования перепелиных эмбрионов проводились по общепринятой технологии. Фиксацию эмбрионов осуществляли в 10%-ом растворе формалина. Резку эмбрионов осуществляли на микротоме «Техном

МЗП-1003» при помощи замораживающего устройства «ТЕХНОМ ОМТ-0228» при температуре минус 8–12°C. Срезы наклеивали на стекла и окрашивали гематоксилин-эозином, заключали в бальзам и высушивали [175]. На окрашенных гистологических препаратах проводили общую структурную оценку ткани.

Фотографирование гистологических препаратов осуществляли при помощи комплекса визуализации изображения на базе микроскопа «Микмед-2» (Россия) и цифровой фотокамеры «Olympus-5060» (Япония).

Для подтверждения биостимулирующего действия озона на перепелиный эмбрион в гомогенатах эмбрионов озонированных и неозонированных яиц, исследовали общий азот, белок, пептиды, РНК и ДНК.

Общий азот и содержание пептидов определяли по методикам, изложенным в ГОСТ 13805–76 «Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей» [40].

Количественная оценка содержания белков в образцах проводилась методом связывания красителей по Брэдфорду с использованием кумасси бриллиантового синего [52].

Количество рибонуклеиновых кислот (РНК) и дезоксирибонуклеиновых кислот (ДНК) в образцах проводилась методом специфической флуоресценции при помощи флуориметра Qubit 2.0, Life Technologies (США).

Для подтверждения эффективности гомогенизации под высоким давлением в промежуточной субстанции до гомогенизации и после определяли размер частиц с помощью анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS (Великобритания). Кроме того, определяли количество общего азота, белка, пептидов, РНК, ДНК по вышеописанным методикам.

В итоговом препарате «СРМП» определяли аминный азот, сухой остаток, микро- и макроэлементы, витамины (В₁, В₂, РР) по методикам, использованным при оценке качества ферментативных гидролизатов, а общий азот, белок, пептиды, РНК, ДНК, размер частиц по методикам, использованным применительно к промежуточным субстанциям.

Аминокислотный состав СРМП определяли при помощи автоматического

анализатора аминокислот ARACUS (ABACUS, Германия).

Стерильность СРМП определяли путем посева препарата на тиогликолевую среду согласно МУК 4.2.2316-08 (Методы контроля бактериологических питательных сред) [104].

Для исследования безвредности СРМП отбирали по одной пробе каждой из десяти серий препарата, определяли его реактогенность с учетом местной реакции при подкожном введении, с учетом общего состояния животных, выживаемости, а также гематологических показателей животных.

Для проведения испытаний использовали морских свинок (350–400 г), из которых были сформированы опытная и контрольная группы по 10 животных в каждой. Опытной группе животных препарат вводили подкожно в дозе 1 мл/кг живой массы тела однократно. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в той же дозе. Наблюдение за животными осуществляли в течение 7 суток.

Определение местной реакции осуществляли согласно методикам, изложенным в ГОСТ 31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности» [44].

Выживаемость и общее состояние животных учитывали по истечению срока наблюдения. Кровь для исследований брали до введения СРМП и после окончания наблюдения путем нанесения насечек на край уха животного. Общий анализ крови исследовали на гематологическом автоматическом анализаторе MicroCC-20Plus НТІ (США). Дополнительно для дифференциального подсчета лейкоцитов проводили микроскопию мазков крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Определение производилось четырехполосным методом с подсчетом не менее 200–300 клеток.

Оценку стимулирующего действия СРМП по отношению к *L. monocytogenes* проводили в сравнении с ФГЭП (ферментативный гидролизат эмбрионально-яичной массы перепелов) на плотных и жидких питательных средах.

Для определения оптимальной стимулирующей дозы субстанции добавляли к агару Хоттингера в количестве 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2 % к объему среды, кон-

тролем служил агар без добавок. Культуру засекали во все чашки Петри с агаром и инкубировали в термостате при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов.

При культивировании листерий на бульоне Хоттингера субстанции добавляли к среде в дозе 1%, контролем служил бульон без добавок. Культуру засекали во все флаконы с бульоном Хоттингера и инкубировали в термостате при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. Далее делали десятикратные разведения выросшей культуры и высевали на агар Хоттингера в чашки Петри из 10^{-6} разведения по 0,1 мл. После инкубирования посевов при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов делали подсчет выросших колоний и оценивали биологические свойства листерий.

Культурально-морфологические свойства листерий оценивали на всех этапах работы. Результаты учитывали визуально, путем подсчета выросших колоний, а также при микроскопии мазков, приготовленных из суточных культур, выросших на плотных или жидких питательных средах и окрашенных по методу Грама.

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).

Дополнительно при сравнительной оценке стимулирующего действия СРМП и ФГЭП изучали биохимические, гемолитические свойства и подвижность *L. monocytogenes*.

Способность сбрасывать углеводы, гемолитическую активность листерий и их подвижность определяли согласно методикам, изложенным в МУК 4.2.1122–02 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах» [103].

Гемолитическую активность листерий определяли по образованию зон просветления за счет растворения эритроцитов вокруг колоний при посеве на поверхность кровяного агара, приготовленного с добавлением стерильной дефибрированной крови барана.

Подвижность листерий оценивали по характеру роста культуры в уколе столбика ПЖА.

Способность культуры сбраживать углеводы оценивали при ее пересеве на среды Гисса, содержащие следующие сахара: рамнозу, арабинозу, лактозу, маннит, маннозу, инозит, сахарозу, глюкозу, ксилозу, мальтозу. Наличие ферментативной активности в отношении углеводов определяли по изменению окраски сред за счет образования кислоты.

Каталазную активность культуры определяли по методике, представленной в ГОСТ 30425 «Консервы. Метод определения промышленной стерильности» по способности каталазы разлагать перекись водорода с выделением пузырьков газа [43].

Использование СРМП при изготовлении вакцин против листериоза сельскохозяйственных животных и контроль их качества

В процессе работы было изготовлено три серии вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, из которых две опытные и одна промышленная.

При изготовлении вакцины с использованием СРМП в качестве стимулятора роста, препарат добавляли к производственной питательной среде в дозе 1% на каждом этапе культивирования листерий от получения первой генерации до выращивания в ферментере. При этом на каждом этапе оценивали стимулирующий эффект препарата путем высева культуры из 10^{-6} разведения на агар Хоттингера и подсчета колоний. На завершающем этапе культивирования листерий в ферментере стимулирующий эффект СРМП оценивали путем центрифугирования и взвешивания их биомассы.

При испытании СРМП в качестве составной части защитной среды высушивания препарат добавляли в дозе 1% к объему сахарозо-желатиново-пептонно-тиомочевинно-глутаматной среды.

Контролем в обоих случаях служила производственная серия вакцины, изготовленная с применением классических питательных и защитных сред. 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”» [185] и

СТО №00482861–0079-2012.

Каждая из трех серий вакцин оценивалась по следующим критериям:

- внешний вид и наличие механических примесей;
- растворимость в физиологическом растворе;
- массовая доля влаги (ГОСТ 24061–2012 [41]);
- наличие контаминации посторонней микробной, грибной микрофлоры и типичность роста. (ГОСТ 28085–2013 и ГФ XI, вып. 2 [42; 45]);
- определение концентрации живых листерий в вакцине;
- безвредность;
- иммуногенная активность.

Для определения концентрации живых листерий 3 флакона с сухой вакциной разводили до первоначального объема и готовили десятикратные разведения. Для испытания использовали 2 разведения вакцины: 10^{-8} , 10^{-9} . Из каждого разведения проводили посеы по 0,1 мл на поверхность МПА с 0,5–1% глюкозы, содержащего 15–20% инактивированной сыворотки крупного рогатого скота, в пяти чашках. Посевы инкубировали при температуре $36 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 72 ч., после чего подсчитывали количество выросших колоний в чашках по каждому разведению. Полученные показатели суммировали и делили на количество чашек, определяя среднее количество живых бактерий для каждого разведения, содержащихся в $0,1 \text{ см}^3$ и определяли концентрацию живых бактерий в 1 см^3 вакцины по следующей формуле:

$$X = \frac{\frac{P}{g} + \frac{P_1 \times 10}{g_1}}{2} \times 10 \times 10^8$$

- где X – число живых бактерий в $1,0 \text{ см}^3$;
- P – количество колоний во всех чашках из разведения 10^{-8} ;
- g – количество чашек с разведением 10^{-8} ;
- P_1 – количество колоний во всех чашках из разведения 10^{-9} ;
- g_1 – количество чашек с разведением 10^{-9} ;
- 2 – количество испытуемых разведений;

- 10 – перерасчет количества живых бактерий на $1,0 \text{ см}^3$;
- 10^8 – степень разведения вакцины.

Количество доз вакцины во флаконе устанавливали путем деления количества живых листерий в $1,0 \text{ см}^3$ на 7,5 (7,5 млрд живых микробных клеток составляют иммунизирующую дозу) и умножения на объем вакцины во флаконе.

Концентрацию живых листерий во всех изготовленных сериях вакцины исследовали после сублимационного высушивания. Дополнительно для изучения влияния СРМП на жизнеспособность листерий в процессе лиофильного высушивания и хранения вакцины этот же показатель исследовали в вакцине с использованием СРМП в составе защитной среды и в производственной серии вакцины до высушивания и к концу срока годности вакцины – через 12 месяцев.

Для испытания вакцины на безвредность готовили общую пробу из 3 расфасовочных единиц с препаратом. Три образца вакцины ресуспензировали физиологическим раствором до первоначального объема, а затем общую пробу трех флаконов доводили до концентрации 10 млрд/см^3 . Подготовленную смесь вакцины вводили внутримышечно в области внутренней поверхности бедра трем кроликам (2,0–2,5 кг) в дозе 2 см^3 ($10 \text{ млрд живых листерий в } 1 \text{ см}^3$). Животные находились под наблюдением десять суток. Препарат считали безвредным, если животные оставались живыми и клинически здоровыми в течение срока наблюдения.

При исследовании иммуногенности контрольной и опытной серии вакцины, общую пробу трех флаконов доводили до концентрации 5 млрд/см^3 и вводили 10 морским свинкам (350–400 г) внутривентрально по 2 см^3 ($5 \text{ млрд живых листерий в } 1 \text{ см}^3$).

Через 12 суток всех вакцинированных и 10 контрольных морских свинок заражали внутривентрально патогенным штаммом листерий «А-исходный» в дозе 3ЛД_{50} . В течение десяти суток не менее семи контрольных животных должны погибнуть, а из десяти иммунизированных не менее семи выжить.

Данные, полученные в ходе экспериментов, обработаны с помощью программы Primer of Biostatistics (Version 4.03).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

Принципиальным моментом получения качественного стимулятора роста микроорганизмов является выбор сырья и способа его переработки, который позволит сохранить все питательные и стимулирующие компоненты [159].

В качестве оптимальных сырьевых объектов, в соответствии с задачами, поставленными в работе, нами выбраны: зебрина повислая (*Zebrina pendula*), яблоки сезонные, инкубационные яйца перепелов породы Фараон.

В процессе поиска нового сырья для стимуляторов роста микроорганизмов нами учитывался ряд требований:

- оптимальный по отношению к потребностям листерий химический состав;
- доступность сырья;
- экологическая чистота и безвредность;
- экономическая эффективность применения [156].

В частности, выбор зебрины повислой (*Zebrina pendula*) (Рисунок 1) определен в первую очередь богатым химическим составом растения.

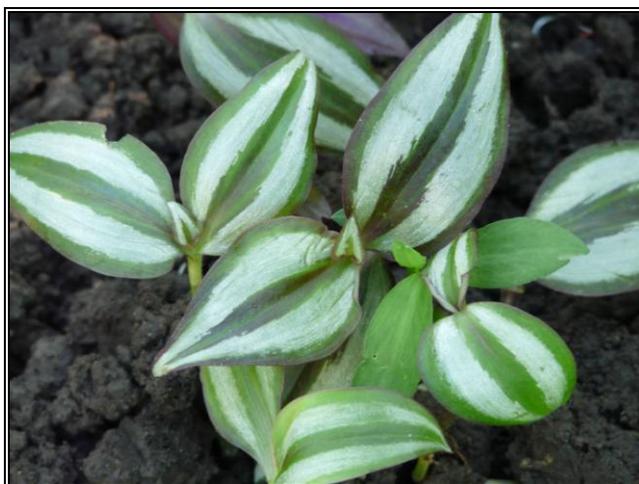


Рисунок 1 - Зебрина повислая (*Zebrina pendula*)

Имеются сведения, что в зебрине содержатся каротиноиды, аскорбиновая кислота, флавоноиды, пектины, дубильные вещества (танины), углеводы и минеральные элементы: железо, фосфор, калий, кальций, магний, медь, цинк, хром, селен, что не только не противоречит, но и отвечает метаболическим потребностям многих микроорганизмов, в том числе *L. monocytogenes* [147]. Кроме того, имеются сообщения об удачном использовании родственного зебрине растения – каллизии душистой (*Callisia fragrans*) в изготовлении питательных сред [127], что и позволило нам рассматривать зебрину в качестве нетрадиционного сырья для приготовления стимулятора роста микроорганизмов.

Выбор яблок был обусловлен их широкой доступностью, дешевизной, богатым набором сахаров, витаминов РР и Е, аминокислот [217], а также калия и железа, необходимых целому ряду микроорганизмов. Содержание железа в яблоках составляет около 630 мкг [108], что интересно, поскольку есть данные о стимулирующей роли соединений железа на листерии [181; 232; 274; 283].

Кроме того, имеются сведения об эффективном использовании яблочных выжимок в составе питательных сред [129; 131].

Использование перепелиных яиц обусловлено богатым химическим составом, который по многим количественным показателям лучше состава куриных яиц. При этом нами использованы как внеэмбриональные, так и эмбриональные ткани.

Яйца перепелов содержат в своем составе калий, железо, витамины В₁ и В₂, являющиеся стимуляторами роста широкого спектра микроорганизмов, витамин А, никотиновую кислоту (РР), фосфор, медь, большой набор аминокислот [50; 128; 206]. По содержанию таких незаменимых аминокислот, как тирозин, треонин, лизин, и гистидин, перепелиные яйца также превосходят куриные. Есть мнение, что присутствующий в яйцах белок овомукоид подавляет аллергические реакции [57]. По нашему мнению, этот факт важен при использовании перепелиных яиц в технологии приготовления вакцин. Перепелиные эмбрионы отличаются повышенной жизнеспособностью, а содержащийся в яйцах лизоцим препятствует развитию нежелательной микрофлоры [57]. Кроме того,

устойчивость перепелов к инфекционным заболеваниям позволяет содержать их, не прибегая к вакцинации, что исключает накопление в яйцах лекарственных веществ [106].

Эмбриональные ткани обладают высоким энергетическим, биохимическим потенциалом и высокой метаболической активностью [139; 170; 188]. Кроме того, птичий эмбрион безопасен, экологичен, поскольку максимально изолирован от внешней среды, что снижает вероятность инфицирования, при этом обладает всеми преимуществами, которые присущи плацентарной и эмбриональной тканям животных [153; 186; 192].

Таким образом, все виды выбранного сырья имеют богатый химический состав, в котором имеются элементы с известной стимулирующей ролью на широкий спектр микроорганизмов, в том числе на листерии. Кроме того, не исключается комплексное стимулирующее действие других элементов, а также дополнительно образовавшихся в субстанции биологически активных веществ, которое может проявиться после технологической обработки представленных сырьевых объектов.

Все выбранные субстанции подвергались ферментативному гидролизу, так как он является более щадящим по сравнению с химическим гидролизом, не вызывает рацемизацию аминокислот и разрушение триптофана, а также обеспечивает сохранность витаминов и других биологически активных веществ [62; 180].

Процесс приготовления гидролизатов включал три стадии:

- подготовительную (заготовка сырья, в том числе отбор, репродукция сырья в экологически чистых условиях лаборатории, а также активация сырья);
- основную (гидролиз);
- заключительную (расфасовка, закупорка гидролизатов, контроль качества, этикетирование).

Приготовление ферментативного гидролизата из зебрины повислой

Зебрину повислую выращивали согласно рекомендациям А. Савиной [147] в лабораторных условиях. Растение выращивалось в широких и неглубоких емкостях, из-за быстро разрастающейся корневой системы, при умеренном поливе и

регулярном опрыскивании во избежание поражения паутиным клещом.

Для повышения биотехнологических потенциалов сырья нами использовалась широко известная методика получения тканевых препаратов по В.П. Филатову [203]. В ее основе лежит учение о выработке в организме, под воздействием на него неблагоприятных для жизни условий, биогенных стимуляторов. Механизм их действия на организм сводится к влиянию на обменные и энергетические процессы [137]. К биогенным стимуляторам некоторые авторы относят, прежде всего, низкомолекулярные пептиды [88], другие авторы относят вещества небелковой природы, а именно яблочную, лимонную, молочную, янтарную, карбоновые кислоты [145; 203].

Известны результаты исследований Н.В. Пановой [119], И.Н. Ткаченко [193], Н.И. Пеньковой [127] по применению данного метода к сырью как растительного, так и животного происхождения с целью получения из него питательных сред и стимуляторов роста микроорганизмов.

Для выработки растениями биогенных стимуляторов срезали стебельки с листьями (не менее 30 см в длину) и помещали в бумажный пакет, а затем в холодильную камеру, где они выдерживались согласно Н.И. Пеньковой [127] 10 суток при температуре 2–4°C.

Листья и стебли зебрины повислой, подвергшиеся активации, взвешивали, промывали под проточной водой, мелко нарезали и измельчали в гомогенизаторе. Затем заливали водопроводной водой в соотношении 1:3 (одна часть измельченных листьев к трем частям воды), доведенной до $45 \pm 1^\circ\text{C}$. Полученную смесь подщелачивали Na_2CO_3 до $\text{pH}=8,2$ по фенолфталеину, помещали в трехлитровый стеклянный баллон, куда добавляли ферменты. В качестве комплекса ферментов был выбран панкреатин. Есть мнение, что гидролизаты, полученные с его использованием, содержат больше всего аминного азота и пептона [200]. Кроме того, это доступный и дешевый комплекс ферментов, куда входит липаза, трипсин, химотрипсин, а также альфа-амилаза, которая позволяет гидролизовать крахмал [127].

Панкреатин добавляли из расчета 25 ЕД на 200 мл. К общему объему содержимого баллона вливали 2% хлороформа. Баллон закрывали ватно-марлевой

пробкой и помещали в термокамеру при температуре $45 \pm 1^\circ\text{C}$, где выдерживали в течение 11 суток. При этом первые сутки баллон встряхивали через каждые 15 минут по 5 минут, а в последующие дни через каждые два часа по 5 минут.

При измерении аминного азота, начиная со вторых суток, видна ежедневная тенденция его роста, который прекращался к 11 суткам. Критерием продолжительности гидролиза являлись стойкие показатели аминного азота минимум в течение нескольких суток.

Через 11 суток гидролизат фильтровали через бязь, а затем через фильтровальную бумагу и добавляли 2% хлороформа к общему объему.

На заключительной стадии гидролизат фасовали в стерильные флаконы по 100 мл, пробковали резиновыми пробками и металлическими колпачками, хранили при температуре $2-8^\circ\text{C}$. Гидролизат представляет собой прозрачную жидкость коричневого цвета (Рисунок 2.А.).

Приготовление ферментативного гидролизата из яблок

Яблоки, отобранные из частного хозяйства, мыли под проточной водой, извлекали семечки, мелко нарезали и гомогенизировали. Далее процесс приготовления гидролизата был идентичен способу приготовления гидролизата из зебрины.

Со вторых суток ежедневно измеряли уровень аминного азота. В результате было отмечено нарастание аминного азота до 10 суток, после чего данный показатель практически не изменялся.

После фильтрации и добавления хлороформа гидролизат представляет собой прозрачную жидкость светло-желтого цвета (Рисунок 2.Б.).

Приготовление ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов

Яйца перепелов, полученные из благополучного хозяйства, инкубировали в течение 8 суток при температуре 38°C . Выбор периода инкубации перепелиных яиц обусловлен тем, что на более поздних сроках у перепелиных эмбрионов появляются зачатки перьев и клюв, что вызывает сложности при перемолке сырья и фильтрации в цикле приготовления гидролизата.

В соответствии с принципами, изложенными И.В. Ржепаковским [139], яйца

после инкубации выдерживали в холодильной камере при температуре 2–4°C в течение 7 суток. Затем яйца извлекали из холодильной камеры, обрабатывали спиртовым раствором йода и УФЛ в течение 15 минут. После этого их аккуратно разбивали и извлекали содержимое. Для дальнейших манипуляций использовали только содержимое яиц с эмбрионами.

Эмбрионально-яичную массу перепелов гомогенизировали, и далее процесс приготовления гидролизата был идентичен способу приготовления гидролизата из зебрины.

Со вторых суток гидролиза ежедневно измеряли уровень аминного азота, который существенно нарастал до 12 суток, с последующей стабилизацией к 13-м суткам.

После фильтрации и добавления хлороформа гидролизат представляет собой прозрачную жидкость желтого цвета (Рисунок 2.В.).

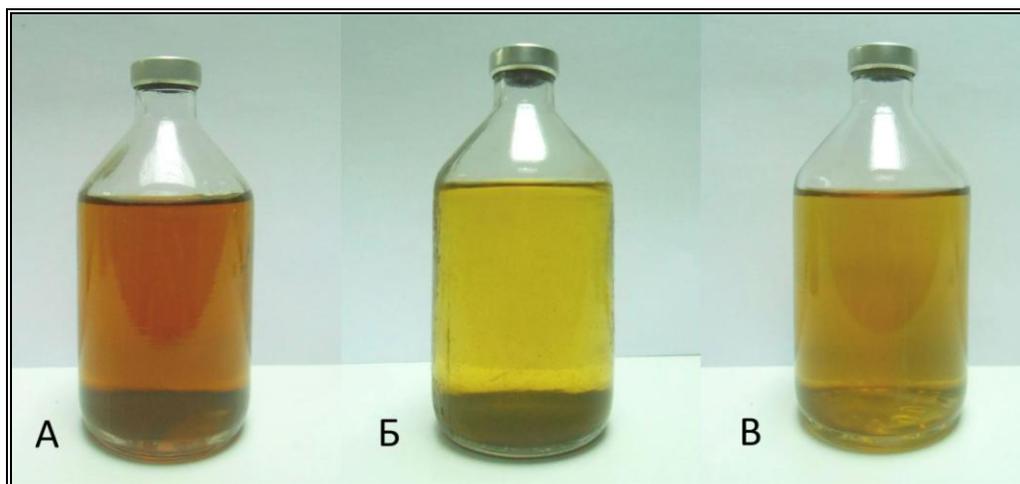


Рисунок 2 – Ферментативные гидролизаты: А – из зебрины повислой (*Zebrina pendula*); Б – из яблок; В – из эмбрионально-яичной массы перепелов

Показатель аминного азота в приготовленных гидролизатах свидетельствует о глубине прошедшего гидролиза и наличии продукта распада белка – аминокислот. Из результатов исследования гидролизатов, обобщенных в Таблице 1, видно, что наиболее высокий уровень аминного азота отмечен у ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов. Однако, по нашему мнению, независимо от уровня аминокислот в любом гидролизате не исключается на-

личие той или иной аминокислоты, необходимой в соответствии с нашими задачами. Это обусловило интерес к качественному анализу аминокислот в гидролизатах.

Таблица 1 – Физико-химические показатели гидролизатов ($M \pm m$)

Наименование гидролизата	Кол-во серий	Цвет гидролизата	Показатель аминного азота, мг/%	Сухой остаток, %	pH
ФГ из зебрины	10	коричневый	$63,9 \pm 2,0$	$5,3 \pm 0,2$	$6,1 \pm 0,2$
ФГ из яблок	10	светло-желтый	$47,2 \pm 1,6$	$6,0 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,2$
ФГ из эмбрионально-яичной массы перепелов	10	желтый	$151,3 \pm 4,3$	$4,0 \pm 0,1$	$7,3 \pm 0,3$

Наличие сухого остатка в гидролизатах свидетельствует о присутствии в них других многочисленных составных компонентов, в том числе небелковой природы (микро-, макроэлементов, витаминов и т.д.), что определило дальнейшее изучение их качественного и количественного состава.

Опираясь на литературные данные, свидетельствующие о наиболее значимых для метаболизма микроорганизмов микро- и макроэлементах, в десяти пробах каждого гидролизата был определен уровень цинка, железа, меди, марганца, кальция, натрия, калия, магния, а также кобальта [159; 187] (Таблица 2).

Таблица 2 – 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	-	-	0,3	-	0,7	359,4	1320,5	33,1
	\pm 0,06			\pm 0,08		\pm 0,06	\pm 7,0	\pm 6,1	\pm 0,6
ФГ из яблок	5,6	3,3	-	0,5	-	43,5	687,2	1276,2	20,4
	\pm 0,19	\pm 0,14		\pm 0,07		\pm 0,5	\pm 6,2	\pm 8,5	\pm 0,4
ФГ из эмбрионально-яичной массы перепелов	0,2	2,3	0,10	-	-	6,9	408,6	750,5	32,2
	\pm 0,07	\pm 0,17	\pm 0,05			\pm 0,2	\pm 4,7	\pm 8,0	\pm 0,8

Примечание: Эксперимент проводился в десяти повторах

Установлено, что все гидролизаты содержат цинк, кальций, натрий, калий и магний. Медь обнаружена в следовых количествах только в ферментативном гид-

ролизате из эмбрионально-яичной массы перепелов, при этом в нем полностью отсутствует марганец, в отличие от гидролизатов из яблок и зебрины повислой, где он обнаружен в количестве $0,5 \pm 0,07$ и $0,3 \pm 0,08$ мкг/мл соответственно. Кобальт не обнаружен ни в одном из гидролизатов.

Уровень цинка в гидролизате из яблок ($5,6 \pm 0,15$ мкг/мл) существенно превышает этот показатель во всех других гидролизатах. Также данный гидролизат наиболее богат железом ($3,3 \pm 0,14$ мкг/мл), немногим меньше этот показатель у гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов. В ферментативных гидролизатах из зебрины повислой железа не обнаружено.

Больше всего кальция отмечено в гидролизате из яблок ($43,5 \pm 0,5$ мкг/мл), как и натрия ($687 \pm 6,2$ мкг/мл). Калий преобладает во всех гидролизатах, его наибольший показатель отмечен в гидролизате из зебрины ($1320,5 \pm 6,1$ мкг/мл). По уровню магния лидируют гидролизаты из зебрины и эмбрионально-яичной массы перепелов ($33,1 \pm 0,6$ и $32,2 \pm 0,8$ мкг/мл соответственно).

Все выявленные микро- и макроэлементы в той или иной степени необходимы микробной клетке и участвуют в ее метаболизме, при этом не исключается как их трофическая роль, так и стимулирующее действие. Так, есть литературные данные о стимулирующем действии соединений железа. Однако его действие в концентрации, содержащейся в малых (стимулирующих) дозах гидролизатов, требует экспериментального подтверждения, так же как и действия комплекса остальных обнаруженных элементов.

В качестве компонентов, стимулирующих рост микроорганизмов, важная роль отводится витаминам, особая роль отводится витаминам группы В, которые входят в состав коферментов или их простетических групп, обеспечивая многочисленные метаболические процессы в микробной клетке и являясь факторами роста. В связи с вышеизложенным, в гидролизатах из зебрины повислой, яблок, эмбрионально-яичной массы перепелов, методом качественных реакций был проведен анализ витаминов В₁, В₂, а также РР [189].

В результате исследований установлено, что наиболее ярко выражены качественные реакции на витамины В₁, В₂ и РР в гидролизате из эмбрионально-яичной

массы перепелов. В гидролизате из яблок отмечено наличие витамина В₁, читается слабо выраженная реакция на витамин В₂. В гидролизате из зебрины повислой реакция на витамин В₁ визуально не читается. Слабо выражена в данном гидролизате реакция на витамин В₂, отмечено наличие витамина РР.

Согласно литературным источникам все выявленные витамины (В₁, В₂, РР) оказывают стимулирующее действие на широкий спектр микроорганизмов, однако, для нормального роста листерий на питательных средах особенно можно выделить наличие витамина В₁.

Аминокислоты являются важнейшими факторами роста микроорганизмов. В приготовленных гидролизатах было исследовано наличие 12 аминокислот: метионин, триптофан, лизин, аспарагин, аспарагиновая кислота, валин, аргинин, глутамин, лейцин, изолейцин, треонин, цистин [155; 159].

Многие из этих аминокислот входят в состав питательных сред, таких как агар Хоттингера, обеспечивая ростостимулирующий эффект большинства микроорганизмов [193]. Следует отметить, что агар Хоттингера является классической производственной питательной средой, в том числе при культивировании листерий в производстве вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных (ТР 00482861-0061-2009).

Установлено, что во всех пробах гидролизатов обнаружены следующие аминокислоты: аспарагин, аспарагиновая кислота, валин, лизин, цистин, треонин, изолейцин, аргинин, метионин. Ферментативные гидролизаты из яблок и зебрины повислой, кроме перечисленных аминокислот, включают также глутамин.

Таким образом, из 12 исследуемых аминокислот, в гидролизатах выявлены шесть (валин, метионин, аргинин, глутамин, изолейцин, цистин), являющиеся важными для роста листерий и стимулирующими его, а три (аспарагиновая кислота, лизин, треонин) соответствуют питательным потребностям микроорганизма [14; 180].

Установленные особенности физико-химического состава всех полученных гидролизатов обуславливают их потенциальные свойства 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*.

Гидролизаты добавляли непосредственно к плотным питательным средам (агар Хоттингера). Подбирая концентрацию гидролизатов, мы опирались на данные Н.В. Пановой [119] и И.Н. Ткаченко [193], по результатам экспериментов которых самой результативной стимулирующей дозой добавления стимулятора к питательной среде является количество до 1%. Исходя из этого, нами была выбрана доза добавления гидролизатов в количестве 1% от объема питательной среды.

В качестве контроля нами использовался агар Хоттингера без добавления гидролизатов. Посев микроорганизмов производили в количестве 100 микробных клеток и далее выращивали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов.

Таблица 3 -- 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 \pm 2,3*
Агар Хоттингера с ФГ из яблок	5	71,7 \pm 2,1*
Агар Хоттингера с ФГ из эмбрионально-яичной массы перепелов	5	82,5 \pm 2,8*
Контроль (агар Хоттингера)	5	65,8 \pm 1,8

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

Из результатов Таблицы 3 видно, что при добавлении к питательной среде гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов количество колоний *Listeria monocytogenes* увеличилось на 16,7 (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 8,5 (12,9%) и 5,9

(9,0%) соответственно.

Таким образом, гидролизат из эмбрионально-яичной массы перепелов проявил лучший стимулирующий эффект, следовательно, 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.

3.2. Технологические подходы к получению нового стимулятора роста листерий на основе эмбрионально-яичной массы перепелов и оценка его качества

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

Учитывая стимулирующее действие ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов на *Listeria monocytogenes*, его химический состав, включающий компоненты с потенциальными стимулирующими свойствами, считаем целесообразным использование эмбрионально-яичной массы перепелов для дальнейшей разработки технологии нового стимулятора роста листерий. Кроме того, литературный обзор свидетельствует о стимулирующем действии низкомолекулярных компонентов, среди которых интерес представляют пептиды и фрагменты нуклеиновых кислот, являющиеся, по нашему мнению, важнейшими факторами роста. Поэтому в основу технологии получения нового стимулятора роста нами положены, в первую очередь, принципы, направленные на повышение уровня этих компонентов.

Существует ряд требований и характеристик, предъявляемых к стимуляторам роста микроорганизмов. Важнейшими, на наш взгляд, характеристиками являются высокая концентрация, в том числе ростостимулирующих компонентов на

единицу объема, а также стопроцентная стерильность конечного продукта. Обеспечение данных требований к стимуляторам полностью зависит от исходного сырья и биотехнологических манипуляций, проводимых с ним.

Несмотря на то, что нами использованы свежие неинфицированные перепелиные яйца из благополучного по основным эпизоотически угрожающим заболеваниям птицы хозяйства, а их инкубация, являющаяся одним из важнейших биотехнологических этапов, проводится в лабораторных условиях под строгим контролем, не исключается возможность их инфицирования посторонней, в том числе условно – патогенной микрофлорой. Кроме того, в связи с интенсивным ростом и развитием, эмбрионы очень чувствительны к изменениям условий внешней среды, поэтому массовое инфицирование ведет к замедлению развития и гибели значительного количества эмбрионов [93]. Поэтому необходим поиск технологических манипуляций, способных не только обеспечить стерильность сырья, но и не противоречащих, а даже способствующих повышению и накоплению в нем биологически активных веществ. Крайне важно обеспечение чистоты инкубационных яиц в цикле приготовления стимулятора роста микроорганизмов, так как от жизнеспособности эмбрионов и их качества зависят качество и свойства самого конечного продукта.

В связи с вышеизложенным, в качестве одного из технологических приемов воздействия на инкубационные перепелиные яйца нами был выбран метод озонирования.

Выбор данного метода обусловлен целым рядом факторов. Есть многочисленные данные о бактерицидном, фунгицидном, вирулицидном действии озона [9; 71; 135; 136], что немаловажно для его использования в процессе биотехнологических манипуляций. Озон экологически совместим с биопроцессами, легко и быстро нейтрализуется [94]. По нашему мнению, данный метод доступен и экономичен.

Озон и его производные оказывают влияние на белки и нуклеиновые кислоты [85], при этом мнения о положительном и отрицательном эффекте такого влияния разноречивы.

Имеются сообщения о том, что озон в определенных дозах обладает биостимулирующим эффектом [23; 24], стимулирует эмбриональное развитие и повышает процент выживаемости эмбрионов [84; 87; 169; 174].

Несмотря на большое количество положительных свойств озона, есть данные и о негативном его влиянии в определенных дозах на куриный эмбрион [284]. Так, озон является токсичным и относится к веществам 1-го класса опасности [85].

Исходя из того, что исследователи при изучении действия озона на яйца, используют разные режимы озонирования, приборы с различной мощностью, разные схемы и повторность обработки яиц (до закладки в инкубатор, во время инкубации, на определенные сутки), а озонирование проводится с различными целями, а также исследуются эмбрионы разного возраста и от разной птицы, по нашему мнению, сравнивать имеющиеся данные с целью выбора конкретной дозы для решения задач, определенных в нашей работе, проблематично. В связи с вышеизложенным и опираясь на рекомендации других исследователей, мы сочли целесообразным отработку [158] эмпирическим путем режима озонирования в процессе получения стимулятора роста листерий.

В технологическом цикле приготовления стимулятора роста микроорганизмов инкубацию яиц осуществляли в течение 8 суток. Яйца озонировали до инкубации и на 3-и, 5-е, 7-е, 8-е сутки, при дозе озона, изложенной в инструкции к прибору «Гроза» [66] и рекомендуемой для дезинфекции пищевых продуктов. Озонирование проводили в течение 15 минут (производительность озона 300 мг/ч) в закрытом полиэтиленовом мешке объемом 35 л. Схема многократного озонирования выбрана для достижения максимальной чистоты яиц, поскольку после их однократной обработки озоном не исключается даже активизация роста некоторых микроорганизмов при дальнейшей инкубации, а также дополнительное обсеменение микрофлорой из окружающей среды при последующих технологических манипуляциях с яйцами.

Отсутствуют сведения о влиянии многократного озонирования в выбранной нами дозировке на перепелиный эмбрион, поэтому, в связи с вышеизложенным,

нами было проведено изучение:

- бактерицидного действия озона, примененного по указанной схеме, на перепелиные яйца в процессе их инкубации;
- влияния выбранного способа озонирования на жизнеспособность и особенности развития 8-суточного перепелиного эмбриона;
- влияния многократного действия озона по указанной схеме на уровень белка, пептидов, нуклеиновых кислот в эмбрионально-яичной массе на 8-е сутки инкубации.

Для подтверждения эффективности выбранной схемы озонирования, нами была изучена динамика бактерицидного эффекта в смывах со скорлупы перепелиных яиц при инкубации [160].

Перед закладкой в инкубатор со скорлупы яиц были сделаны смывы, до и после озонирования. Затем смывы производились на 3-и, 5-е, 7-е, 8-е сутки инкубации только до озонирования. Все смывы высевали на чашки Петри с агаром Хоттингера и культивировали в термостате при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 24 ч.

Результаты исследований показали, что смывы со скорлупы яиц перед инкубацией до озонирования обеспечили на чашках Петри сплошной рост микроорганизмов (Рисунок 3.А.), из которых идентифицировано 3 типа: *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

В посевах из смывов, сделанных сразу после обработки яиц озоном, не отмечено роста микрофлоры, что свидетельствует о моментальном бактериостатическом или бактерицидном действии озона.

При оценке смывов, высеянных на третьи сутки инкубации, визуально установлено снижение числа колоний вышеперечисленных микроорганизмов (Рисунок 3.Б.) по сравнению с посевами до инкубации и озонирования. На пятые сутки – колонии протей не выявлены, при общем снижении количества колоний кишечной палочки и стафилококка до $3 \times 10^2 \pm 0,2$ колоний (Рисунок 4.А.). К седьмым суткам не выявлены колонии кишечной палочки, дали рост лишь отдельные колонии стафилококка в виде мелкой росы желтоватого цвета (Рисунок 4.Б.), к восьмым суткам – рост микрофлоры отсутствовал.

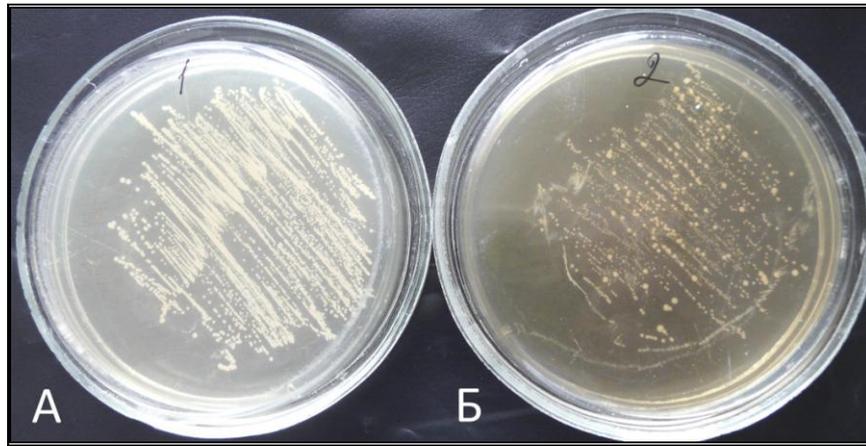


Рисунок 3 – Рост микрофлоры смывов: А – до инкубации и озонирования яиц; Б – на 3-и сутки инкубации яиц до озонирования

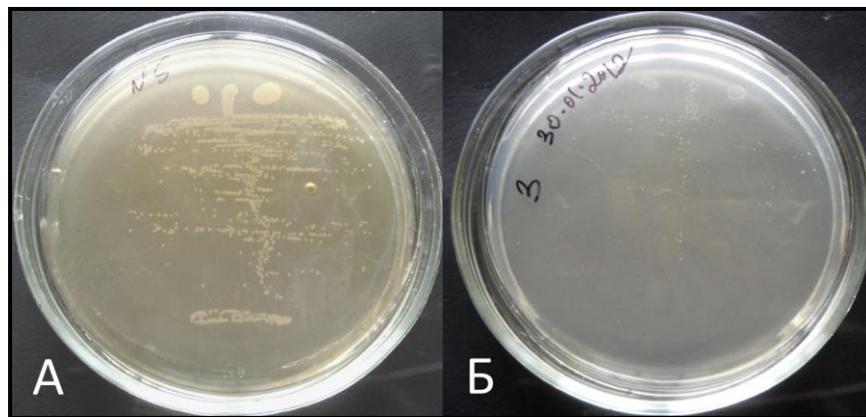


Рисунок 4 – Рост микрофлоры смывов: А– на 5-е сутки инкубации яиц до озонирования; Б – на 7-е сутки инкубации яиц до озонирования

Таким образом, пятикратное озонирование (до инкубации и на 3-и, 5-е, 7-е, 8-е сутки) является эффективным приемом, который обеспечивает обеззараживание скорлупы инкубационных яиц, а также исключает дальнейшее ее обсеменение в технологическом цикле получения стимулятора роста микроорганизмов на всех этапах инкубации.

Не менее важным этапом работы, по нашему мнению, является учет выживаемости эмбрионов, особенностей развития и их морфометрических показателей под действием озона. Это обусловлено использованием только живых и здоровых эмбрионов для дальнейших манипуляций при изготовлении стимулятора роста микроорганизмов. В то же время наличие паталогических процессов или нарушений развития не исключает отрицательного влияния на метаболизм и генетиче-

ские параметры эмбриона, что может сопровождаться появлением тех или иных продуктов обмена, которые в составе стимулятора роста впоследствии могут оказать отрицательное влияние на рост и развитие микроорганизма.

В частности, известно, что повышенные концентрации озона обладают общетоксическим действием, канцерогенностью и мутагенностью [20; 204], связанной с его способностью вызывать дефекты в структурах нуклеиновых кислот, тем самым снижая нормальную генетическую функцию ДНК [85].

В результате исследований установлено, что из ста инкубационных яиц на 8-е сутки выживаемость эмбрионов составила 92% в экспериментальной группе, и 90% в контрольной (контролем служили неозонированные яйца).

Отмечена закладка всех наружных органов, характерных для данного периода со свойственной для них структурой и окраской. Отсутствуют внешние аномалии развития, кровоизлияния и видимые признаки повреждения (Рисунок 5).



Рисунок 5 – Внешний вид перепелиного эмбриона на 8-е сутки развития

Нами исследованы морфометрические показатели эмбриона (длина тела, масса), которые использовали для расчета индекса Кетле I, позволяющего оценивать пропорциональность развития (Таблица 4) [164].

Масса и длина эмбрионов в опытной группе (эмбрионы, подвергавшиеся озонированию) увеличивается по сравнению с контролем (эмбрионы не подвергавшиеся озонированию) на 0,17 г (8,7%) и 0,24 см (7,1%) соответственно. Значения индекса Кетле I в опытной группе эмбрионов не выходят за пределы значений

в контрольной группе. Увеличение массы эмбрионов под действием озонирования дает предпосылки судить об увеличении в нем уровня белка – источника пептидов, а также о повышении выхода объемов сырья и, следовательно, итогового препарата.

Таблица 4 – Морфометрические показатели перепелиных эмбрионов на 8-е сутки развития после озонирования, ($M \pm m$), $n=100$

Сутки развития	Опыт			Контроль		
	Масса (m), г	Длина (L), см	Кетле I	Масса (m), г	Длина (L), см	Кетле I
8	2,13±0,05*	3,61 ±0,08*	0,59±0,01	1,96 ±0,05	3,37 ±0,08	0,58±0,01

Примечание: * ($P \leq 0,05$) – статистически достоверные результаты по отношению к контролю

Для исключения негативного влияния озона на развитие перепелиного эмбриона дополнительно проведены исследования тотальных поперечных серийных гистологических срезов эмбрионов. Их изучение показало, что к концу 8–х суток как в опытной, так и в контрольной группах визуализируются все внутренние органы, свойственные этому периоду с характерной топографией и размерами: сердце, печень, почки, селезенка, тимус, желудочно-кишечный тракт (ЖКТ).

Мы уделили внимание изучению печени и сердца как жизненно важным органам, хорошо визуализированным и развитым в этот период. Как в опытной, так и в контрольной группах на гистологических срезах печени хорошо визуализируются дольки с сохраненной балочной структурой (Рисунок 6).

В поле зрения различаются многочисленные сосуды, представленные сосудами синусов и центральными венами. Гепатоциты приобретают к этому периоду характерное строение, имеют чаще округлую форму, четко выраженные ядра, мембрана очерчена. Отдельные клетки с признаками деления. У некоторых эмбрионов опытной группы отмечено расширение синусов и переполнение сосудов кровью, что вероятно связано со стимулирующим влиянием озона на кровообращение.

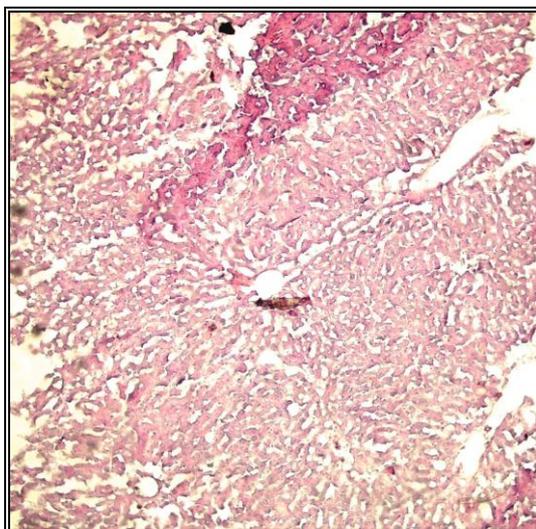


Рисунок 6 – Печень эмбриона опытной группы на 8-е сутки развития, окраска гематоксилин-эозином, $\times 40$

В опытной группе достаточно развито и четко просматривается сердце с хорошо видимыми мышечными волокнами, между которыми по всей поверхности органа визуализируются как артериальные, так и венозные сосуды различного диаметра (Рисунок 7). Полость сердца сформирована. В контрольной группе принципиальных отличий в строении сердца нет.

Кроме того, на срезах в обеих группах четко просматривается закладка позвоночного столба, где хорошо видны элементы спинного мозга (Рисунок 8).

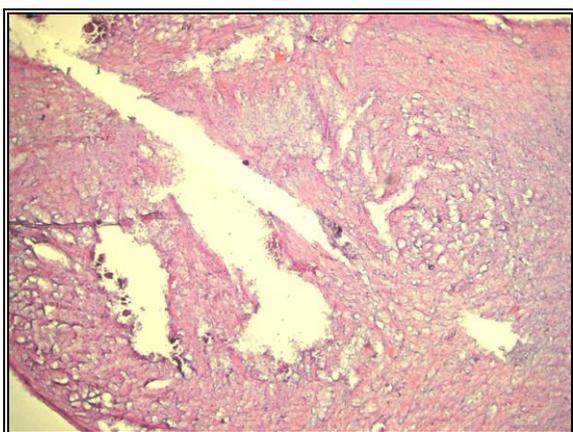


Рисунок 7 – Сердце эмбриона опытной группы на 8-е сутки развития, окраска гематоксилин-эозином, $\times 40$



Рисунок 8 – Позвонок с элементами спинного мозга эмбриона опытной группы на 8-е сутки развития, окраска гематоксилин-эозином, $\times 40$

По периферии просматриваются крупные сосуды внеэмбриональных тканей

(Рисунок 9). ЖКТ хорошо развит и представлен элементами кишечной трубки (Рисунок 10).



Рисунок 9 – Сосуд внеэмбриональных тканей эмбриона опытной группы на 8-е сутки развития, окраска гематоксилин-эозином, × 40

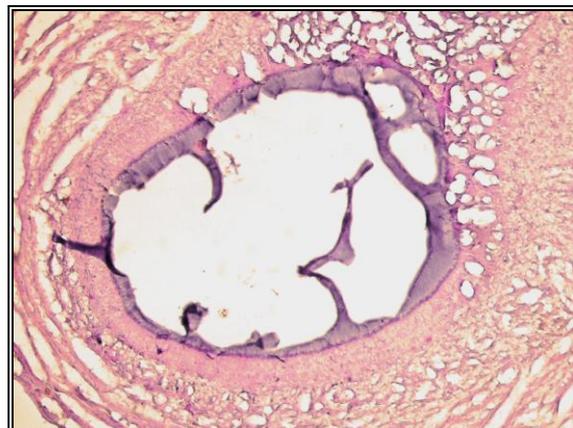


Рисунок 10 – Элемент кишечной трубки эмбриона опытной группы на 8-е сутки развития, окраска гематоксилин-эозином, × 40

Оценка выживаемости, морфологических особенностей эмбрионов в целом и их жизненно важных органов, показала отсутствие негативного влияния озона при использовании по выбранной схеме на их жизнеспособность и развитие.

Для постройки собственных нуклеиновых кислот микроорганизмам необходимы органические азотсодержащие вещества, в том числе пуриновые и пиримидиновые основания, пептиды [134], которые зачастую являются для них стимуляторами роста. Кроме того, эти вещества выступают важнейшими показателями интенсивности белкового обмена [163], а уровень и качество белка являются, по нашему мнению, важным биотехнологическим приоритетом. При этом белок выступает главным источником пептидов.

Так как озон обладает высокой окислительной способностью, улучшает кислородно-транспортную функцию, ускоряет метаболизм [61], не исключается его влияние, как на белковый обмен, так и на уровень нуклеиновых кислот.

Учитывая вышеизложенное, а также уже установленный факт увеличения массы эмбрионов под действием озона, сочли необходимым исследовать его влияние на следующие показатели: общий азот, свободный белок, пептиды, нуклеиновые кислоты в гомогенате перепелиных эмбрионов. Контролем служил го-

могенат из перепелиных эмбрионов, не подвергавшихся озонированию.

После инкубации восьмисуточных эмбрионов гомогенизировали в течение 5 минут на лабораторном миксере Sterilmixer 12 (PBI) при 12500 об/мин, в полученных гомогенатах контрольной и опытной группы исследовали количество общего азота, белка, пептидов, нуклеиновых кислот (Таблица 5).

Таблица 5 – Количество общего азота, белка, пептидов, нуклеиновых кислот в гомогенатах, полученных из эмбрионов озонированных и неозонированных перепелиных яиц, ($M \pm m$)

Наименование субстанции	Количество общего азота, мг/мл	Количество свободного белка, мг/мл	Количество пептидов, мг/мл	Нуклеиновые кислоты	
				РНК, мг/мл	ДНК, мкг/мл
Гомогенат из эмбрионов озонированных яиц	5,4±0,2*	24,2±0,8*	6,7±0,2*	2,15±0,07*	35,80±1,15*
Гомогенат из эмбрионов неозонированных яиц (контроль)	4,6 ±0,2	21,5±0,7	5,5±0,2	1,89±0,06	30,62±0,99

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

Установлено, что количество общего азота и свободного белка в гомогенате из эмбрионов озонированных яиц больше на 0,8 мг/мл (17,4%) и 2,7 мг/мл (12,6%) соответственно, чем в гомогенате из неозонированных. Также в гомогенате из эмбрионов озонированных яиц количество пептидов, РНК и ДНК превышает аналогичные показатели в контрольной субстанции на 1,2 мг/мл (21,8%), 0,26 мг/мл (13,8%) и 5,18 мкг/мл (16,9%) соответственно.

Таким образом, результаты исследований, свидетельствующие о биостимулирующем и бактерицидном эффекте, подтвердили целесообразность использования озона по выбранной схеме в качестве метода повышения биотехнологического потенциала сырья – инкубационных перепелиных яиц. При этом эффективность биостимуляции выражается в повышении массы и длины эмбрионов, содержания в них уровня белково-пептидных соединений и нуклеиновых кислот. Это обусловило дальнейшее использование озона в технологии приготовления стимулятора роста листерий.

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

Теоретические предпосылки и собственные наблюдения позволили сделать заключение о том, что разрабатываемый в соответствии с поставленными задачами стимулятор роста микроорганизмов должен соответствовать следующим требованиям:

- 1) быть изготовленным из доступного, экологически чистого сырья;
- 2) иметь химический состав не только не противоречащий, но и удовлетворяющий метаболическим потребностям культивируемого микроорганизма;
- 3) иметь высокую концентрацию биологически активных веществ, обладающих потенциальным ростостимулирующим эффектом, среди которых, с учетом литературных данных, нами отдано предпочтение пептидам, фрагментам нуклеиновых кислот, биогенным стимуляторам (в соответствии с термином, предложенным В.П. Филатовым), а также микро-, макроэлементам, аминокислотам, витаминам;
- 4) обладать высоким ростостимулирующим эффектом при минимальной концентрации в составе питательной среды;
- 5) иметь низкий уровень опалесценции;
- 6) быть стерильным.

Для обеспечения вышеописанных характеристик нами была разработана технология получения стимулятора роста микроорганизмов с сокращенным названием «СРМП» (стимулятор роста микроорганизмов перепелиный). В основу технологии положено несколько принципов, в частности повышение выхода белковой массы и нуклеиновых кислот в сырье, трансформация полученных белковых соединений в пептиды, высвобождение из клеток нуклеиновых кислот и их дефрагментация. Наряду с основным назначением технологических манипуляций, их использование предусматривало решение таких задач, как обеспечение стерильности препарата и сохранности таких веществ, как аминокислоты, микро-,

макроэлементы, отдельные витамины.

Представленные выше принципы положены в основу формирования трех основных технологических этапов, представленных ниже.

Сырьем для стимулятора послужили инкубационные перепелиные яйца, являющиеся экологически чистым объектом с богатым химическим составом (белок, аминокислоты, витамины, микро-, макроэлементы). Наличие этих компонентов позволило рассчитывать на обеспечение ростостимулирующего эффекта по отношению к листериям.

Кроме того, на наш взгляд, яйца являются удобной моделью для осуществления прижизненных биотехнологических манипуляций с целью повышения в них концентрации биологически активных веществ и получения стимулятора роста, соответствующего вышеописанным требованиям (пункты 1, 2, 3, 4).

Указанные требования к стимулятору роста достигали за счет применения различных технологических манипуляций на разных этапах его приготовления.

Технология приготовления СРМП включает в себя три этапа.

Первый этап представлен:

– обработкой перепелиных яиц озоном в процессе инкубации с целью интенсификации метаболизма эмбрионов, итогом которого является повышение уровня белка – источника пептидов и уровня нуклеиновых кислот (3.2.1.), рассматриваемых нами как важнейшие составные компоненты разрабатываемого стимулятора роста микроорганизмов, а также с целью первичной дезинфекции яиц (3.2.1.) с учетом высокой вероятности обсемененности сырья;

– воздействием на перепелиный эмбрион жизненно неблагоприятных факторов для накопления в его тканях биогенных стимуляторов. Стимулирующее по отношению к микроорганизмам действие биогенных стимуляторов различной природы, полученных таким методом, доказано работами Н.В. Пановой [119].

На данном этапе нами проведен отбор свежих перепелиных яиц, полученных из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства, без трещин, насечек, наростов, загрязнений скорлупы со средней массой 11–14 г в количестве 100 штук. Яйца инкубировали в течение 8 суток при температуре 38°C. Инкуба-

цию яиц осуществляли в инкубаторе ИЛБ-0,5 (Россия).

В соответствии с ранее отработанной схемой (раздел 3.2.1.) перед инкубацией, а также на 3-и, 5-е, 7-е и 8-е сутки яйца озонировали в течение 15 минут (производительность озона 300 мг/ч) в закрытом пространстве (полиэтиленовый мешок объемом 35 л.) (Рисунок 11).



Рисунок 11 – Озонирование инкубационных перепелиных яиц

Опираясь на принципы, изложенные В.П. Филатовым [203], а также рекомендации И.В. Ржепаковского [139] и Н.В. Пановой [119], для получения биогенных стимуляторов яйца выдерживали в холодильной камере при температуре 2–4°C в течение 7 суток.

Биологическая активность тканевых препаратов обеспечивается наличием биогенных стимуляторов, поэтому степень ее прироста отражает их наличие в изготовленных субстанциях. В связи с этим, для подтверждения факта прироста уровня биогенных стимуляторов в изготовленной субстанции, нами использован метод К. Бакирджиева, ранее примененный рядом исследователей с целью оценки биологической активности тканевых препаратов [2; 119; 139; 193].

Биологическую активность десяти проб эмбрионально-яичной массы из перепелиных эмбрионов, подвергшихся воздействию низких температур (опыт 1) и эмбрионально-яичной массы из яиц, не подвергавшихся этому фактору (опыт 2), исследовали по отношению к дрожжам пробирочным способом и сравнивали с

контролем, которым служил 0,9%-ый раствор натрия хлорида. Показатели объема вытесненной жидкости в контроле принимали за 100% активность, остальные показатели рассчитывали по отношению к контролю. По результатам исследований получены следующие показатели (Таблица 6).

Таблица 6 – Биологическая активность активированной и неактивированной эмбрионально-яичной массы перепелов

Группа	Количество вытесненной из пробирок жидкости, мл										Среднее значение	
	Порядковый номер пробы										мл	%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Опыт 1	14,1	14,8	15,6	14,4	16,1	14,6	14,5	15,8	15,2	16,2	15,1±0,2	147
Опыт 2	12,3	13,0	13,7	12,5	14,7	12,8	13,2	14,0	13,8	15,0	13,5±0,3	131
Контроль	10,0	11,0	9,5	10,5	11,1	9,0	9,4	10,2	10,8	11,3	10,3±0,3	100

Из пробирок с контролем через 24 часа вытеснено $10,3 \pm 0,3$ мл жидкости, а из пробирок с эмбрионально-яичной массой перепелов, полученной из яиц без воздействия и под воздействием условий низкой температуры – $13,5 \pm 0,3$ мл и $15,1 \pm 0,2$ мл соответственно. Разница в объеме вытесняемой жидкости между контрольными пробирками и пробирками с эмбрионально-яичной массой перепелов из яиц без и под воздействием низкой температуры составила 31% и 47% соответственно, что свидетельствует о высокой биологической активности последней по отношению к дрожжам, а значит и о наличии в ней 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 осторожно вскрывали и отбирали эмбрионы без

каких-либо аномалий развития и признаков повреждения. Содержимое яиц (эмбриональные и внеэмбриональные ткани) подвергали первичной гомогенизации в течение 5 минут на лабораторном миксере Sterilmixer 12 (PBI) при 12500 об/мин.

Полученная после первичной гомогенизации масса представляет собой высокобелковую субстанцию с достаточно крупными белковыми молекулами, что обусловлено техническими возможностями гомогенизатора Sterilmixer 12 (PBI). Микроорганизмы же усваивают низкомолекулярные вещества, свободные аминокислоты, пептиды и пептоны, а высокомолекулярные белковые соединения не проникают через бактериальную оболочку [119; 182]. Поэтому одним из принципиальных моментов технологии является получение низкоразмерных соединений, как в промежуточной субстанции, так и в конечном продукте.

Имеются сообщения об использовании метода гомогенизации под высоким давлением, который позволяет добиться высокой степени измельчения, получение частиц микро- и наноразмеров и максимального выхода низкомолекулярных соединений в конечной субстанции. Кроме того, метод гомогенизации под высоким давлением позволяет получить стандартизованную по физико-химическим показателям субстанцию (размер и молекулярная масса частиц, коллоидная и термическая стабильность) [190].

Исследователи Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, П.А. Омелянчук [190] сообщают об использовании гомогенизатора высокого давления APV Lab Series Homogenizers 2000 для измельчения ранее разработанного ветеринарного препарата «СТЭМБ», изготовленного из эмбрионально-яичной массы кур. Результаты использования гомогенизатора показали увеличение в препарате количества низкомолекулярных частиц, по сравнению с контролем, а также повышение признаков его физической устойчивости (стабилизации).

Результаты, полученные в соавторстве, свидетельствуют о снижении среднего размера частиц в препарате, полученном с использованием гомогенизации под высоким давлением и получившем название «НИКА-ЭМ» в четыре раза, по сравнению с контрольным препаратом, что обеспечивает ему свойства наносубстанции и не исключает усиления специфичности его биологического действия [141].

Исходя из вышеизложенного, нами использован данный метод в цикле приготовления СРМП. Полученную после первичной гомогенизации массу смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1:3 (одна часть фильтрата к трем частям ДВ) для уменьшения вязкости раствора, после чего пятикратно измельчали на гомогенизаторе высокого давления при 1000 атмосфер. Кратность гомогенизации была отработана эмпирически, путем оценки получаемой субстанции по визуальным характеристикам (однородность, наличие устойчивой взвеси при встряхивании).

Для подтверждения эффективности гомогенизации под высоким давлением определяли размер частиц промежуточной субстанции до гомогенизации и после нее (Рисунок 12, Рисунок 13).

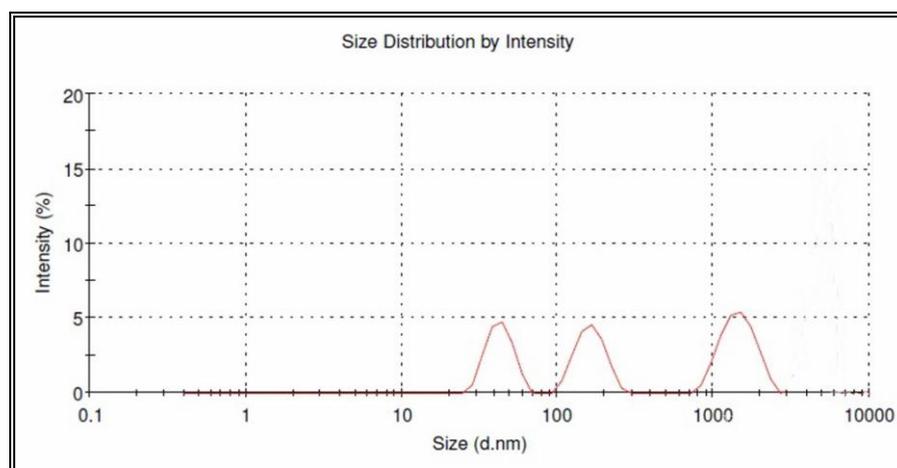


Рисунок 12 – Размер частиц субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов до гомогенизации под высоким давлением

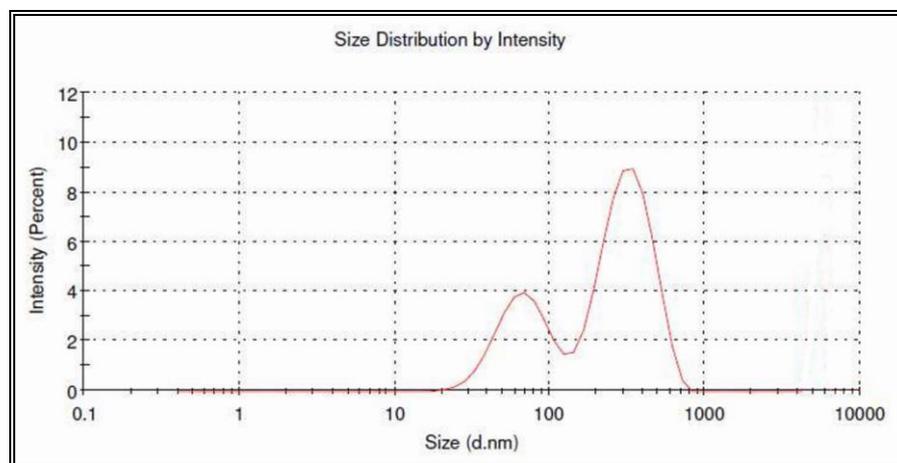


Рисунок 13 – Размер частиц субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов после гомогенизации под высоким давлением

На Рисунке 12 и Рисунке 13 представлены графические изображения, позволяющие проанализировать размер частиц исследуемой субстанции до и после гомогенизации под высоким давлением. Пики подъема кривой на графиках позволяют судить о диапазоне размера частиц (ось абсцисс) и их содержании (ось ординат, условное обозначение «интенсивность») в исследуемой субстанции. Так, на графике, представленном на Рисунке 12, отражающем размер частиц субстанции до гомогенизации, присутствуют три пика подъема кривой, с диапазоном диаметра частиц: 25–70; 90–300 и 700–3000 нм.

На графике, представленном на Рисунке 13, отражающем размер частиц субстанции после использования гомогенизатора высокого давления, присутствуют два пика подъема кривой с диапазоном диаметра частиц 20–130 и 130–800 нм. При сравнении двух графиков видно, что после гомогенизации под высоким давлением в субстанции исчезли частицы размером выше 1000 нм. Кроме того, уменьшение количества пиков с трех (до гомогенизации) до двух (после гомогенизации) свидетельствует о повышении однородности субстанции.

Поскольку молекулярная масса тесно связана с размерами биочастицы, то правомочно сделать заключение о том, что проведенные манипуляции способствуют деструктуризации богатейшего по структурно функциональному разнообразию клеточного компартмента эмбриона, а соответственно высвобождению в субстанцию разнообразных по молекулярной массе соединений, среди которых высоковероятно присутствие различных белково-пептидных комплексов, нуклеиновых кислот и их отдельных фрагментов.

Для подтверждения влияния гомогенизации под высоким давлением на уровень белка, пептидов и нуклеиновых кислот исследовали их количество в полученной промежуточной субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов (разбавленной 1:3) до и после гомогенизации.

Из результатов, представленных в Таблице 7 видно, что в субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов после гомогенизации под высоким давлением количество пептидов увеличилось на 3,6 мг/мл (69,2%), при уменьшении количества свободного белка на 6,4 мг/мл (32,3%). Количество нуклеиновых кислот

после гомогенизации возросло: РНК – на 0,29 мг/мл (59,2%), ДНК – на 3,8 мкг/мл (45,2%).

Таблица 7 – Влияние гомогенизации под высоким давлением на количество общего азота, белка, пептидов, нуклеиновых кислот в субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов, ($M \pm m$)

Наименование субстанции	Количество общего азота, мг/мл	Количество свободного белка, мг/мл	Количество пептидов, мг/мл	Нуклеиновые кислоты,	
				РНК, мг/мл	ДНК, мкг/мл
Субстанция из эмбрионально-яичной массы перепелов до гомогенизации под высоким давлением	4,3±0,1	19,8±0,6	5,2±0,2	0,49±0,01	8,4±0,3
Субстанция из эмбрионально-яичной массы перепелов после гомогенизации под высоким давлением	4,1±0,1	13,4±0,4*	8,8±0,2*	0,78±0,02*	12,2±0,3*

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

Таким образом, использование гомогенизации под высоким давлением в технологическом цикле приготовления стимулятора роста листерий позволяет повысить количество нуклеиновых кислот, а также низкоразмерных веществ, отражающих количество низкомолекулярных соединений, а именно пептидов.

Субстанция, полученная после вторичной гомогенизации, представляет собой непрозрачную жидкость желто-розового цвета с мелкозернистым осадком (Рисунок 14). При встряхивании образуется устойчивая взвесь. Так, визуальные характеристики, по нашему мнению, могут быть связаны с остаточным количеством неразрушенных высокомолекулярных белковых соединений ($13,4 \pm 0,4$ мг/мл) в промежуточной субстанции.

Добавление субстанции с повышенной мутностью к питательной среде существенно отразится на ее прозрачности, которая является обязательным условием культивирования и необходима для измерения оптической плотности и оценки роста микроорганизма.



Рисунок 14 – Внешний вид промежуточной субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов

Исходя из этого, на данном этапе был проведен кислотный гидролиз полученной субстанции с целью дополнительного расщепления белков и повышения прозрачности препарата. Нуклеиновые кислоты под действием кислотного гидролиза в зависимости от его жесткости распадаются на фрагменты (нуклеотиды, нуклеозиды, пуриновые и пиримидиновые основания) [111], что мы расцениваем как положительный момент для обеспечения качества итогового препарата, в соответствии с их ролью в микробной клетке.

По мнению Л.Я. Телишевой [180], кислотный гидролиз при оптимальном подборе условий характеризуется высоким расщеплением белков и частичным разрывом пептидных связей в гидролизуемой субстанции, что обуславливает наличие в ней как пептидов, так и свободных аминокислот. Этим в первую очередь был определен выбор данного вида гидролиза для переработки субстанции из эмбрионально-яичной массы перепелов, которая на данном технологическом этапе содержит достаточное количество белка. Кроме того, в изученных диапазонах размера частиц (Рисунок 13) среди низко- и высокомолекулярных соединений не исключается наличие пептидов, доведение которых до низкомолекулярного уровня рассматривается нами как рациональный технологический прием.

В то же время, этот вид гидролиза предполагает небольшие временные затраты и обеспечивает бактерицидные условия в ходе процесса, предотвращая бак-

териальную контаминацию [180].

Однако вызывает опасение возможное разрушающее действие кислотного гидролиза на полученные в результате предыдущих манипуляций низкомолекулярные пептиды. Также есть литературные данные, свидетельствующие о том, что при кислотном гидролизе происходит распад аминокислот до альдегида, аммиака и углекислого газа, а сахаров до гексозы – оксиметилфурфуrolа. Альдегиды и оксиметилфурфуrol взаимодействуют с новыми молекулами аминокислот, образуя меланоиды, образование которых при изготовлении питательных сред нежелательно, поскольку они могут оказывать токсическое действие на чувствительные системы [76].

Учитывая, что полученная после гомогенизации под высоким давлением субстанция не исключает содержание пептидов с разной молекулярной массой и наличия аминокислот, а также тот факт, что гомогенизация обеспечивает частичное расщепление белка за счет механического воздействия, считаем достаточным проведение кислотного гидролиза при щадящих условиях. По нашему мнению, такой вид гидролиза обеспечит максимальное расщепление крупных белково-пептидных комплексов и распад нуклеиновых кислот до их фрагментов, а также позволит частично сохранить имеющиеся низкомолекулярные пептиды и аминокислоты.

Кислотный гидролиз проводили с учетом рекомендаций И.В. Ржепаковско-го, С.С. Аванесян, Л.Д. Тимченко [140], 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 на центрифуге Universal 320 с целью очищения от балластных веществ и фильтровали через бязь.

Третий технологический этап представлен:

- расфасовкой;
- укупоркой полученного препарата в стерильные флаконы;
- стерилизацией конечного продукта;

- этикетированием;
- контролем качества препарата.

Гидролизат фасовали в стерильные флаконы (100 и 200 мл), закрывали резиновыми пробками, обкатывали металлическими колпачками.

Обеспечение итоговой стерильности готового препарата достигалась автоклавированием при 120°C в течение 30 минут.

Следует отметить, что стерильность препарата является одним из принципиальных условий его изготовления. По нашему мнению, нельзя допустить контаминацию препарата ни на одном из этапов его приготовления, так как даже убитые микроорганизмы и их метаболиты, попавшие со стимулятором в питательную среду, могут негативно повлиять на процесс культивирования листерий.

Поскольку сырьем для изготовления препарата является яйцо, изначально предполагающее обсеменение условно-патогенной микрофлорой, а также существует риск контаминации в процесс технологических манипуляций при изготовлении стимулятора роста, считаем необходимым использование многоэтапной, дробной стерилизации: сырья, промежуточной субстанции и готового препарата.

В целом, наряду с использованием автоклавирования на заключительном этапе, стерильность СРМП достигается несколькими этапами обеззараживания сырья: озонирование и обработка йодно-спиртовым раствором яиц на первом и втором технологическом этапе. Кроме того, на втором технологическом этапе использована гомогенизация под высоким давлением промежуточной субстанции, стерилизующий эффект которой доказан работами R. Lanciotti, F. Gardini, M. Sinigaglia', M.E Guerzoni [250], A. Diels [236], N. Cruz [233], а также кислотный гидролиз, обеззараживающая эффективность которого подчеркнута Л.Я. Телишевской [180].

Согласно вышеописанной технологии изготовлено 10 серий СРМП. Средний объем одной серии препарата составил 1480±45 мл. Готовый препарат хранили в холодильнике при температуре 4–8°C.

Качество полученного препарата оценивали по следующим показателям:

- визуальные характеристики;

- стерильность;
- безвредность;
- физические и химические характеристики.

Готовый препарат представляет собой прозрачную жидкость коричневого цвета, со средним показателем аминного азота по десяти изготовленным сериям – $92,7 \pm 2,8$ мг%, сухой остаток равен $3,2 \pm 0,1$ %, $pH=7,1 \pm 0,3$ (Рисунок 15).



Рисунок 15 – Внешний вид СРМП

Для исследования на стерильность из каждой серии СРМП отбирали три флакона и из каждого делали посеvy препарата на две пробирки с тиогликолевой средой. Одну пробирку выдерживали в термостате при температуре $35 \pm 1^\circ\text{C}$, другую при $20 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14 суток, при этом роста посторонней микрофлоры не обнаружено.

Исследование безвредности СРМП считаем принципиальным, так как его свойства (состав, биологическая активность) не исключают стимулирующее действие на широкий перечень микроорганизмов, а, следовательно, его использование при изготовлении вакцин, технологический цикл которых различен. В случаях использования вакцины, содержащей питательную среду с включенным в нее стимулятором, возможно его попадание в макроорганизм, что требует исключения по отношению к нему отрицательных последствий.

Кроме того, существует проблема, связанная со снижением жизнеспособности микроорганизмов в процессе сублимационного высушивания [17]. По нашему мнению, добавление стимуляторов роста в защитную среду высушивания может оказать положительный эффект на адаптационный потенциал бактерий, а следовательно и их жизнеспособность. В этом случае также неминуемо попадание стимулятора с защитной средой в макроорганизм.

Исходя из вышесказанного, а также тот факт, что гидролизаты обладают биологической активностью по отношению к макроорганизму [157], исследовали влияние СРМП на организм животных, для чего препарат вводили подкожно морским свинкам и наблюдали за их состоянием в течение 7 суток. В течение срока наблюдения за животными не отмечено ухудшения их состояния и наличия местных воспалительных реакций в месте введения. К концу срока наблюдения ни одно животное не погибло.

Дополнительно изучили некоторые гематологические показатели (Таблица 8) и лейкоцитарный профиль крови морских свинок до введения СРМП и после (Таблица 9) [165].

Таблица 8 – Гематологические показатели морских свинок, ($M \pm m$), $n=10$

Параметры	до введения СРМП	после введения СРМП
Количество эритроцитов, $10^{12}/л$	$5,4 \pm 0,1$	$5,9 \pm 0,3$
Гемоглобин, г/л	$135,5 \pm 4,6$	$138,4 \pm 5,1$
Количество тромбоцитов, $10^9/л$	$565,2 \pm 46,3$	$584,3 \pm 38,4$
Лейкоциты, $10^9/л$	$10,5 \pm 0,5$	$12,9 \pm 0,8^*$

Примечание: * ($P < 0,05$) – по отношению к группе морских свинок до введения СРМП. Эксперимент проводился в десяти повторах.

Из результатов, приведенных в Таблице 8, видно отсутствие выраженного влияния СРМП на показатели красной крови и уровня тромбоцитов у морских свинок. В то же время количество лейкоцитов увеличилось на $2,4 \times 10^9/л$ (22,9%).

После введения СРМП отмечена положительная динамика ряда показателей, представленных в Таблице 9. Так, увеличилось количество лимфоцитов на $1,7 \times 10^9/л$ (27,9%), а количество моноцитов – на $0,3 \times 10^9/л$ (42,9%). Число

сегментоядерных нейтрофилов в опытной группе возросло на $0,4 \times 10^9/\text{л}$ (11,4%). Все отмеченные изменения – в пределах допустимой нормы.

Таблица 9 – Лейкоцитарный профиль крови морских свинок, ($M \pm m$), $n=10$

Параметры		до введения СРМП		после введения СРМП	
		%	$10^9/\text{л}$	%	$10^9/\text{л}$
Нейтрофилы	палочкоядерные	0	0	0	0
	сегментоядерные	$33,0 \pm 1,5$	$3,5 \pm 0,03$	$30,1 \pm 1,3^*$	$3,9 \pm 0,03^*$
Лимфоциты		$58,3 \pm 3,7$	$6,1 \pm 0,03$	$60,1 \pm 3,2^*$	$7,8 \pm 0,03^*$
Моноциты		$6,5 \pm 0,9$	$0,7 \pm 0,02$	$8,1 \pm 0,7^*$	$1,0 \pm 0,03^*$
Эозинофилы		$1,1 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,01$	$0,7 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,01$
Базофилы		$1,1 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,01$	$1,0 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,01$

Примечание: * ($P < 0,05$) – по отношению к группе морских свинок до введения СРМП. Эксперимент проводился в десяти повторах.

Полученные данные подтверждают не только безвредность препарата «СРМП», но и его положительное влияние на иммунную систему морских свинок.

Так, в частности, повышение уровня моноцитов и лимфоцитов, свидетельствует о стимуляции клеточного звена иммунитета. Динамика эозинофилов подтверждает отсутствие аллергенного действия препарата. По нашему мнению, такие результаты являются показателем целесообразности использования СРМП в качестве компонента вакцины, независимо от технологии ее приготовления, не только с целью наращивания бактериальной массы, но и с целью повышения эффективности вакцинации.

Для подтверждения целесообразности использования комплекса технологических приемов, в готовом препарате «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 группы В. Полученные результаты сравнивались с результатами, полученными на разных технологических этапах.

Особое внимание в готовом препарате уделяли размеру частиц (Рисунок 16), являющемуся, по нашему мнению, важным показателем его качества.

На графике, представленном на Рисунке 16, отражающем размер частиц

СРМП, присутствуют три пика подъема кривой с диапазоном диаметра частиц 17–40; 40–150; 400–1000 нм. Пик с максимальной «интенсивностью» находится в диапазоне от 40 до 150 нм. Это свидетельствует о дополнительном, по сравнению со степенью измельчения на этапе гомогенизации, уменьшении размеров частиц после кислотного гидролиза.

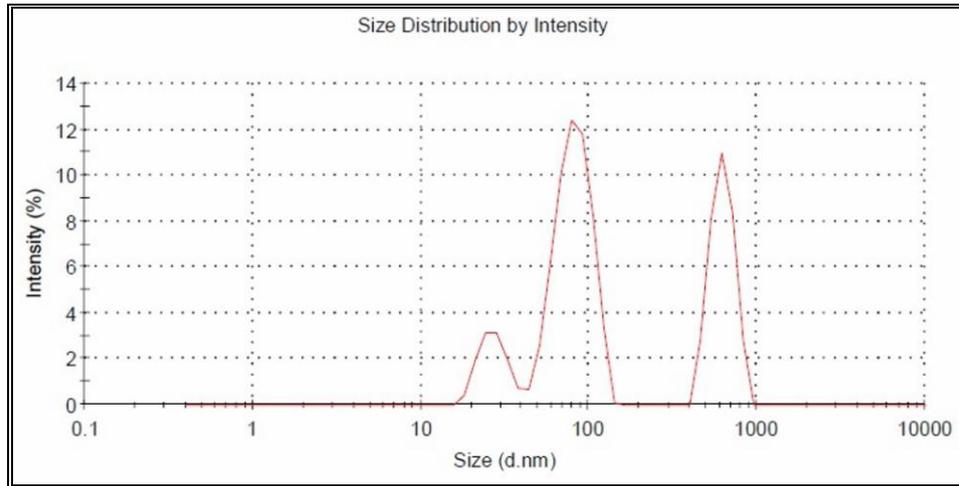


Рисунок 16 – Размер частиц СРМП

Анализ уровня белково-пептидных соединений и нуклеиновых кислот в конечной субстанции (Таблица 10), в сравнении с аналогичными показателями в промежуточных субстанциях на разных технологических этапах, позволил сделать заключение о том, что конечные количественные характеристики каждого из показателей обусловлены отдельным технологическим приемом или их комплексом.

Таблица 10 – Количество общего азота, свободного белка, аминного азота, пептидов, нуклеиновых кислот в СРМП, ($M \pm m$)

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 повторах.

Так, существенное снижение количества свободного белка в СРМП произошло за счет сочетания гомогенизации под высоким давлением и кислотного гидролиза. При этом данный показатель снизился в 24 раза по сравнению с коли-

чеством свободного белка до проведения данных манипуляций.

Повышение количества пептидов происходило на всех технологических этапах как в сырье, так и в промежуточных субстанциях и обеспечено сочетанием озонирования, гомогенизации и гидролиза. Количество пептидов в СРМП повысилось в 2,8 раза по сравнению с их количеством до проведения гомогенизации под высоким давлением и гидролиза.

Количество РНК и ДНК, на повышение уровня которых были направлены озонирование и гомогенизация, в препарате снизилось только после проведения гидролиза в 4,3 и 2,3 раза соответственно, что подчеркивает ведущую технологическую роль кислотного гидролиза в распаде нуклеиновых кислот до их фрагментов.

При сравнении уровня общего азота в субстанции из эмбрионально-яичной массы до проведения гомогенизации под высоким давлением и в итоговом препарате, можно сделать вывод, что потери азотистых веществ в ходе технологических манипуляций, в первую очередь фильтрации и центрифугирования, составили 18,6%. Это свидетельствует о переводе подавляющего количества азотистых веществ 81,4% в итоговый препарат, что подтверждает рациональность технологии изготовления СРМП. По нашему мнению, данный показатель можно рассматривать, как один из оценочных критериев технологии итогового препарата.

Учитывая, что ранее при выборе сырья для стимулятора роста мы ориентировались на содержание в нем таких веществ как аминокислоты, микро-, макроэлементы и витамины, играющие важную роль в метаболизме микробной клетки, а манипуляции, используемые в процессе приготовления препарата, так или иначе могли оказать влияние на его химический состав, дополнительно исследовали наличие вышеперечисленных компонентов в СРМП.

Уровень аминного азота в СРМП обусловил интерес к проведению анализа аминокислотного состава. Результаты, представленные в Таблице 11, свидетельствуют о наличии в СРМП широкого спектра аминокислот.

Интерес к исследованию микро-, макроэлементов и витаминов обусловлен наличием сухого остатка после проведения кислотного гидролиза.

В составе готового препарата «СРМП» обнаружен цинк, железо, кальций, натрий, калий и магний (Таблица 12).

Также в СРМП путем качественных реакций на витамины В₁, В₂ и РР, обнаружен только витамин В₁.

Таблица 11 – Аминокислотный состав СРМП, (M±m)

СРМП	Аминокислоты	мкг/мл	СРМП	Аминокислоты	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 повторах.

Таблица 12 – 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	1,6	–	–	–	20,5	353,3	516,6	16,1
	±	±				±	±	±	±
	0,09	0,11				0,3	4,2	5,4	0,5

Примечание: Эксперимент проводился в десяти повторах.

Таким образом, использованные технологические приемы позволили повысить в СРМП уровень низкоразмерных белково-пептидных соединений и фрагментов нуклеиновых кислот, которые наряду с биогенными стимуляторами, могут обладать биологической активностью по отношению к микроорганизмам. Кроме того, в препарате сохранен исходный качественный состав микро-, макроэлементов, аминокислот, витамин В₁ стимулирующее действие которых также не исключается. При этом препарат обладает безвредностью по отношению к макроорганизму. Вышеизложенное позволяет рассчитывать на высокий ростостимулирующий эффект СРМП при культивировании микроорганизмов, в том числе листе-

рий, а также на расширение спектра сфер использования данного препарата на других технологических этапах производства вакцин.

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

В основе получения как СРМП, так и ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов (ФГЭП) лежит одно сырье, но разные технологические подходы приготовления. Кроме того, выше уже представлены данные о стимулирующем действии ФГЭП при культивировании *Listeria monocytogenes* на плотных питательных средах (пункт 3.1.). Исходя из этого, мы сочли необходимым апробировать обе субстанции в качестве стимуляторов роста при культивировании *Listeria monocytogenes* вакцинного штамма «АУФ» на традиционных питательных средах.

Основной производственной целью культивирования *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ» является накопление бактериальной массы и изготовление из нее вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных.

Есть сообщения И.А. Бакулова с соавторами [16] о том, что при получении первых генераций листерий возникают сложности и применение стимуляторов роста на этой стадии особенно важно. Кроме того, в производственных условиях, при использовании больших объемов питательных сред, существует проблема их стабильности, а, следовательно, и выхода бактериальной массы [119], поэтому при накоплении культуры в ферментере, микроорганизмы также нуждаются в стимулирующих веществах для поддержания жизнеспособности, устойчивости и сохранения биологических свойств. Исходя из этого, стимуляторы добавляли на этапах наращивания биомассы листерий от первой генерации до получения бактериальной массы в ферментере.

Штамм для работы получали на пробирках с ПЖА из архива ФКП «Ставропольская биофабрика».

Производство вакцины против листериоза животных (в соответствии с ТР 00482861-0061-2009) складывается из нескольких этапов:

- получение расплодки на флаконах (первая генерация);
- получение производственной расплодки на баллонах (вторая генерация);
- засев ферментера производственной расплодкой;
- концентрирование культуры, снятие бактериальной массы;
- розлив и лиофилизация вакцины.

Основными критериями эффективности применения изучаемых субстанций является интенсивность роста *Listeria monocytogenes*.

Исследование эффективности применения обеих субстанций при культивировании *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ» состояло из нескольких этапов:

1) отработка и выбор оптимальных стимулирующих доз ферментативного гидролизата из эмбрионально-яичной массы перепелов и СРМП при их добавлении к плотным питательным средам, а именно к агару Хоттингера;

2) оценка эффективности применения субстанций в выбранных дозах при культивировании *Listeria monocytogenes* на жидких питательных средах. Выбор наиболее эффективного стимулятора;

3) оценка стимулирующего действия выбранного стимулятора роста на всех этапах культивирования листерий при изготовлении опытной серии вакцины против листериоза животных;

4) приготовление опытной серии вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» и оценка ее качества.

На первом этапе для установления оптимальных стимулирующих доз ФГЭП и СРМП были выбраны следующие концентрации субстанций: 0,1%, 0,5%, 1%, 1,5%, 2% к объему питательной среды. При их выборе мы опирались на исследования Н.В. Пановой [119] и И.Н. Ткаченко [193], изучавших стимуляторы роста для широкого круга микроорганизмов.

В выбранных дозировках ФГЭП и СРМП добавляли к расплавленному агару Хоттингера при тщательном перемешивании перед разливкой по чашкам Петри. В качестве контроля использовали агар Хоттингера без добавления субстан-

ций. Культуру *Listeria monocytogenes* вносили в количестве 100 микробных клеток, после чего выращивали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов в термостате. Через 24 ч производили подсчет выросших колоний, результаты отображены в Таблице 13.

Таблица 13 – Ростовые качества агара Хоттингера с добавлением ФГЭП и СРМП, ($M\pm m$)

Концентрация стимулятора, %	Количество чашек Петри	Агар Хоттингера с ФГЭП	Агар Хоттингера с СРМП
		Посев <i>L. monocytogenes</i> 100 м.к.	
2	5	$70,3\pm 1,9$	$93,3\pm 2,6$
1,5	5	$69,1\pm 1,7$	$95,6\pm 2,9$
1,0	5	$71,1\pm 1,9$	$94,1\pm 2,9$
0,5	5	$67,2\pm 2,3$	$80,6\pm 2,0$
0,1	5	$62,8\pm 1,5$	$76,1\pm 1,7$
Контроль – агар Хоттингера	5	$55,6\pm 1,2$	

Примечание: статистическая достоверность приведена по тексту. Эксперимент проводился в десяти повторах.

Результаты, отраженные в Таблице 13, свидетельствуют, что при добавлении к агару Хоттингера как ФГЭП, так и СРМП во всех концентрациях, количество выросших колоний по сравнению с контролем увеличивается (при $P < 0,05$). При этом в обоих случаях максимальное число выросших колоний зафиксировано на чашках со средами, включающими субстанции в дозе 1%. В средах с добавлением ФГЭП оно превышает контроль в 1,3 раза, а с добавлением СРМП – в 1,7 раза.

Интересным оказался тот факт, что число колоний возрастает по мере увеличения дозировки стимуляторов до 1%, после чего по сравнению с этой концентрацией изменяется недостоверно. Очевидно, в больших дозах утрачивается каталитический эффект, а вносимый препарат, в зависимости от изменчивости условий культивирования, в ряде случаев может использоваться как питательный компонент.

Таким образом, оптимальный стимулирующий эффект достигнут при добавлении к среде стимуляторов в количестве 1%.

На втором этапе исследовали эффективность стимуляторов при культивиро-

вании *Listeria monocytogenes* на жидкой питательной среде. Для этого культуру на пробирке с ПЖА заседали во флакон с бульоном Хоттингера объемом 100 мл и выращивали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов. Далее из флакона отбирали по 10 мл и заседали во флаконы с бульоном Хоттингера объемом 100 мл, содержащие стимуляторы роста в дозе 1% от объема питательной среды. Посевы культивировали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24 часов.

Для подсчета колоний листерий делали десятикратное разведение культуры, выращенной во флаконе, с последующим высевом на агар Хоттингера в 10^{-6} разведении (Таблица 14).

Таблица 14 – Ростовые качества бульона Хоттингера с добавлением ФГЭП и СРМП, ($M\pm m$)

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

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

Результаты исследований, представленные в Таблице 14, свидетельствуют, что при добавлении как ФГЭП, так и СРМП к бульону Хоттингера в дозе 1%, рост листерий на этих средах интенсивнее, чем рост на контрольной среде. При этом число колоний, выросшее на чашках после пересева культуры, выросшей с добавлением ФГЭП больше в 1,9 раза, чем в контроле, а с добавлением СРМП – в 2,3 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о положительном стимулирующем действии исследуемых субстанций на *Listeria monocytogenes*, однако не дают полную картину о биологических свойствах культуры под действием субстанций.

В связи с вышеизложенным, оценивали влияние изучаемых субстанций в дозе 1% на культуральные, морфологические, тинкториальные, биохимические, гемолитические свойства и подвижность *Listeria monocytogenes* [166].

При культивировании *L. monocytogenes* на бульоне Хоттингера с добавле-

нием ФГЭП и СРМП, а также в контроле отмечалось равномерное помутнение среды, что соответствует классическому характеру росту, установленному для данного микроорганизма.

При изучении характера роста *L. monocytogenes* на агаре Хоттингера, после пересева с бульона, содержащего ФГЭП и СРМП, через 24 часа после засева в обоих случаях на чашках Петри наблюдали появление мелких, круглых, полупрозрачных, слабовыпуклых, с ровным краем колоний в S-форме, имеющих голубоватый оттенок, что полностью соответствует культуральным свойствам данного микроорганизма (Рисунок 17).

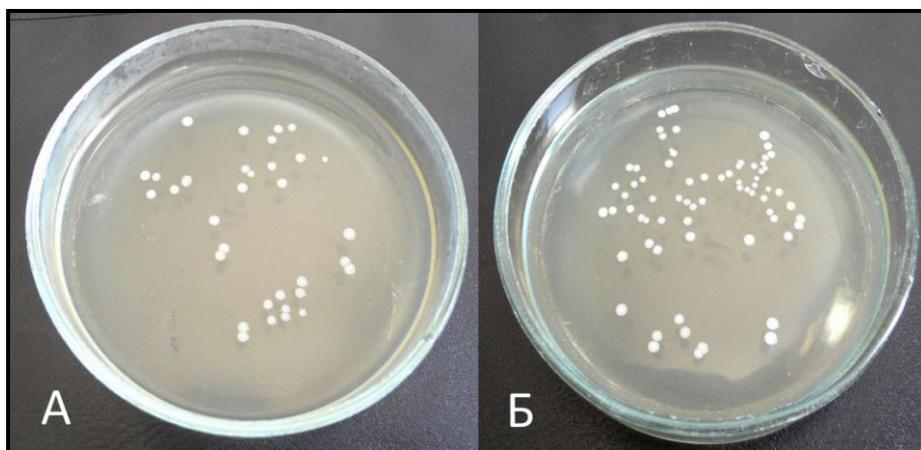


Рисунок 17 – Колонии *L. monocytogenes*. Культивирование на агаре Хоттингера при пересеве культуры с бульона Хоттингера: А – с добавлением ФГЭП; Б – с добавлением СРМП

При оценке мазков, приготовленных с жидкой питательной среды с добавлением ФГЭП, СРМП и без добавок (контроль), установлено, что во всех случаях *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, которые измеряли с помощью программного обеспечения Zen 2012 Pro на бинокулярном микроскопе исследовательского уровня Axio Imager 2 (A2) (Carl Zeiss Microscopy). Клетки располагаются в препарате параллельно или под углом друг к другу, группами или одиночно (Рисунок 18). Морфология бактерии полностью соответствует классическому характеру роста, установленному для данного микроорганизма по Д. Берджи [207].

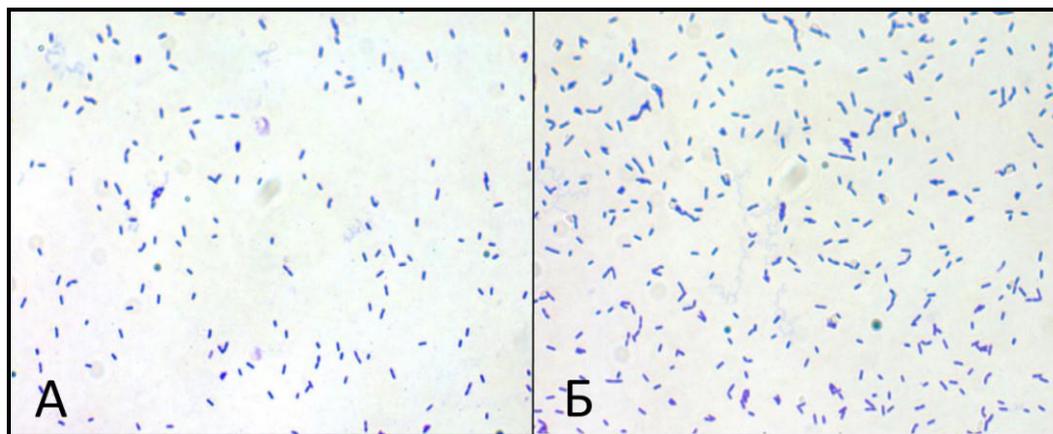


Рисунок 18 – *L.monocytogenes* ×1000 (окраска методом Грама).
 Культивирование на бульоне Хоттингера: А – с добавлением ФГЭП;
 Б – с добавлением СРМП

Микроорганизмы синтезируют большое количество ферментов, главной функцией которых является ускорение и регуляция всех химических реакций, необходимых для их жизнедеятельности, поэтому исследование ферментативной активности листерий в процессе оценки влияния стимуляторов роста считаем принципиальным моментом. Для определения способности сбраживать углеводы культуры *L. monocytogenes*, выросшие на бульоне Хоттингера с добавлением ФГЭП и СРМП, пересеивали на среды Гисса, содержащие следующие сахара: рамнозу, арабинозу, лактозу, маннит, маннозу, инозит, сахарозу, глюкозу, ксилозу, мальтозу. Контролем служил аналогичный посев на среды Гисса листерий, выросших на бульоне Хоттингера без добавок. Посевы термостатировали 7 дней при $37\pm 1^\circ\text{C}$.

Результаты оценивали визуально по изменению окраски сред. Установлено, что листерии, предварительно культивированные на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП, СРМП и без добавок (контроль), на средах Гисса сбраживают с образованием кислоты без газа рамнозу, маннозу, сахарозу, глюкозу, мальтозу, не утилизируют арабинозу, лактозу, маннит, инозит, ксилозу, что является характерными биохимическими свойствами микроорганизма (Рисунок 19).

Listeria monocytogenes является каталазоположительной. Известно, что оксидоредуктазы, к которым относится каталаза, ускоряют внутриклеточные окислительно-восстановительные процессы в бактериях.

При смешивании с перекисью водорода на предметном стекле культур лис-

терий, взятых из отдельных колоний, выросших на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП, СРМП и без добавок (контроль), во всех случаях наблюдали образование пузырьков, что свидетельствует о положительной реакции на каталазу.

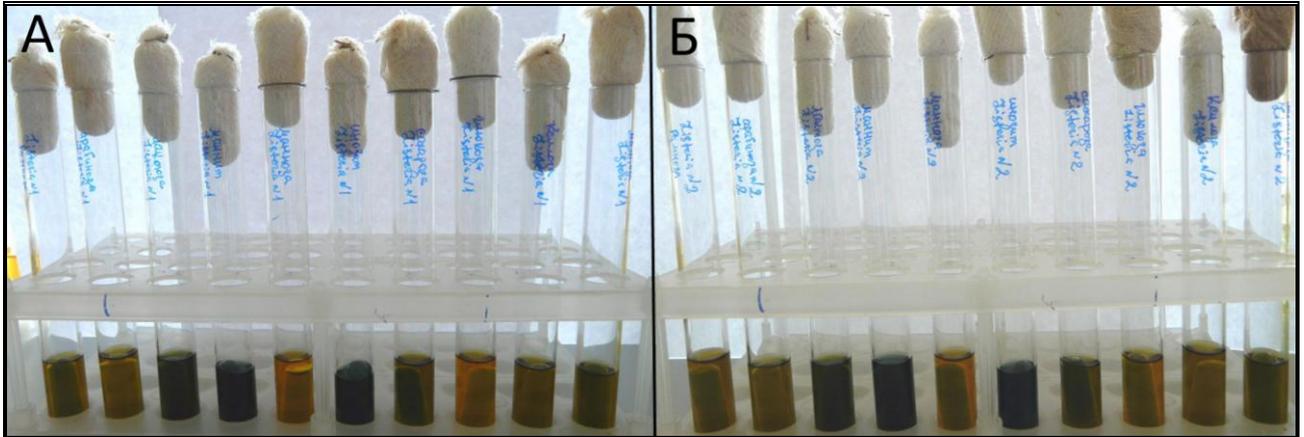


Рисунок 19 – Среды Гисса с культурой *L.monocytogenes*, выросшей на бульоне Хоттингера: А – с добавлением 1% ФГЭП; Б – с добавлением 1% СРМП

Характерным свойством *Listeria monocytogenes* являются секрция белков α - и β -гемолизина, обуславливающих ее гемолитическую активность на кровяном агаре. Наличие гемолитической активности подтверждали путем посева суточной культуры листерий, выросшей на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП и СРМП и без добавок на кровяной агар согласно МУК 4.2.1122-02. Листерии культивировали при $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Через 24 часа *L. monocytogenes* на кровяном агаре на всех чашках Петри как с добавлением стимуляторов, так и без добавления образует колонии, окруженные характерной зоной просветления – умеренно выраженным гемолизом (Рисунок 20).

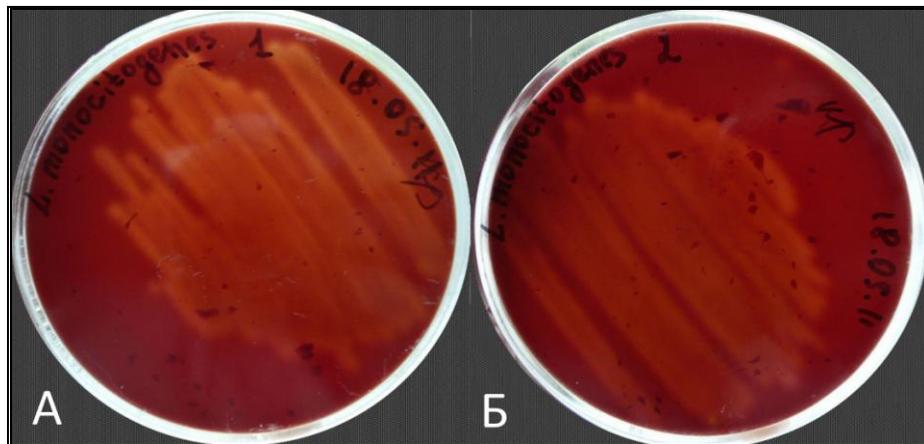


Рисунок 20 – Гемолиз *L. monocytogenes*, выросшей на агаре Хоттингера: А – с добавлением 1 % ФГЭП; Б – с добавлением 1 % СРМП

Таким образом, использование ФГЭП и СРМП не оказывает влияния на гемолитическую активность *L. monocytogenes* штамма «АУФ».

Особенностью листерий является их подвижность при температуре 20–25°C. Для исследования подвижности листерий, культивированных на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП и СРМП, производили посев культур путем укола бактериальной петлей в столбик полужидкого агара. Контролем служил аналогичный посев культуры листерий, выращенной без добавок. Через 24 часа выдерживания культур в термостате при температуре $22\pm 1^\circ\text{C}$, проводили визуальную оценку. Характер роста сопоставляли с пробиркой, содержащей среду без внесения бактериальной культуры.

Культура листерий, выращенная как с добавлением ФГЭП, так и с СРМП, при культивировании на ПЖА не отличается от контрольного посева и образует характерный рост вдоль линии укола, свидетельствующий о подвижности микроорганизма (Рисунок 21).

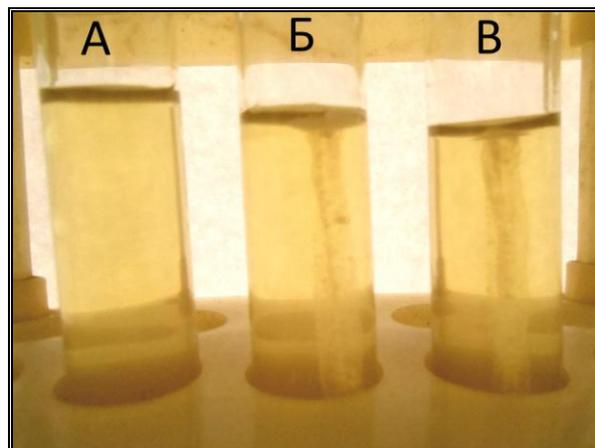


Рисунок 21 – Подвижность *L. monocytogenes* в полужидкой питательной среде: А – среда без внесения культуры; Б – *L. monocytogenes*, выросшая на агаре Хоттингера с добавлением ФГЭП; В – *L. monocytogenes*, выросшая на агаре Хоттингера с добавлением СРМП

Таким образом, при культивировании *L. monocytogenes* вакцинного штамма «АУФ» как на жидких, так и плотных питательных средах с добавлением ФГЭП и СРМП, микроорганизм проявил типичные для него биологические свойства, идентичные свойствам листерий, выращенным без добавления стимуляторов. Этот факт подтверждает отсутствие отрицательного влияния изучаемых стимуля-

торов роста на *L. monocytogenes* и открывает перспективы их использования при производстве вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.

Из результатов исследований следует, что при добавлении ФГЭП и СРМП как к плотным, так и жидким питательным средам при культивировании *L. monocytogenes*, обе субстанции оказали стимулирующее действие и могут быть использованы в качестве стимуляторов роста листерий.

Однако поскольку вакцинное производство нуждается в накоплении большого количества биомассы листерий, а СРМП оказал более высокий ростостимулирующий эффект на предварительных этапах исследования, он был выбран для апробации на всех дальнейших этапах культивирования листерий при изготовлении вакцины.

Культура листерий во флаконах с добавлением к 100 мл бульона Хоттингера 1 мл СРМП соответствует первой генерации производственной культуры. На третьем этапе исследования для получения второй генерации культуры, первую генерацию, выращенную во флаконах с добавлением СРМП, засеивали в баллоны, содержащие 12 л бульона Хоттингера и 1% СРМП, из расчета 1 флакон на 1 баллон. Контролем служила культура листерий, засеянная в баллоны с бульоном Хоттингера без добавления стимулятора. Согласно ТР 00482861–0061–2009 после засева в баллоны с опытной и контрольной культурой дополнительно вносили 20%-ный раствор глюкозы до концентрации 0,1% (в пересчете на сухое вещество).

Культуру выращивали в термальной комнате в течение 24 ч при $37 \pm 1^\circ\text{C}$, затем отбирали пробу и делали десятикратные разведения с последующим высевом на агар Хоттингера (Таблица 15). Эксперимент проводили десятикратно.

Таблица 15 – 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 повторах.

При посеве листерий полученной второй генерации на агар Хоттингера, количество выросших колоний больше, чем в контроле в 1,5 раза.

Перед засевом культуры в ферментер к питательной среде объемом 300 л был добавлен 1% СРМП (3 л). Далее опытную культуру второй генерации, выращенную с применением СРМП, из баллонов засевали в ферментер в количестве 10% от питательной среды. Культуру листерий, служившую контролем засевали в ферментер такого же объема с производственной питательной средой. Согласно ТР 00482861–0061–2009 после засева, а также через 6, 10 и 14 часов культивирования к контрольной и опытной культуре добавляли 20%-ный раствор глюкозы до концентрации 0,2% (в пересчете на сухое вещество).

Культивирование обеих культур осуществляли в течение 24 ч при $37\pm 1^\circ\text{C}$ при постоянном перемешивании. По окончании выращивания проводили контроль культур, культивированных на опытной и контрольной среде на чистоту роста (микроскопия мазков, контрольные высевы на питательные среды), который показал типичность роста обеих культур и отсутствие контаминации.

Выращенную, охлажденную культуру центрифугировали, отбирали и взвешивали бактериальную массу. 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 на 25% больше.

Бактериальную массу, выращенную в ферментерах, использовали для приготовления опытной и контрольной серии вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ».

Бактериальную массу разводили в 16-литровых баллонах с многокомпонентной сахарозо-желатиново-пептонно-тиомочевинно-глутаматной средой высушивания из расчета 100 г биомассы на 1 л защитной среды и тщательно перемешивали. Пробы, отобранные из контрольной и опытной серий, высевали на мелкие питательные среды, чашки с МПА и средой Эндо. Посевы наблюдались в течение 10 суток, контаминации не обнаружено. Далее вакцину фасовали во флаконы по 10 см^3 и подвергали лиофилизации.

Из результатов исследований видно, что на всех стадиях культивирования листерий при производстве вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных СРМП оказал стимулирующий эффект на микроорганизм. При этом лучший стимулирующий эффект при применении СРМП выявлен при получении первой генерации листерий. При использовании СРМП на последующих стадиях культивирования прирост биомассы листерий несколько ниже, чем в первой генерации. По нашему мнению, это связано со снижением выживаемости бактерий при их высокой концентрации в суспензии за счет накопления метаболитов.

3.4. Качество вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, изготовленной с использованием СРМП в процессе культивирования *Listeria monocytogenes*

Важным этапом работы явилось исследование качества вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, полученной с применением СРМП и ее сравнение с вакциной контрольной серии.

Контроль вакцин осуществляли согласно СТО №00482861–0079–2012 для вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ».

Для исследований из опытной и контрольной серии отбирали по 40 флаконов с вакциной. Результаты испытаний представлены в Таблице 16. Из результатов, представленных в Таблице 16, видно, что вакцина опытной серии, изготовленная с использованием СРМП, как и вакцина контрольной производственной серии, соответствует всем предъявляемым требованиям нормативной документации [191].

Готовая опытная вакцина представляет сухую аморфную массу, пористой структуры, светло-желтого цвета и по визуальным характеристикам не отличается от контрольной (Рисунок 22).

Таблица 16 – Показатели качества вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» опытной серии, полученной с использованием СРМП и контрольной серии вакцины

Наименование показателя	Нормативные требования к вакцине	Характеристика производственной серии вакцины	Характеристика опытной серии вакцины
Внешний вид, цвет	сухая однородная масса пористой структуры в виде таблетки, светло-желтого цвета	сухая однородная масса пористой структуры в виде таблетки, светло-желтого цвета	сухая однородная масса пористой структуры в виде таблетки, светло-желтого цвета
Наличие механической примеси, трещин флакона, нарушение маркировки	не допускается	отсутствуют	отсутствуют
Время ресуспензирования, мин., в пределах	3,0–5,0	3,9	3,5
Массовая доля влаги, % в пределах	1,0–3,0	1,124	1,167
Контаминация микробной и грибной микрофлорой	не допускается	отсутствует	отсутствует
Типичность роста	должен быть типичным	рост типичен	рост типичен
Концентрация живых листерий в 1,0 см ³ вакцины, млрд, не менее	20,0	30	32
Безвредность в тест-дозе на кроликах 2,0 см ³	должна быть безвредной	безвредна	безвредна
Иммуногенная активность	должна быть иммуногенной	иммуногена	иммуногена



Рисунок 22 – Внешний вид вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ», приготовленной с использованием СРМП

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

Одним из важных вопросов, возникающим при изготовлении живых вакцин, является стабилизация качества препарата. Так как при лиофилизации некоторая часть микроорганизмов отмирает, необходимы условия, позволяющие сохранить наибольший процент жизнеспособных клеток после высушивания [17].

Для решения вышеописанной проблемы сочли возможным включить СРМП в защитную среду высушивания вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных. Это обусловлено качеством СРМП, его стимулирующим эффектом на рост, а значит и на жизнеспособность листерий, которые являются важными показателями адаптационного потенциала микроорганизма.

К готовой многокомпонентной сахарозо-желатиново-пептонно-тиомочевинно-глутаматной среде высушивания добавляли СРМП в количестве 1% от объема. При выборе концентрации препарата мы опирались на результаты, полученные в пункте 3.3.

Бактериальную массу, выращенную на производственной среде в ферментере (3.3), разводили в 16-литровых баллонах средой высушивания с добавлением СРМП (100 г биомассы на 1 л защитной среды), тщательно перемешивали. Затем вакцину фасовали и подвергали лиофилизации согласно ТР 00482861-0061-2009.

Так как при лиофилизации важно не только наиболее максимально и длительно сохранить жизнеспособность микроорганизма, но и не подавить его антигенные свойства, полученная вакцина подвергалась полному спектру исследований качества согласно СТО №00482861–0079–2012 для вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ». Контролем служила производственная серия вакцины, полученная по традиционной технологии. Результаты исследований качества опытной серии вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, полученной с добавлением к среде высушивания СРМП, отображены в Таблице 17.

Таблица 17 – Показатели качества вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ», полученной с добавлением к среде высушивания СРМП

Наименование показателя	Нормативные требования к вакцине	Характеристика производственной серии вакцины	Характеристика опытной серии вакцины с добавлением СРМП к среде высушивания
Внешний вид, цвет	сухая однородная масса пористой структуры в виде таблетки, светло-желтого цвета	сухая однородная масса пористой структуры в виде таблетки, светло-желтого цвета	сухая однородная масса пористой структуры в виде таблетки, светло-желтого цвета
Наличие механической примеси, трещин флакона, нарушение маркировки	не допускается	отсутствуют	отсутствуют
Время ресуспензирования, мин., в пределах	3,0–5,0	3,9	3,3
Массовая доля влаги, % в пределах	1,0–3,0	1,124	1,211
Контаминация микробной и грибной микрофлорой	не допускается	отсутствует	отсутствует
Типичность роста	должен быть типичным	рост типичен	рост типичен
Концентрация живых листерий в 1,0 см ³ вакцины, млрд, не менее	20,0	30	36
Безвредность в тест-дозе на кроликах 2,0 см ³	должна быть безвредной	безвредна	безвредна
Иммуногенная активность	должна быть иммуногенной	иммуногена	иммуногена

Из результатов, представленных в Таблице 17, видно, что опытная серия вакцины, изготовленная с добавлением к среде высушивания СРМП, соответствует всем предъявляемым требованиям нормативной документации.

Установлено (Таблица 18), что в контрольной (производственной) серии вакцины 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 и иммуногенность вакцины [205].

Таблица 18 – Выживаемость листерий в вакцине с добавлением к среде высушивания СРМП до и после лиофилизации

Наименование субстанции	Концентрация живых листерий до лиофилизации	Концентрация живых листерий после лиофилизации	Концентрация живых листерий через 12 месяцев хранения вакцины
Опытная серия вакцины с добавлением СРМП к среде высушивания	45 млрд/см ³ (6 доз)	36 млрд/см ³ (4,8 дозы)	30 млрд/см ³ (4 дозы)
Производственная серия вакцины (контроль)	45 млрд/см ³ (6 доз)	30 млрд/см ³ (4 дозы)	21 млрд/см ³ (2,8 дозы)

Так как в процессе длительного хранения вакцины также происходит снижение жизнеспособности микроорганизмов [116], мы провели исследование по сравнению концентрации живых листерий в вакцине, изготовленной с добавлением СРМП к среде высушивания и в контрольной вакцине к концу срока их хранения – через 12 месяцев. При подсчете концентрации живых листерий в 1 см³ контрольной серии вакцины через 12 месяцев хранения, она составила 21 млрд/см³ (2,8 дозы), а в вакцине с добавлением к среде высушивания СРМП – 30 млрд/см³ (4 дозы). Таким образом, если при хранении контрольной серии вакцины в течение 12 месяцев жизнеспособность листерий снизилась на 30%, то при хранении опытной серии лишь на 16,7%.

Из результатов следует, что добавление СРМП в защитную среду высушивания при производстве вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных позволило увеличить выживаемость листерий в течение длительного хранения на 13,3% по сравнению с производственной серией вакцины.

По нашему мнению, такой стабилизирующий эффект СРМП связан в первую очередь с входящими в его состав низкомолекулярными соединениями (пептидами), которые способны ингибировать действие гидролитических и окислительно-восстановительных ферментов, чем предотвращают повреждение клеток в процессе сублимационного высушивания и хранения сухих препаратов. Кроме того, входящие в состав СРМП как фрагменты нуклеиновых кислот, так и пептиды оказывают положительное влияние на адаптационный потенциал листерий, тем самым способствуя повышению переживаемости в неблагоприятных условиях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Требования к качеству биопрепаратов и технологии их производства постоянно растут, поэтому, несмотря на достижения в области производства вакцин, задача получения высокоэффективных и стабильных биопрепаратов решена не до конца и остается актуальной.

Производственное культивирование микроорганизмов является наиболее значимым и уязвимым процессом, связанным с получением их биомассы для изготовления вакцин. Эффективность этого процесса зависит, прежде всего, от используемых питательных сред. Несмотря на их многообразие, профильные микробиологические учреждения нашей страны все еще недостаточно обеспечены стандартными питательными средами. Зачастую используются среды лабораторного и производственного приготовления, которые получают с применением низкокачественных компонентов. В сырье для приготовления питательных сред могут содержаться антибиотики, химикаты, нитраты, токсические продукты [134; 146; 231; 287]. Эти факторы снижают объемы наращиваемой бактериальной массы, необходимой для производства вакцин.

Кроме того, производство сухих вакцин сталкивается с проблемой снижения жизнеспособности микроорганизмов при их сублимационном высушивании и дальнейшем хранении препаратов [116; 152].

При решении проблемы снижения объема наращиваемой бактериальной массы разными авторами предложены новые питательные основы, добавки и стимуляторы роста микроорганизмов, назначение которых – повысить стабильность выхода и объемы биомассы микроорганизмов [29; 67; 112; 119; 176; 193; 256]. Стимуляторы роста необходимы микробной клетке в небольших количествах, при этом обеспечивая высокий темп размножения и накопления ее биомассы. Поэтому, по нашему мнению, именно стимуляторы роста являются выгодной альтернативой другим ростостимулирующим компонентам питательной среды, что особенно важно при производственном культивировании микроорганизмов.

Решить проблему снижения выживаемости микроорганизмов в процессе сублимационного высушивания разные авторы предлагают путем подбора и оптимизации защитных сред, а также повышения их качества посредством введения в их состав новых компонентов, оказывающих дополнительное защитное действие на микроорганизм [17; 107; 116; 152]. Последнее решение нам видится наиболее актуальным, так как при добавлении отдельных компонентов к традиционной среде высушивания можно добиться определенного защитного эффекта для конкретного микроорганизма.

По нашему наблюдению, сведениям отдельных авторов, а также по сообщениям специалистов ФКП «Ставропольская биофабрика», вышеуказанные трудности возникают, в частности, при производстве вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» [33; 118; 152].

Несомненно, качество стимуляторов роста микроорганизмов зависит от рационального выбора сырья. Несмотря на достаточно широкий перечень сырья природного происхождения, традиционно используемого для изготовления стимуляторов роста, еще широк спектр возможностей поиска наиболее эффективных сырьевых источников среди нетрадиционных сырьевых субстанций, обладающих, зачастую, уникальными свойствами, но малоизученных и малоиспользуемых для этих целей. Мы согласны с мнением исследователей, считающих, что выбор такого сырья должен руководствоваться в первую очередь метаболическими особенностями микроорганизмов, а также доступностью, экологической чистотой и экономичностью [18; 28; 193].

В связи с вышеизложенным, на начальном этапе работы, в качестве сырья для изготовления стимуляторов роста листерий наше внимание привлекли яблоки, зебрина повислая и инкубационные перепелиные яйца. Поводом для выбора субстанций также послужили результаты использования каллизии душистой – родственного вида зебрины и эмбрионально-яичная масса кур, используемых для получения питательных сред и стимуляторов роста различных микроорганизмов [119; 127].

Богатый химический состав вышеописанных субстанций, их региональная доступность и экологическая чистота позволили нам рассчитывать на получение из них субстанций со стимулирующими свойствами за счет содержания в них многочисленных уникальных элементов, необходимых листериям.

Мы солидарны с Н.В. Пановой [119] и И.Н. Ткаченко [193], что на качестве стимулятора роста может существенно отразиться как предварительная обработка, так и технология переработки сырья, раскрывающие его потенциальные возможности и повышающие стимулирующие качества итогового препарата.

Однако способы получения и хранения некоторых видов растительного сырья, в частности яблок, ограничивают возможность проведения подготовительной работы с ним, направленной на улучшение его качества и прежде всего, на повышение биологической активности. В данном случае качество сырья регулировалось только в процессе его первоначального отбора по внешним признакам. Поэтому яблоки в дальнейшем не подвергались предварительной активирующей обработке и использовались в нативном виде.

Другие виды сырья, в частности, зебрину повислую и инкубационные перепелиные яйца, с контролируемыми сроками культивирования и сбора, подвергали дополнительной активирующей обработке по методу получения тканевых препаратов В.П. Филатова. Исследователи Н.В. Панова [119] и И.Н. Ткаченко [193] уже использовали принципы этого метода с целью повышения эффективности разрабатываемых ими стимуляторов роста микроорганизмов. Основным принципом метода является воздействие на организм неблагоприятных для жизни условий для выработки в нем биогенных стимуляторов, за счет которых повышается биологическая активность сырья, а значит и эффективность изготавливаемых из него препаратов.

С этой целью в нашей работе в качестве жизненно неблагоприятных факторов мы использовали низкую температуру.

Так, свежесрезанные стебли зебринной повислой в плотно закрытом пакете помещали, согласно рекомендациям Н.И. Пеньковой [127], в холодильную камеру на 10 суток при температуре 2–4°C.

Перепелиные яйца предварительно инкубировали в течение 8 суток. Это обусловлено достаточным развитием на эти сутки органов и тканей эмбриона, богатых БАВ. На более поздних сроках у эмбрионов появляются зачатки перьев и клюва, что является нежелательным и затрудняет дальнейшие технологические манипуляции, такие как перемол и фильтрация субстанции. Опираясь на принципы, изложенные И.В. Ржепаковским [139], перепелиные яйца после инкубации выдерживали в холодильной камере при температуре 2–4°C в течение 7 суток. Уже сама используемая нами технология, подкрепленная фундаментальными положениями учения о биогенных стимуляторах, предполагает их содержание в сырье, на основании чего, полученную на этом этапе эмбрионально-яичную массу, считали активированной. Доказательные исследования целесообразности использования метода В.П. Филатова в технологическом цикле получения стимуляторов роста микроорганизмов проведены нами при отработке технологии нового стимулятора роста листерий СРМП.

Для дальнейшей переработки выбранного нами сырья был использован метод гидролиза. Традиционно считается, что данный прием позволяет перевести вещества исходного сырья в метаболически доступную для микроорганизмов форму, добиться получения в гидролизате низкомолекулярных соединений, которые, согласно литературному анализу, в зависимости от условий культивирования, могут выступать не только трофическим компонентом, но и оказывать на микроорганизмы стимулирующее действие [18; 28; 67; 90; 112; 113; 119; 138; 173; 193].

Из зебрины повислой и инкубационных перепелиных яиц (восьмисуточных эмбрионов) после обработки по методу В.П. Филатова, а также из яблок были получены ферментативные гидролизаты. Ферментативный гидролиз, по мнению В.И. Западнюк с соавторами [62] и Л.Я. Телишевской [180], обладает более щадящим действием, обеспечивающим сохранность биологически активных веществ. Гидролиз проводили по методике Ю.А. Козлова [79] с посуточным измерением аминного азота.

Качество изготовленных гидролизатов оценивали по традиционным показателям: аминному азоту, сухому остатку. Определение этих показателей в конечном продукте считали принципиальным, поскольку они отражают не только степень гидролиза, но и могут служить критерием наличия аминокислот и других многочисленных составных компонентов, в том числе микро-, макроэлементов, витаминов в итоговых гидролизатах после всех технологических манипуляций.

По показателю аминного азота лидирует гидролизат из эмбрионально-яичной массы перепелов, а по показателю сухого остатка – гидролизат из яблок. Это свидетельствует о качественном различии полученных гидролизатов и послужило поводом для дополнительного изучения их химического состава, при этом обращали внимание на те составные компоненты, которые могут обладать стимулирующими свойствами по отношению к листериям.

Установлено, что все изготовленные гидролизаты содержат цинк, кальций, натрий, калий и магний. Медь обнаружена в следовых количествах только в ферментативном гидролизате из эмбрионально-яичной массы перепелов. Марганец выявлен в гидролизатах из яблок и зебрины повислой. Железо обнаружено в гидролизатах из яблок и эмбрионально-яичной массы перепелов.

С помощью качественных реакций витамин В₁ обнаружен в гидролизатах из эмбрионально-яичной массы перепелов и яблок, витамин В₂ в гидролизатах из эмбрионально-яичной массы перепелов, яблок, зебрины повислой, а РР – в гидролизате из эмбрионально-яичной массы перепелов и зебрины повислой.

Во всех гидролизатах обнаружены: аспарагин, аспарагиновая кислота, валин, лизин, цистин, треонин, изолейцин, аргинин, метионин. Ферментативные гидролизаты из яблок и зебрины повислой, кроме перечисленных аминокислот, включают глутаминовую кислоту.

Таким образом, проведенный ферментативный гидролиз позволил извлечь из всех видов сырья количественно и качественно отличающиеся соединения, потенциально обладающие стимулирующими свойствами по отношению к листериям.

Апробацию изготовленных гидролизатов проводили путем их добавления в количестве 1% к агару Хоттингера при культивировании *Listeria monocytogenes* штамма «АУФ». При этом лучший стимулирующий эффект проявил ферментативный гидролизат из эмбрионально-яичной массы перепелов (ФГЭП).

Учитывая, что ферментативные гидролизаты из зебрины повислой и яблок на разных этапах исследования [154] оказали слабое стимулирующее действие на рост листерий, мы сочли их дальнейшее использование для получения больших объемов бактериальной массы нецелесообразным.

Из трех видов выбранного нами сырья инкубационные перепелиные яйца являются наиболее перспективными для приготовления стимулятора роста листерий.

Однако, по нашему мнению, биотехнологический потенциал данного сырья раскрыт не полностью, что послужило основанием к подбору технологических приемов, позволивших получить новый еще более эффективный стимулятор роста листерий из перепелиных яиц за счет получения и повышения количества в нем биологически активных веществ со стимулирующим эффектом. Помимо биогенных стимуляторов, важность которых описана выше, мы обратили особое внимание на пептиды, нуклеиновые кислоты и их фрагменты, которые по сообщениям И.М. Грачевой, Н.М. Гавриловой, Л.А. Ивановой [46], М.С. Мосичева, А.А. Складнева, В.Б. Котова [102], Г.А. Смирновой с соавторами [171], М.С. Поляка, В.И. Сухаревича, М.Э. Сухаревича [134], И.В. Павленко [118], Л.Я. Телишевской с соавторами [182], R. Siddiqi, M.A. Khan [280], M.R. Amezaga с соавторами [223] и других исследователей играют важную роль для микробной клетки. Наличие этих веществ в итоговом препарате для нас является приоритетным, поэтому подбор технологических манипуляций был направлен в первую очередь на повышение этих веществ в сырье.

С учетом того, что инкубационное яйцо представляет собой замкнутую живую систему, изолированную от материнского организма, контролируемую в процессе инкубации и являющуюся удобным объектом для управления в процессе развития, мы уделили принципиальное внимание выбору адекватных методов

прижизненного воздействия на организм с целью интенсификации биологической активности тканей, а значит и повышения его свойств как сырьевого объекта.

При выборе технологий прижизненных манипуляций в работе с перепелиными яйцами мы поставили перед собой несколько задач, которые, на наш взгляд, могут способствовать повышению качества стимулятора роста листерий. Первая задача – это повышение биотехнологических потенций сырья за счет повышения выживаемости эмбрионов в процессе развития и накопления в них белка – источника пептидов, а также других биологически активных веществ, в частности, нуклеиновых кислот и биогенных стимуляторов, которые, по мнению ряда исследователей, представляют интерес в качестве веществ, стимулирующих микроорганизмы. Вторая задача – обеспечение чистоты сырья на протяжении всей инкубации яиц.

Для решения этих задач нами использован комплекс методов прижизненного воздействия, складывающийся из примененного на разных этапах инкубации озонирования и ранее используемого метода получения биогенных стимуляторов, основанного на принципах, изложенных В.П. Филатовым.

Озон представляет для нас большой интерес, так как по сообщениям целого ряда исследователей обладает мощными бактерицидными, фунгицидными, вирулицидными свойствами [9; 71; 135; 136] и уничтожает большинство микроорганизмов, в том числе патогенных [135]. Помимо этого, интерес к озону вызван его положительным влиянием на выводимость цыплят, время их вылупления, сроки инкубации за счет стимулирующего действия на эмбриогенез, о чем сообщают В.Ф. Сторчевой [174], А.А. Смирнов [169] и другие.

Отсутствие отработанных оптимальных режимов озонирования перепелиных яиц одновременно с целью их дезинфекции и биотехнологической целью, а также недостаточная изученность влияния озона на перепелиный эмбрион, дали нам предпосылки к глубокому изучению этого аспекта и подтверждению действия озона в выбранной дозировке.

Исследование дезинфицирующего действия озона на скорлупу перепелиных яиц при инкубации показало, что пятикратное озонирование яиц (до инкубации, и

на 3–и, 5–е, 7–е, 8–е сутки) 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. Исходя из этого, данная схема озонирования была нами положена в технологию приготовления стимулятора роста листерий.

Мы учли данные В.А. Филова [204] и Б.Д. Белана [20] об общетоксическом действии озона, поэтому для его использования в цикле приготовления стимулятора роста листерий сочли необходимым исключение его негативного влияния в выбранной дозировке на перепелиный эмбрион. По нашему мнению, не исключается, что любые негативные изменения в эмбрионе могут отрицательно отразиться на качестве препарата за счет снижения жизнеспособности и накопления случайных продуктов метаболизма с потенциальным отрицательным действием на культивируемый микроорганизм.

Установлено, что озон в выбранной дозировке не оказал негативного влияния на выживаемость и развитие перепелиного эмбриона. В то же время отмечено увеличение длины и массы тела у эмбрионов, подвергавшихся озонированию на 7,1% и 8,7% соответственно, по сравнению с неозонированными эмбрионами. При этом, значения индекса Кетле I, позволяющего оценивать пропорциональность развития у озонированных эмбрионов, не выходят за пределы значений этого критерия у неозонированных. Данный факт считаем показателем положительного биостимулирующего действия озона по отношению к перепелиному эмбриону, который позволил увеличить выход сырья, а значит и объем разрабатываемого препарата.

По нашему мнению, интересующие нас белково-пептидный комплекс и нуклеиновые кислоты являются важными показателями интенсивности белкового обмена, который в свою очередь отражает уровень метаболизма, а так как нами доказано биостимулирующее действие озона на перепелиный эмбрион, мы предположили повышение этих веществ в эмбрионах, подвергавшихся озонированию.

Установлено, что количество общего азота, свободного белка, пептидов, РНК и ДНК в гомогенате эмбрионов из озонированных перепелиных яиц превышает их количество в гомогенате из неозонированных на 17,4%, 12,6%, 21,8%, 13,8%, 16,9% соответственно. Промежуточные данные о влиянии озона на уровень нуклеиновых кислот в перепелином эмбрионе получены в соавторстве [162; 163]. Результаты исследования подтверждают наши данные о биостимулирующем действии озонирования по выбранной схеме на перепелиный эмбрион.

Последующие прижизненные манипуляции, заключающиеся в обработке инкубационных яиц по методике В.П. Филатова [203], описанной выше, позволили за счет накопления биогенных стимуляторов повысить уровень биологической активности промежуточной субстанции на 16% по сравнению с субстанцией, изготовленной из необработанных яиц, что подтверждено методом К. Бакирджиева [68].

Таким образом, технологический этап прижизненной обработки сырья оказался необходимым и оправданным, так как позволил повысить в нем, а, соответственно, в первичном гомогенате, количество белка как источника интересующих нас пептидов и уровень нуклеиновых кислот. Кроме того, прижизненная обработка обеспечила выработку биогенных стимуляторов, являющихся, на наш взгляд, принципиально важными для качества изготавливаемого стимулятора роста листерий.

Наличие в эмбрионально-яичной массе перепелов после озонирования и обработки по В.П. Филатову достаточно высокого количества свободного белка обусловило следующий этап работы, направленный на трансформацию высокомолекулярных белковых соединений в низкомолекулярные (пептиды). Кроме того, важным этапом работы явилось дальнейшее повышение уровня нуклеиновых кислот за счет их высвобождения из клеток и их дефрагментация. Для этого нами предложен комплексный подход, заключающийся в использовании двух методов: измельчения и гидролиза промежуточной субстанции.

С целью измельчения использована многоэтапная гомогенизация эмбрионально-яичной массы перепелов. После первичной гомогенизации, направленной

на предварительное измельчение сырья, эмбрионально-яичная масса перепелов все еще представляла собой высокобелковую субстанцию. Для перевода высокомолекулярных соединений субстанции в низкомолекулярные, нами использована гомогенизация под высоким давлением, эффективность которой доказана в сообщении Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковского, П.А. Омелянчука [190]. По мнению этих исследователей, повышение уровня низкомолекулярных соединений после гомогенизации под высоким давлением происходит за счет разрушения тканевых и молекулярно-клеточных композитов сырьевого субстрата. Кроме того, работы R. Lanciotti в соавторстве [250], A. Diels в соавторстве [236], N. Cruz в соавторстве [233] свидетельствуют о стерилизующем действии гомогенизации под высоким давлением, что для нас является немаловажным для обеспечения дополнительной чистоты промежуточной субстанции. Целесообразность использования пятикратной гомогенизации под давлением подтверждена нами эмпирически. Доказано влияние пятикратной гомогенизации под высоким давлением на увеличение в промежуточной субстанции уровня низкоразмерных соединений, отражающих уровень низкомолекулярных веществ, что подтверждено снижением количества свободного белка на 32,3%, увеличением уровня пептидов на 47,8%, ДНК на 45,2%, РНК на 59,2%. Использование гомогенизации под высоким давлением за счет частичной деструктуризации высокобелковых соединений, по нашему мнению, позволило подготовить промежуточную субстанцию к дальнейшему технологическому этапу — гидролизу.

Кислотный гидролиз был включен в технологическую схему для дополнительного расщепления оставшегося свободного белка и повышения прозрачности субстанции, которая после гомогенизации представляет непрозрачную жидкость с мелкозернистым осадком. При выборе вида гидролиза мы опирались на мнение Л.Я. Телишевской [180] о способности кислотного гидролиза к полному расщеплению белков и частичному разрыву пептидных связей в гидролизуемой субстанции, что для нас является важным.

Гидролиз проводили с помощью соляной кислоты при ее концентрации в субстанции 0,5%, при 125°C в течение часа, после чего гидролизат нейтрализова-

ли, центрифугировали и фильтровали.

Важным моментом в технологии приготовления стимулятора роста листерий считали его стерильность, которая в процессе изготовления обеспечивалась комплексом манипуляций: озонированием и обработкой йодно-спиртовым раствором яиц, гомогенизацией под высоким давлением промежуточной субстанции, кислотным гидролизом. Итоговая стерильность препарата достигалась автоклавированием.

Готовый препарат «СРМП» представлял собой стерильную прозрачную жидкость коричневого цвета.

Исследование качества СРМП, свидетельствует о высоком уровне низко-размерных частиц, а, следовательно, и частиц с более низкой молекулярной массой в конечном препарате, при этом он содержит небольшое количество свободного белка при сравнительно высоком уровне пептидов, что обусловлено комплексом проведенных технологических манипуляций. При этом уровень нуклеиновых кислот после проведения гидролиза значительно снизился. По нашему мнению, это связано с распадом нуклеиновых кислот под действием соляной кислоты до их производных (нуклеотиды, нуклеозиды, пуриновые, пиримидиновые основания), которые необходимы микробной клетке для построения собственных структур. Уровень общего азота, рассматриваемый нами как оценочный показатель СРМП, свидетельствует о переводе подавляющего количества азотистых веществ в препарат, чем подтверждает рациональность приемов, используемых при его изготовлении.

В СРМП обнаружено 18 аминокислот, при этом количественно преобладают аспарагиновая, глутаминовая кислоты и гистидин. В СРМП входят цинк, железо, кальций, натрий, калий и магний, а также витамин В₁, необходимый листериям для нормального роста. Таким образом, комплекс технологических приемов при изготовлении СРМП позволил повысить на отдельных стадиях процесса производства уровень белка с дальнейшей его трансформацией в пептиды, уровень нуклеиновых кислот с последующей дефрагментацией до их производных, а так-

же биогенных стимуляторов при сохранении в препарате исходного качественного состава микро-, макроэлементов, аминокислот, отдельных витаминов.

По нашему мнению, весь выявленный комплекс соединений, содержащихся в СРМП, потенциально обладает ростостимулирующим эффектом не только по отношению к листериям, но и к другим микроорганизмам. Поэтому мы предположили, что в дальнейшем препарат может быть использован в цикле изготовления других вакцин. При этом надо учитывать, что он может попасть вместе с питательной средой в макроорганизм. В связи с этим дополнительно провели исследование его безвредности при введении морским свинкам. Результаты гематологического исследования свидетельствуют об отсутствии токсического и аллергенного эффекта, при наличии иммуномодулирующего, заключающегося в стимуляции клеточного звена иммунитета.

Эффективность СРМП в качестве стимулятора роста *Listeria monocytogenes* оценивали в сравнении с эффективностью ФГЭП с учетом использования в обоих препаратах одного вида сырья.

В процессе работы при добавлении ФГЭП и СРМП к агару Хоттингера определена максимальная стимулирующая доза, которая составила для обеих субстанций 1%.

При посеве листерий на бульон Хоттингера, являющийся основной питательной средой для их производственного культивирования, выявлено, что при добавлении ФГЭП и СРМП в дозе 1% к объему среды, рост микроорганизма увеличился в 1,9 раза и 2,3 раза соответственно по сравнению со средой без добавок.

Установлено, что культура *L. monocytogenes* на агаре и бульоне Хоттингера с добавлением стимуляторов, проявила типичные культуральные, тинкториальные и морфологические свойства [161].

На средах Гисса культура листерий, выросшая с добавлением ФГЭП и СРМП, сбрасывает 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, а также на подвижность микроба – на ПЖА культура образовала характерный рост вдоль линии укола. Кроме того, микроорганизм не изменил степень гемолитической активности под действием стимуляторов роста.

Таким образом, использование разработанных стимуляторов роста не противоречит принципиальному требованию к вакцинному штамму микроорганизма – сохранению стабильности его характеристик на всех этапах культивирования, что является важнейшим моментом для вакцинного производства.

Несмотря на то, что как ФГЭП, так и СРМП проявили стимулирующий эффект и не оказали отрицательного влияния на биологические свойства *L. monocytogenes*, совокупность всех физических, химических и стимулирующих свойств СРМП обусловили его использование в дальнейшей работе при производстве вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных.

Так как трудности при культивировании листерий возникают как на начальных этапах культивирования, так и при культивировании в ферментере, а также учитывая, что дополнительные ростовые вещества (глюкозу) добавляют к питательным средам на каждом этапе культивирования листерий при производстве вакцины, СРМП добавляли на всех этапах вегетации.

Культура, выращенная с использованием СРМП на бульоне Хоттингера, соответствует первой генерации, поэтому была использована для получения второй генерации в баллонах. Установлено, что добавление 1% СРМП к питательной среде при получении второй генерации повышает рост листерий в 1,5 раза по сравнению со средой без добавок.

После культивирования листерий в ферментере с добавлением к питательной среде 1% СРМП установлено увеличение количества их биомассы на 25%, по сравнению с традиционной питательной средой.

Таким образом, добавление СРМП эффективно на всех этапах культивирования листерий при производстве вакцины. Однако, максимальный стимулирующий эффект препарат проявил при получении первой генерации листерий, что, по

нашему мнению, важно, так как по сообщению И.А. Бакулова с соавторами [16], при получении первых генераций листерий часто возникают сложности.

После изготовления из биомассы, полученной с использованием СРМП вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, установлено, что она соответствует всем предъявляемым требованиям нормативной документации и по основным показателям не отличается от вакцины контрольной серии.

Имеются данные Е.В. Светлаковой [152] о двойном действии стимулятора роста листерий на основе чайного гриба, направленном на повышение их жизнеспособности при добавлении к защитной среде высушивания. Учитывая данный факт, а также положительное влияние СРМП на рост листерий при культивировании, а, следовательно, и на их адаптационный потенциал, включающий в себя и понятие жизнеспособности, мы решили расширить спектр его использования для решения проблемы выживаемости микроорганизма при лиофилизации. Использование препарата в этих целях обусловлено также тем, что пептиды, установленные в его составе, по мнению А. Ergun, Н. Girgin, D. Eren [238], обладают специфическими защитными свойствами, а Т. Морити [100] считает, что они предотвращают повреждение клеток в процессе замораживания, высушивания и хранения сухих препаратов.

Нами учтено мнение M.V. Lion и E.D. Bergmann [255] о том, что эффективность компонентов, выполняющих защитные функции в составе сред высушивания, напрямую зависит от их концентрации, а также мнение А.А. Нежуты с соавторами [107] о возможном токсическом действии высоких концентраций защитных веществ на биоматериал. Поэтому мы решили не повышать концентрацию препарата и, опираясь на ранее полученные положительные результаты, СРМП добавляли в количестве 1% к объему защитной среды.

Установлено, что добавление СРМП в дозе 1% к среде высушивания вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных, способствует повышению выживаемости микроорганизмов после сублимации на 13% по сравнению с производственной серией вакцины.

При исследовании полученной опытной серии вакцины выявлено, что она соответствует всем требованиям нормативной документации. Немаловажно, что препарат не оказал негативного влияния на безвредность и иммуногенность вакцины, что согласуется с полученными нами данными о безвредности СРМП по отношению к макроорганизму, представленными выше.

Мы солидарны с мнением И.В. Павленко [116] о снижении жизнеспособности микроорганизмов в процессе длительного хранения вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных. Поэтому исследовали выживаемость листерий в вакцине по окончании срока ее хранения – через 12 месяцев, при этом выживаемость листерий в вакцине с добавлением СРМП оказалась выше, чем в производственной серии вакцины на 13,3%.

По результатам исследований можно сделать вывод о том, что СРМП обладает защитным стабилизирующим действием, предотвращая повреждение бактериальных клеток и препятствуя их быстрой гибели в процессе сублимационного высушивания и хранения вакцины, что согласуется с данными Б.И. Бланкова, Д.Л. Клебанова [25], Т. Морити [100], В.В. Эмануэля и соавторов [218] о защитном действии белковых гидролизатов, предохраняющих поверхности мембран от повреждений. Это, по нашему мнению, происходит в первую очередь благодаря наличию в препарате низкомолекулярных активных пептидов, о действии которых сообщают А. Ergun, Н. Girgin, D. Eren [238].

Таким образом, из всех изготовленных стимуляторов роста листерий СРМП является наиболее перспективным. Технологические приемы, используемые при изготовлении стимулятора, позволили добиться в его составе 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАВ – биологически активное вещество;

ГОСТ – Государственный стандарт;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ЕД – единицы;

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт;

КОЕ – колониеобразующая единица;

М – среднеарифметическая величина;

м.к. – микробная клетка;

МПА – мясо-пептонный агар;

МУК – методические указания;

ПЖА – полужидкий агар;

P – вероятность различия;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

СРМП – стимулятор роста микроорганизмов перепелиный;

СТО – стандарт организации;

ТР – технологический регламент;

ТУ – технические условия;

УФЛ – ультрафиолетовые лучи;

ФГ – ферментативный гидролизат;

ФГЭП – ферментативный гидролизат эмбрионально-яичной массы перепелов;

m – средняя квадратическая ошибка.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адлова, Г.П. Разработка стимуляторов роста бактерий из растений / Г.П. Адлова, В.А. Мельникова, Г.А. Смирнова, А.А. Арепьева, С.В. Денисова, А.К. Илidgeв, Т.Н. Ратникова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1998. – №1. – С. 13–17.
2. Аксенова, П.В. Биогенные стимуляторы: исследование биологической активности и применение в животноводстве / П.В. Аксенова, М.М. Айбазов, З.К. Гаджиев. – Махачкала, 2009. – 124 с.
3. Алиева, Е.В. Разработка лабораторных экспресс-методов и технологии производства иммунодиагностических препаратов для выявления возбудителей листериоза и кампилобактериоза: автореф. дис. ... док. мед. наук: 03.00.07 / Е.В. Алиева. – Москва, 2008. – 31 с.
4. Алимов, А.М. Изучение аминокислотного обмена и иммунохимии листерий различной вирулентности: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.М. Алимов. – Казань, 1974. – 28 с.
5. Андреева, И.Н. Влияние условий культивирования на рост и пигментацию *Serratia marcescens* / И.Н. Андреева, Т.И. Огородникова // Микробиология. – 1999. – № 3. – С. 16–20.
6. Андреева, С.М. Ячменные проростки как источник веществ, влияющих на синтез некоторых биологически активных соединений микроорганизмами: автореф. дис. ... канд. биол. наук / С.М. Андреева. – Л., 1969. – 18 с.
7. Ануарбекова, С.С. Отработка условий лиофильного хранения азотфиксирующих микроорганизмов / С.С. Ануарбекова, Э. Нагызбеккызы, С.С. Даулбай, Г.К. Абитаева, Н.Е. Бекенова // Назашстан гылымыныц жаналыцтары. – 2014. – №3(121). – С. 97–106.
8. Артюхин, В.И. Белковые гидролизаты в производстве питательных сред: производство и применение продуктов микробиологических производств / В.И. Артюхин, А.П. Шепелин, Н.В. Кисселев // Обзор. инфо.- М., 1990. - Вып. 9–10. - 52 с.
9. Астафьев, Д.В. Исследование и разработка электрофилтра-озонатора для очи-

стки и озонирования воздушной среды в цехе инкубации (на примере помещения хранения инкубационных яиц): автореф. дисс. ...канд. тех. наук: 05.20.02 / Д.В. Астафьев. – Челябинск, 2010. – 24 с.

10. Ахапкина, И.Г. Культивирование *Pseudomonas aeruginosa* на средах с использованием ферментативного гидролизата хлореллы в качестве питательной основы / И.Г. Ахапкина, Л.П. Блинкова, Л.Г. Бутова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2002. – № 5. – С. 67–68.

11. Ахметова, Э.М. Разработка и испытание сухих питательных сред для индикации уреазплазм / Э.М. Ахметова, М.М. Меджидов, С.М. Омарова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2000. – № 3. – С. 29–31.

12. Бабаян, Г.Л. Способ оценки протеиназной активности комплексного ферментного препарата по данным кинетики протеолиза модельного белкового субстрата / Г.Л. Бабаян, В.К. Латов // Биотехнология – 2003. – № 6. – С. 47–51.

13. Бакулин, А.В. Ферментативный гидролиз высокомолекулярного хитозана фитопайном / А.В. Бакулин // Материалы пятого съезда общества биотехологов России им. Овчинникова. – М., 2008. – С. 312–314.

14. Бакулов, И.А. Листерия сельскохозяйственных животных / И.А. Бакулов. – М.: Колос, 1967. – 296 с.

15. Бакулов, И.А. Основные вехи истории изучения листериоза животных и людей / И.А. Бакулов // Материалы Международного симпозиума "Листерия на рубеже тысячелетий". – Покров., 1999. – С. 43–47.

16. Бакулов, И.А. Листерии и листериоз / И.А. Бакулов, Д.А. Васильев, Д.В. Колбасов, Е.Н. Ковалева, И.Ю. Егорова, Ю.О. Селянинов. – Ульяновск: Колор-Принт, 2016. – 336 с.

17. Балинер, Л.М. Разработка биолюминесцентного метода определения количества живых бактерий в лиофилизированных вакцинах: дис. ... канд. биол. наук: 16.00.03 / Л.М. Балинер. – М., 2003. – 96 с.

18. Баронец, Н.Г. Получение стимуляторов роста микроорганизмов из лекарственных растений: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Н.Г. Баронец. – Москва, 2004. – 132 с.

19. Бахтин, И.А. Совершенствование процесса сублимационного высушивания лекарственных препаратов: автореф дис. ... канд. фармац. наук / И. А. Бахтин. – Пермь, 2012. – 26 с.
20. Белан, Б.Д. Озон в тропосфере / Б.Д. Белан. – Томск: ИОА СО РАН, 2010.– 478 с.
21. Белоус, А.М. Криоконсерванты / А.М. Белоус, М.И. Шраго, Н.С. Пушкарь. – Киев: Наукова Думка, 1979. – 198 с.
22. Белоусов, В.И. Требования к питательным средам / В.И. Белоусов // Сборник статей междунар. науч. практ. конф. – Покров, 2000. – С. 230-232.
23. Блажнова, Г.Н. Влияние озона на минеральную плотность костей куриного эмбриона в процессе развития / Г.Н. Блажнова, И.В. Ржепаковский, К.А. Привалова, А.В. Лыхварь // Неделя науки 2015: материалы Всероссийского молодёжного форума с международным участием. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2015. – С. 38-39.
24. Блажнова, Г.Н. Влияние озона на сосудистую сеть внеэмбриональных органов куриного эмбриона / Г.Н. Блажнова, К.А. Привалова, Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский // Материалы международной научно-практической интернет-конференции «Инновационные подходы в ветеринарной и зоотехнической науке и практике». – Ставрополь, 2016. – С. 58–62.
25. Бланков, Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б.И. Бланков, Д.Л. Клебанов. – М.: Медгиз., 1961. – 263с.
26. Брильков, А.В. Учет физиологии в моделях лимитирования и ингибирования роста микроорганизмов / А.В. Брильков, Н.С. Печуркин. – Красноярск: Сиб. отделение. Институт биофизики., 1990. – 37 с.
27. Васильев, Д.А. Теоретическое обоснование и разработка основных направлений в профилактике пищевого листериоза: автореф. дис. ... докт. биол. наук: 16.00.06, 16.00.03 / Д.А. Васильев. – М., 1994. – 45 с.
28. Веревкина, М.Н. Технология приготовления, характеристика и применение стимулятора роста микроорганизмов ТС – 1 в биологической промышленности: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / М.Н. Веревкина. – Ставрополь, 2000. – 185 с.

29. Вережкина, М.Н. Стимуляторы в макромире и микромире. Методическое пособие для студентов факультета ветеринарной медицины по дисциплинам «Ветеринарная микробиология и иммунология» и «Биотехнология ветеринарных препаратов» / М.Н. Вережкина, А.Ф. Дмитриев. – Ставрополь, 2004. – 47 с.
30. Виноградова, И.Н. Гидролизаты / И.Н. Виноградова // Общая микробиология. – Медгиз, 1962. – С. 342–345.
31. Воробьев, Л.И. Промышленная микробиология /Л.И. Воробьев. – М.: Изд. Московского университета, 1989. – 294 с.
32. Вяльцев, Е.М. Влияние сульфата магния и некоторых микроэлементов на рост *Bact. alcaligenes*, выделенных из преджелудков крупного рогатого скота / Е.М. Вяльцев // Вопросы физиологии микроорганизмов. - Краснодар, 1970. – С. 70–73.
33. Геладзе, В.Ш. Изыскание универсальных питательных сред для культивирования аэробных и анаэробных микроорганизмов / В.Ш. Геладзе, В.И. Ситьков, В.И. Заерко, И.К. Тутов, Р.Г. Колпакова // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. – Ставрополь, 1998. – С. 30–31.
34. Гершун, В.И. Листерииоз сельскохозяйственных животных /В.И. Гершун. – Алма-Ата: Кайнер, 1981. – 96 с.
35. Гильмутдинов, Р.Я. Инфекционные болезни экзотических и диких животных / Р.Я. Гильмутдинов, А.В. Иванов, А.Н. Панин. – М.: Колос, 2010. – 668 с.
36. Глазунов, А.В. Способ расчета остаточной концентрации лимитирующего субстрата при хеостатном культивировании микроорганизмов / А.В. Глазунов, С.В. Аргунов, Ю.Г. Капутьцевич // Биотехнология. – 1993. – Т.3. – С. 25–27.
37. Голшмид, В.К. Гидролизаты крови для микробиологических питательных сред / В.К. Голшмид, А.К. Илidgeв, Н.М. Ландсман, Л.Н. Богословская, Т.Н. Токинова // Лаб. дело. – 1990.– № 10.– С. 68.
38. Горкин, В.З. Роль металлов в каталитическом действии ферментов / В.З. Горкин. – М.: Изд-во АН СССР, 1964. – С. 58–75.
39. Готшалк, Г. Метаболизм бактерий / Г. Готшалк. – М.: Мир, 1982. – 310 с.

40. ГОСТ 13805-76. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия. – М.: Издательство стандартов, 1981. – 22 с.
41. ГОСТ 24061-2012. Средства лекарственные биологические лиофилизированные для ветеринарного применения. Метод определения массовой доли влаги. – М.: Стандартиформ, 2014. – 8 с.
42. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности. – М.: Стандартиформ, 2014. – 14 с.
43. ГОСТ 30425-97. Консервы. Метод определения промышленной стерильности. – М.: Издательство стандартов, 2016. – 14 с.
44. ГОСТ 31926-2013. Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности. – М.: Стандартиформ, 2014. – 18 с.
45. Государственная фармакопея СССР. – 11-е изд. – М.: Медицина. – 1990. – Вып. 2. – 384 с.
46. Грачева, И.М. Технология микробных белковых препаратов, аминокислот и жиров / И.М. Грачева, Н.М. Гаврилова, Л.А. Иванова. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – 448 с.
47. Данилова, М.В. Зависимость жизнеспособности бактерий после лиофилизации и при длительном хранении от величины остаточной влажности / М.В. Данилова, И.М. Надирова, Т.В. Емцева // Изв.АН СССР. Сер. Биол. – 1980. – №3. – С 449–451.
48. Дедюхина, Э. Г. Влияние концентрации ионов магния в среде на показатели роста и состав биомассы дрожжей / Э.Г. Дедюхина, Т.И. Чистякова, В.К. Ерошин, Е.В. Кашпарова // Микробиология. – 1989. – Т. 58. – N. 6. – С. 949–955.
49. Держинская, И.С. Питательные среды для выделения и культивирования микроорганизмов: учебное пособие / И.С. Держинская. – Астрахан. гос. техн. ун-т. – Астрахань: Изд-во АГТУ, 2008 – 236 с.
50. Диалло, А. Качество перепелиных яиц и эмбриональное развитие в связи с возрастом несушек: дис. ... канд. с-х наук: 06.02.04 / А. Диалло. – Москва, 2002. – 88 с.

51. Дорожко, О.В. Микроэлементы в жизнедеятельности патогенных и некоторых других микроорганизмов / О.В. Дорожко, Е.В. Ротшильд // Успехи современной биологии. – 1985. – Т.99, Вып. 2. – С.313–319.
52. Досон, Р. Справочник биохимика / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
53. Дубровская, Т.А. Использование хитозансодержащего сырья / Т.А. Дубровская // Обзорная информация / ВНИЭРХ. Сер. обработка рыбы и морепродуктов. – 1996. – С. 11–22.
54. Егинчибаева, А.Д. Хранение железоокисляющих и сероокисляющих микроорганизмов методом криоконсервации и лиофилизации / А.Д. Егинчибаева, Н.Е. Бекенова, С.С. Ануарбекова // Вестник науки КАТУ им. С.Сейфуллина. – 2015. – №2. – С. 12–18.
55. Еремец, В.И. Получение и лабораторно-промышленное испытание ферментативного мышечно-кровенного (ФМКГ) и кровяного (ФКГ) гидролизатов в составе питательных сред при изготовлении противоящурных вакцин / В.И. Еремец и др. // Состояние, проблемы и перспективы развития вет. науки России. – М., 1999. – Т.1. – С. 303.
56. Ермолаев, М.В. Биологическая химия / М.В. Ермолаев. – М.: Медицина, 1978. – 320 с.
57. Задорожная, Л.А. Перепеловодство / Л.А. Задорожная М: АСТ, Донецк: Сталкер, 2007. – 93 с.
58. Заерко, В.И. Определение количества живых сальмонелл и листерий в вакцинах после сублимационной сушки с использованием различных питательных сред / В. И. Заерко, Н. И. Каменский // Диагност., лечение и профилактика заболеваний с.-х. животных. – Ставрополь: Ставроп. гос. с.-х. акад., 1995. – С. 28–30.
59. Заерко, В.И. Перспективность технологий изготовления и применения живых вакцин для профилактики сальмонеллезов и пастереллезов / В.И. Заерко, В.И. Ситьков, И.К. Тутов // Современные достижения биотехнологии, вклад в науку и практику XXI века: Материалы Всероссийской конференции. – Ставрополь, 1999. – С. 86.

60. Зайцев, В.В. Использование биостимулятора при культивировании микробов / В.В. Зайцев, Ю.Г. Зелютков // Мат. междунар. науч.-практ. конф. «Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве». – Минск, 1998. – С. 90-91.
61. Зайцева, С.И. Применение озонотерапии в комплексном лечении больных деструктивными формами туберкулеза легких / С.И. Зайцева, Н.А. Крюкова // Пульмонология. – 2006. – №4. – С. 59–62.
62. Западнюк, В.И. Аминокислоты в медицине / В.И. Западнюк, Л.П. Купраш, М.У. Заика, И.С. Безверхая. – Киев, 1982. – 209 с.
63. Идрисов, Г. З. Иммуноморфологическая оценка новых моно- и ассоциированных вакцин при различных способах введения их в организм сельскохозяйственных животных: дис. ... докт. вет. наук: 16.00.01 / Г.З. Идрисов. – Казань, 1977. – 426 с.
64. Иерусалимский, Н.Д. Основы физиологии микроорганизмов и клеток / Н.Д. Иерусалимский. – М.: Изд-во АМН СССР, 1963. – 263 с.
65. Инструкция по санитарно-микробиологическому контролю тушек, мяса птицы, птицепродуктов, яиц и яйцепродуктов на птицеводческих и птицеперерабатывающих предприятиях. – М.: Комплекс, 1990. – 94 с.
66. Инструкция к бытовому озонатору Гроза. «Озон: что это?». – Томск: ООО Дон. – 12 с.
67. Исаева, Р.И. Экспериментальное обоснование разработки и усовершенствования селективных питательных сред для диагностики листериоза: дис. ... канд. мед. наук: 03.02.03 / Р.И. Исаева.– Махачкала, 2011. – 129 с.
68. Калашник, И.А. Стимулирующая терапия в ветеринарии / И.А. Калашник. – К.: Урожай, 1990. – 160 с.
69. Калишин, Н.М. Листериоз крупного рогатого скота: производственно-практическое издание / Н.М. Калишин. – Л.: Колос, 1981. – 96 с.
70. Калоус, В. Биофизическая химия / В. Калоус, З.М. Павличек: Мир, 1985. – 446 с.
71. Калын, П.С. Современная технологическая схема дезобработки яиц с момента их снесения до вывода молодняка / П.С. Калын, В.А. Бреславец, Б.Т. Стегний //

- Птахівництво: міжвід. темат. наук. зб. – Борки, 2008. – Вып. 62, ч. 2. – С. 352–359.
72. Калягина, С.Ю. Разработка микробиологической питательной среды из утильного мясного сырья: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / С.Ю. Калягина. – М., 2008. – 133с.
73. Каменский, Н.И. Повышение выхода биомассы листерий из штамма АУФ при культивировании глубинным способом в реакторах / Н.И. Каменский, И.К.Тутов // Сб. науч. тр. – Ставрополь: Ставроп. ГСХА, 1997. – С. 10–13.
74. Кантере, В.М. Теоретические основы технологии микробиологических производств / В.М. Кантере. – М.: Агропромиздат, 1991. – 272 с.
75. Катунина, Л.С. Поиск оптимального варианта питательного агара и стимулятора роста чумного микроба / Л.С. Катунина, В.С. Матющенко, Е.В. Юндин, А.А. Крылова, Г.П. Абгарян, И.Ф. Кучеренко // Особо опасные инфекции на Кавказе: Тез. докл. к шестой краевой науч. конф., посвящ. 70-летию Великой Октябрьской революции. – Ставрополь, 1987. – С. 360–362.
76. Кикалишвили, В.Н. Технология питательных сред в производстве бактериальных препаратов / В.Н. Кикалишвили. – Тбилиси: Сабгота Сакартвело, 1963. –138 с.
77. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. – М.: КолосС, 2006. – Ч.1. – 183 с.
78. Кнорре, Д.Г. Биологическая химия: Учеб. для хим., биол. и мед. спец. вузов. / Д.Г. Кнорре, С.Д. Мызина. – М.: Высш. школа, 2000. – 479 с.
79. Козлов, Ю.А. Питательные среды в медицинской микробиологии / Ю.А. Козлов. – М.: Медгиз, 1950. – 251с.
80. Колпаков Л.И. Стимулирующее действие экзогенной РНКазы на эубиогические штаммы лактобацилл, бифидобактерий и *Escherichia coli* / Л.И. Колпаков, В.М. Бондаренко, Ф.Г. Куприянова-Ашина, С.Ю. Егоров // Журнал микробиология. – 1996. – №4. – С. 14–18.
81. Кондрашкова, Т.В. Влияние некоторых минеральных солей на качество и срок годности питательной среды для выращивания чумного микроба / Т.В. Кондрашкова, Т.Н. Донская, Л.С. Зимарина // Проблемы особо опасных инфекций. –

Саратов, 1978.– Вып. 4.– С. 25–27.

82. Коркмасов, М.А. Питательные среды для выращивания энтеробактерий / М.А. Коркмасов, И.А. Баснакьян, В.И. Карабак // Тезисы докладов. Махачкала, 1988. – С.13.

83. Коротеева, Л.А. Конструирование питательной среды на основе гидролизатов крови для культивирования листерий / Л.А. Коротеева, В.П. Шишов, А.А. Маслак // Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия КРС, Крейтцфельдта-Якоба и др. прион. болезни, листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена. – Покров, 2001. – С. 145–147.

84. Корса-Вавилова, Е.В. Опыт применения озоновых технологий при производстве инкубационных яиц / Е.В. Корса-Вавилова, А.К. Османян, А.Л. Штеле, В.И. Волчков, Н.И. Пуресев, Е.А. Гордееня // Птица и птицепродукты. – 2011. – №1. – С.42–44.

85. Котельников, С.Н. Основные механизмы взаимодействия озона с живыми системами и особенности проблемы приземного озона для России / С.Н. Котельников // Российская академия наук. Труды института общей физики им. А.М. Прохорова. – 2015 – Том 71. – С.10–41.

86. Котляров, В.М. Проблема листериоза на рубеже тысячелетий / В.М. Котляров // Мат-лы Международного симпозиума «Листериоз на рубеже тысячелетий». – Покров. – 1999. – С. 48 – 52.

87. Кривопишин, И.П. Озон в промышленном птицеводстве / И.П. Кривопишин. – М.: Росагропром, 1988. – 2-е изд. - 173 с.

88. Кузник, Б.И. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований / Б.И.Кузник, В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон. – СПб.: Наука, 1998. – 310 с.

89. Кулыба, Н.П. ДНК-связывающиеся белки цианобактерии *Anabaena variabilis* / Н.П. Кулыба, А.В. Козлов // Тез. У Всесоюзн. симп. "Молекулярные механизмы генетических процессов». – М., 1983. – С.159.

90. Курилова, А.А. Разработка питательных сред на основе сырья растительного происхождения для культивирования возбудителей чумы, холеры, сибирской яз-

- вы: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / А.А. Курилова. - Ставрополь, 2009. - 149 с.
91. Лабинская, А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований: Учебное лит. для учащихся училищ и колледжей / А.С. Лабинская, Л.П. Блинкова, А.С. Ещина. - М.: Медицина, 2004. - 576 с.
92. Майский, В.Г. Технологические аспекты изготовления питательных сред на основе кукурузного экстракта / В.Г. Майский, Т.А. Быкова, А.А. Крылова // Разработка и производство препаратов медицинской биотехнологии: Тез. конф. 29–30 мая 1990 г. – Махачкала, 1990. – Ч.1. – С. 42–43.
93. Марков, Ю. Динамика накопления микрофлоры в инкубационных шкафах / Ю. Марков, В. Свириденко, С. Заика // Птицеводство. – 1984. – №6. – С. 32.
94. Матвеев, С.Д. Исследование и разработка коронно-разрядного озонатора для непрерывной дезинфекции яиц в инкубаторе: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 05.20.02 / С.Д. Матвеев. – Санкт-Петербург, 2009. – 24 с.
95. Медведев, А.П. Приготовление питательных сред из мяса и контроль их качества. (Способы получения общеупотребительных сред МПА, МПБ, МППБ, МППЖА для лабораторных и производственных нужд): Учеб.-метод. пособие для студентов, преподавателей и слушателей ФПК по спец. «Вет. медицина» / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий, В.Н. Алешкевич, Р.Б. Корочкин // Витеб. гос. акад. вет. медицины. – Витебск, 2003. – 12 с.
96. Меджидов, М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам / М.М. Меджидов. – М.: Медицина, 2003. – 208с.
97. Мейнелл, Э. Экспериментальная микробиология (теория и практика) / Э. Мейнелл, Дж. Мейнелл. – М.: Мир, 1967. – 347 с.
98. Месробяну, И.Л. Физиология бактерий / И.Л. Месробяну, Э. Пэунеску. – Бухарест: Медицина, 1963. – 807 с.
99. Мишин, Л.Т. Линолевая кислота как стимулятор роста термотолерантных дрожжей / Л.Т. Мишин, М.М. Грущенко // Изв. акад. наук Беларуси. Серия биологических наук. – 1994. – №4.
100. Морити, Т. Повреждение микроорганизмов в результате замораживания / Т. Морити // Биохимия. – 1969. –Т.7. – №7. – С.400–406.

101. Мосин, О.В. Разработка методов биотехнологического получения белков, аминокислот и нуклеозидов, меченных ^2H (D) И ^{13}C , с высокими степенями изотопного обогащения: дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23 / О.В. Мосин. – М., 1996. – 109 с.
102. Мосичев, М.С. Общая технология микробиологических производств. Учебное пособие / М.С. Мосичев, А.А. Складнев, В.Б. Котов. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 264 с.
103. МУК 4.2.1122-02 Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. – 31 с.
104. МУК 4.2.2316-08 Методы контроля бактериологических питательных сред. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. – 67 с.
105. Мултон, Дж.Л. Связь активности воды с тепловой ф инактивацией ферментных белков / Дж.Л. Мултон, А. Жильбо // Вода в пищевых продуктах. – М.: Пищевая промышленность, 1980. – С.232–246.
106. Нанос, В.Р. Ценная продукция / В. Нанос // Птицеводство. –1998. – №2. – С.29.
107. Нежута, А.А. Теоретические и практические основы технологии сублимационного высушивания биопрепаратов / А.А. Нежута, Э.Ф. Токарик, А.Я. Самуйленко, В.М. Безгин, Е.С. Сербис. – Курск: Издательство Курской государственной сельскохозяйственной академии, 2002. – 240 с.
108. Нестерина, М.Ф. Химический состав пищевых продуктов / М.Ф. Нестерина, И.М. Скурихин. – М.: Пищевая промышленность, 1979. – 248 с.
109. Никитина, В.А. Изыскание эффективной дрожжевой питательной среды для культивирования бактерий / В.А. Никитина, В.И. Бобрышев, Ф.И. Кафизова // Ученые записки Казанского гос. ветеринарного ин-та им. Н.Э.Баумана. – Казань, 1979. – С. 132–134.
110. Няникова, Г.Г. Питательная среда из ракообразных / Г.Г. Няникова, С.В. Водолажская, Т.Э. Маметнабиев // Разработки и стандартизации микробиологических питательных сред и тест-систем: Матер. 4-й Междунар. научно.-практ.

конф., посвящ 50-летию НПО «Питательные среды» МЗ РФ (15-17 сент., 2003 г.). – Махачкала, 2003. – С. 51–52.

111. Овчиников, Ю.А. Биоорганическая химия / Ю.А. Овчиников. – Москва: Просвещение, 1987. – 816 с.

112. Олиферова, Э.В. Научно-практическое обоснование применения стимулятора роста микроорганизмов ТС-1 в промышленной технологии культивирования энтеробактерий: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Э.В. Олиферова. – Ставрополь, 2000. – 188 с.

113. Омарова, С.М. Разработка питательных сред и микротест-системы для накопления, выделения и идентификации листерий: дис. ... докт. биол. наук: 03.00.07 / С.М. Омарова. – Махачкала, 2007. – 332 с.

114. Опарин, Ю.Г. Поглощение кислорода жидкими биоматериалами и некоторыми модельными растворами. Контроль качества химиотерапевтических препаратов / Ю.Г. Опарин, Ю.П. Чернецкий, Ю.А. Рябков. – М., 1987. – С. 120–122.

115. Опарин, Ю.Г. Повреждение и защита биоматериалов при замораживании и лиофилизации / Ю.Г. Опарин // Биотехнология. – 1996. – № 7. – С. 3–13.

116. Павленко, И.В. Разработка основных технологических процессов промышленного производства сухой вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / И.В. Павленко. – Щелково, 2003. – 123 с.

117. Павленко, И.В. Оптимизация защитной среды высушивания используемой при изготовлении живой сухой вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных / И.В. Павленко, А.А. Раевский, А.А. Нежута, А.Я. Дадасян // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – № 5-3. – том 13. – С.171–174.

118. Павленко, И.В. Совершенствование промышленной биотехнологии производства сухих живых бактериальных препаратов и оценка их эффективности: дис. ... докт. техн. наук: 03.01.06 / И.В. Павленко. – Кашинцево, 2013. – 453 с.

119. Панова, Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцин-

ных штаммов бактерий: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23 / Н.В. Панова. – Ставрополь, 2006. – 173 с.

120. Патент РФ №374373. Способ выращивания листерий / Л.И. Трусова, Л.Я. Телишевская. 1667141/30-15: заяв. 8.06.1971, опубл. 20.03.1973.

121. Патент РФ №2115720. Способ И.К. Тутова и В.И. Ситькова получения стимулятора роста микроорганизмов и его применение / И.К. Тутов, В.И. Ситьков. 96105245: заяв. 19.03.1996, опубл. 20.07.1998.

122. Патент РФ №2118363. Микробиологическая среда для выращивания и диагностики бактерий рода *Listeria* / Ю.Г. Костенко, А.Д. Неклюдов; Т.С. Шагова; А.Н. Иванкин; К.С. Янковский. 97110591/13: заяв. 19.06.1997, опубл. 27.08.1998.

123. Патент РФ №2158758. Питательная среда для накопления листерий / С.М. Омарова, Э.М. Ахмедова, Г.М. Тагирова, Ш.М. Меджидов. 98119902/13: заяв. 02.11.1998, опубл. 10.11.2000.

124. Патент РФ № 2161655. Питательная среда для культивирования и количественного учета иерсиний и листерий в объектах внешней среды / Л.С. Бузолева, Г.П. Сомов. 98120740/13: заяв. 10.11.1998, опубл. 10.01.2001.

125. Патент РФ № 2232194. Способ приготовления питательной среды для культивирования и количественного учета листерий (*Listeria monocytogenes*) в объектах внешней среды / М.Л. Сидоренко, Л.С. Бузолева. 2003100580/13: заяв. 08.01.2003, опубл. 10.07.2004.

126. Патент РФ № 2283347. Способ получения эмбрионального стимулятора роста микроорганизмов / Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, В.Н. Вакулин, Н.В. Косик. 2004115830/13: заяв. 24.05.2004, опубл. 10.09.2006.

127. Пенькова, Н.И. Изучение лактогенных свойств гидролизатов из нетрадиционного сырья природного происхождения в питательных средах и *in vivo*: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03/ Н.И. Пенькова. – Ставрополь, 2010. – 160 с.

128. Пигарева, М.Д. Разведение перепелов / М.Д. Пигарева. – М.: Россельхозиздат, 1978. – 80 с.

129. Пинчук, И.М. Исследование возможности использования яблочных выжи-

- мок в качестве компонента питательных сред / И.М. Пинчук, Е.А. Бетева // Индустрия продуктов здорового питания – третье тысячелетие (человек, наука, технология, экономика). – М., 1999. – Ч.1. – С. 182-183.
130. Питерман, М. Физические и химические свойства рибосом / М. Питерман. – М.: Мир, 1967. – 221 с.
131. Платова, Л.Г. Разработка комплексной технологии пищевых добавок на основе некрахмальных полисахаридов для хлебопечения: автореф. дис. ... канд. техн. наук: 03.00.23 / Л.Г. Платова. – М., 1997. – 28 с.
132. Полосенко, О.В. Разработка питательных сред для выделения листерий / О.В. Полосенко, А.П. Шепелин, И.И. Марчихина, Л.П. Шолохова // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т.6. – №3. – С. 92.
133. Полюдек-Фабини, Р. Органический анализ / Р. Полюдек-Фабини, Т. Бейрих. – Ленинград: «ХИМИЯ», 1981. – 622 с.
134. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской микробиологии / М.С.Поляк, В.И.Сухаревич, М.Э.Сухаревич. – Санкт-Петербург. – 2002. – 80 с.
135. Попов, П.А. Технология обеззараживания объектов ветеринарного надзора в птицеводстве с применением озона: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 06.02.05 / П.А. Попов. – М., 2013. – 27 с.
136. Прокопенко, А.А. Технология обеззараживания воздуха облучателями-рециркуляторами в помещениях яйцескладов при заболеваниях птицы аэрогенными инфекциями / А.А. Прокопенко // Российский журнал «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». – 2015 – № 3(15). – С. 34–38.
137. Пучковская, Н.А. Учение академика В.П. Филатова о биогенных стимуляторах и тканевой терапии, его научное и практическое значение / Н.А. Пучковская // Тканевые препараты в животноводстве. – К., 1962. – С. 7–15.
138. Раскин, Б.М. Экспериментальное обоснование рационального использования сырья в производстве микробиологических питательных сред: автореф. дис. ... докт. мед. наук / Б.М. Раскин – М., 1982. – 26 с.
139. Ржепаковский, И.В. Разработка биостимулятора эмбрионального и оценка его эффективности при иммунодефицитных состояниях у животных раннего

возраста: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.23; 16.00.02 / И.В. Ржепаковский. – Ставрополь, 2003. – 157 с.

140. Ржепаковский, И.В. Отработка технологии получения пептидсодержащей субстанции на основе эмбриональных тканей птиц / И.В. Ржепаковский, С.С. Аванесян, Л.Д. Тимченко // Современные достижения биотехнологии. Новации пищевой и перерабатывающей промышленности материалы VI Международной научно-практической конференции. – Ставрополь: Северо-Кавказский федеральный университет, 2016. – С.314–315.

141. 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. – № 2. – 2016 – С. 54–60.

142. Романенко, О.А. Перспективы разработки новых стимуляторов роста микроорганизмов из нетрадиционного биологического сырья / О.А. Романенко, М.Н. Сизоненко // Тезисы докладов Шестой ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ–РАН. – Ростов-на-Дону: Изд. ЮНЦ РАН, 2010.– 420 с.

143. Романенко, О.А. Современные проблемы производства бактериальных вакцин / О.А. Романенко, М.Н. Сизоненко // Мат-лы Международной научно-практической интернет конференции, посвященной 80-летию кафедры физиологии СГАУ. – Ставрополь: Изд-во СтГАУ, 2010. – 93 с.

144. Романова, Ю.М. Цитокины возможные активаторы роста патогенных бактерий / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Вестник РАМН. – 2000. – №1. – С. 13–17.

145. Румянцев, Г.Е. Тканевая терапия / Г.Е. Румянцев. – Ростов-н/Д, 1950. – 120 с.

146. Рябов, В.Г. Содержание микроэлементов и пестицидов в мясе бычков при откорме / В.Г. Рябов, В.К. Генкель, Н.В. Волкова // Материалы междунар. конф. «Загрязненность экол. систем токсикантами и актуал. вопр. соврем. фармакологии и токсикологии. Подгот. кадров». – Троицк, 1996. – С. 124–126.

147. Савина, А. Зебрина-настоящий золотой ус / А. Савина. – М.: АСТ, 2007. – 62

с.

148. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология: учебное пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.О. Сазыкин, С.Н. Орехов, И.И. Чакалева. – М.: издательский центр «Академия», 2006. – 256 с.
149. Самуйленко, А.Я. Основы биотехнологии производства биологических препаратов. (Теоретические основы, оборудование, технологические линии) / А.Я. Самуйленко, Е.А. Рубан. – М. – 2000. – 782 с.
150. Самуйленко, А.Я. Инфекционная патология животных: Том. 3 / А.Я. Самуйленко. – М.: РАСХН, 2009. – 861 с.
151. Сбойчаков, В.Б. Микробиология с основами эпидемиологии и методами микробиологических исследований: учебник для средних медицинских учебных заведений / В.Б. Сбойчаков. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 606 с.
152. Светлакова, Е.В. Совершенствование способов повышения выживаемости микробных клеток в сухих живых вакцинах и пробиотиках: дис. ...биол. наук: 03.00.23 / Е.В. Светлакова. – Ставрополь, 2003. – 164 с.
153. Сизов, А.А. Исследование свойств экстрактов и компонентов эмбриональных тканей птиц раннего срока развития и получение на их основе ветеринарного препарата иммуностимулирующего действия: автореф. дис. ... канд. биол. наук / А.А. Сизов. – Новосибирск, 1996. – 20 с.
154. 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 // Тезисы докладов Шестой ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ РАН. – Ростов-на-Дону: Изд. ЮНЦ РАН, 2010. – С.43–44.
155. 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: Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 30-летию КБГСХА им. В.М. Кокова. – Нальчик: Полиграфсервис и Т, 2011. – С. 135–137.

156. 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 // Тезисы докладов VII ежегодной научной конференции студентов и аспирантов базовых кафедр ЮНЦ РАН. – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2011. – С. 44.
157. 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 Всероссийской научно-методич. конф. по патологической анатомии животных. – Москва: Изд-во ФГБОУ ВПО МГАВМиБ, 2011. – С. 196-198.
158. 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-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Ставропольской государственной медицинской академии. – Ставрополь: Изд-во СтГМА, 2012. – С. 63–66.
159. 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 Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. – Ставрополь: ООО «Экспо-Медиа», 2012. – С. 182.
160. 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.
161. 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.

162. 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.
163. 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 Международной научно-практической конференции. – Минск-Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2014. – С. 195–198.
164. 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.
165. 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. Материалы VI международной научно-практической конференции. – Ставрополь: Изд-во СКФУ, 2016. – С. 330-332.
166. 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.
167. Ситьков, В.И. Влияние ферментативного гидролизата мышц (ФГМ) на рост лептоспир в водно-сывороточной среде / В.И. Ситьков, И.К. Тутов, А.П. Сурмило, Г.Н. Стефаниди, В.Г. Харченко // Разработка и освоение производства нового поколения лекарственных средств для животных и применение в ветеринарной практике. Тезисы докладов. – Ставрополь, 2000. – С. 107 – 108.
168. Скичко, Н.Д. Гидролизаты животных белков – основа питательных сред для промышленного производства биопрепаратов: дис ... докт. биол. наук / Н.Д.

Скичко. – М., 1992. – 49 с.

169. Смирнов, А.А. Экспериментальные исследования по дезинфекции озоном перепелиных инкубационных яиц инновации в сельском хозяйстве / А.А. Смирнов // Инновации в сельском хозяйстве. – М.: Всероссийский научно-исследовательский институт электрификации сельского хозяйства, 2015. – №5(15). – С. 53–55.

170. Смирнов, С.В. Современные методы клеточной терапии при лечении ожогов / С.В. Смирнов, И.В. Киселев, А.В. Васильев и др. // Хирургия. – 2003. – №12. – С. 58–62.

171. Смирнова, Г.А. Изучение пептидного и аминокислотного состава различных белковых основ питательных сред / Г.А. Смирнова, Б.М. Раскин, В.А. Мельникова, Е.Л. Целигорова // ЖМЭИ. – 1985. – № 12. – С. 22–26.

172. Смирнова, Г.А. Изучение влияния пептидного и аминокислотного состава питательных основ на параметры роста микроорганизмов / Г.А. Смирнова, В.А. Мельникова, Б.М. Раскин и др. // ЖМЭИ. – 1987. – Т.2. – № 11. – С. 26-30.

173. Старцева, О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения: дис. ...канд. биол. наук: 03.00.23 / О.Л. Старцева. – Ставрополь, 2005. – 182 с.

174. Сторчевой, В.Ф. Ионизация и озонирование воздушной среды в птицеводстве: дис. ... док. техн. наук: 05.20.02 / В.Ф. Сторчевой. – Москва, 2004. – 283 с.

175. Сулейманов, С.М. Методы морфологических исследований (методическое пособие) / С.М. Сулейманов, П.А. Паршин, Ю.П. Жарова. – Воронеж. – 2000. – 64 с.

176. Султанов, З.З. Разработка и совершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред: дис. ... док. биол. наук: 03.00.07 / З.З. Султанов. – Махачкала, 2008. – 271 с.

177. Тартаковский, И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика / И.С. Тартаковский, В.В. Малеев, С.А. Ермолаева. – М.: Медицина для всех, 2002. – 173 с.

178. Телишевская, Л.Я. Влияние добавок органических кислот на вегетирующую способность листерий в мясных питательных средах / Л.Я. Телишевская, Л.И. Трусова // Труды ВГНКИ. – М. – 1975. – Т.21. – С. 165–170.
179. Телишевская, Л.Я. Методические рекомендации по контролю пептидного состава гидролизатов для выращивания бактериальных культур / Л.Я. Телишевская. – М., 1994. – 7 с.
180. Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты: Получение, состав, применение / Л.Я. Телишевская. – М.: Аграр. наука, 2000. – 295 с.
181. Телишевская, Л.Я. Минеральные элементы в жизнедеятельности и метаболизме патогенных бактерий / Л.Я. Телишевская, В.Т. Ночевный // Ветеринарная патология. – 2015. – №4. – С. 19–28.
182. Телишевская, Л.Я. Питание и метаболизм патогенных микроорганизмов / Л.Я. Телишевская, Н.К. Букова А.А. Комаров, В.Т. Ночевный. – М.: Издательский дом «Научная библиотека», 2016. – 156 с.
183. Телишевская, Л.Я. Таксономия и различия в химических свойствах *Listeria monocytogenes* и *Erysipelotrix rhusiopathiae* / Л.Я. Телишевская, А.В. Сорокин, Л.Г.Цатурян, О.Д.Скляр, А.А.Комаров // Ветеринарная патология. – 2017. – №1. – С.40–48.
184. Терентьева, Л.И. Молибденово-кислый аммоний как фактор повышения чувствительности жидких питательных сред для диагностики чумного микроба / Л.И. Терентьева, Р.А. Аптасарова, Л.Л. Орел // Современные аспекты эпиднадзора за особо опасными инфекциями: Тез. XIII конф. противочум. учр. Средней Азии и Казахстана. – Алма-Ата. – 1990. – С.91–93.
185. Технологический регламент по изготовлению и контролю вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма «АУФ» 00482861-0061-2009 . – 2009. – 98 с.
186. Тимченко, Л.Д. Некоторые показатели развития куриных эмбрионов под влиянием низкочастотного лазерного облучения / Л.Д. Тимченко, Е.Г. Затона // Проблемы развития биологии и экологии на Северном Кавказе: Материалы 51 научно-методической конференции «Университетская наука - региону», посвящен-

ная 75- летию СГУ. – Ставрополь: Изд-во СГУ, 2006. – С. 207–210.

187. 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: Materiały VII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji. - Nauk biologicznych.- Przemysł: Nauka i studia, 2011. – Vol. 42. – S. 54–57.*

188. 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.*

189. 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.*

190. Тимченко, Л.Д. Использование современных технологий для совершенствования способа получения тканевого препарата на основе эмбриональных тканей птиц / Л.Д. Тимченко, И.В. Ржепаковский, П.А. Омелянчук // *Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины. Материалы V Международной научно-практической конференции. – Ростов-на-Дону: Изд-во Южного федерального университета, 2013. – С.185–186.*

191. 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 ветеринарных фармакологов и токсикологов России. – Москва: Изд-во «Истоки», 2013. – С. 562–564.*

192. 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.

193. Ткаченко, И.Н. Разработка и оценка качества новых питательных сред и стимуляторов роста микроорганизмов на основе активированных гидролизатов из

молок рыб и вермикультуры: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / И.Н. Ткаченко. – Ставрополь, 2009. – 168 с.

194. Триполитова, А.А. Листерииоз: Микробиология, клиника, патол. анатомия, патогенез, лечение, эпидемиология, лабораторная диагностика / А.А. Триполитова, Г.В. Борисова. – Томск: Изд-во Томского ун-та, 1965. – 257 с.

195. Трускова, Т.Ю. Живильні середовища на основі гідролізату з некондиційного м'яса сільськогосподарських тварин / Т.Ю. Трускова, В.В. Кіприч // Вет. Медицина. Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини УААН. – 2000. – Вип. 78. – Т.1. – С. 287–291.

196. Трусова, Л.И. Изучение обмена веществ возбудителя листериоза / Л.И. Трусова, Л.Я. Телишевская // Труды ГНКИ. – М., 1972. – Т. 18. – С. 275-279.

197. Трунова, А.П. Особенности развития и иммуногенез куриного эмбриона под влиянием амброзийного антигена: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.30 / А.П. Трунова. – Ставрополь, 2008. – 181 с.

198. Тюлембаев, А.М. Влияние отдельных компонентов питательной среды на синтез фракции 1 при 37 °С / А.М. Тюлембаев // Матер. Межгос. науч. конф. «Профилактика и меры борьбы с чумой», посвящ. 100-летию открытия возбудителя чумы. – Алматы, 1994. – Ч. 1. – С. 145.

199. Тутов, И.К. Питательные среды из отходов вакцинно-сывороточного производства для культивирования листерий / И.К. Тутов, В.И. Бобрышев, Н.И. Каменский // Диагностика, лечение и профилактика заболеваний сельскохозяйственных животных: Сб. науч. тр. – Ставрополь: Ставроп. ГСХА, 1996. – С. 10–12.

200. Тутов, И.К. Основы биотехнологии ветеринарных препаратов. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений по специальности 31.08.00 – ветеринария / И.К. Тутов, В.И. Ситьков. – Ставрополь, 1997. – 253 с.

201. Тутов, И.К. Профилактика сальмонеллеза – проблема очень важная / И.К. Тутов, В.И. Заерко // Ветеринарная служба Ставрополя. – 2002. – №2. – С. 13-14.

202. Ургуев, К.Р. Токсинообразование *Cl.perfringens* на казеиново-панкреатической среде / К.Р. Ургуев, Л.В. Кириллов, Ф.Д. Любич и др. // Ветеринария. – 1973. – №2. – С. 39–40.

203. Филатов, В.П. Тканевая терапия / В.П. Филатов. – М.: Знание, 1955. – 180 с.
204. Филов В.А. Вредные химические вещества. Неорганические соединения V–VIII групп / В.А. Филов. – Л.: Химия, 1989. – 592 с.
205. 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. Материалы II международной студенческой научно-практической конференции. – Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2016. – С. 39–41.
206. Харчук, Ю. Разведение и содержание перепелов / Ю. Харчук. – Ростов на Дону: Феникс, 2005. – 96 с.
207. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Смит, Дж. Стейли, С. Уильямс. – М.: Мир, 1997. – Т.2 – 325 с.
208. Чернышев, А.В. Физико-химические аспекты участия ионов металлов в метаболизме бактерии *Azospirillum brasilense*: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.04 / А.В. Чернышев. – Саратов, 1999. – 175 с.
209. Шамсудинова, Б.М. Результаты испытания экстракта хлебных дрожжей на моделях питательных сред / Б.М. Шамсудинова, Ш.М. Меджидов // Разработки и стандартизация микробиологических питательных сред и тест-систем: Матер. 4-й Междунар. научно-практ. конф., посвящ 50-летию НПО «Питательные среды» МЗ РФ. – Махачкала, 2003. – С. 50.
210. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М. Шаршунова, В. Шварц, Ч. Михалец. – М.: Мир, 1980. – 622 с.
211. Шепелев, И.А. Оптимизация условий масштабируемого культивирования туляремийного микроба в технологиях получения протективных антигенов: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 14.00.36 / И.А. Шепелев. – Саратов, 2005. – 136 с.
212. Шептун, Н.Г. Биохимическое обоснование к получению и использованию гидролизатов фибрина и отходов производства препаратов иммуноглобулинов: дисс. ... канд. биол. наук / Н.Г. Шептун. – М., 1989. – 182 с.
213. Шеремет, О.В. Влияние характера лимитации на жизнеспособность возбу-

дителя чумы и содержание фракции 1 / О.В. Шерemet, Л.Д. Карташова, Т.Д. Ермоленко, А.Н. Терентьева // Матер. Межгос. науч. конф. «Профилактика и меры борьбы с чумой», посвящ. 100-летию открытия возбудителя чумы. – Алматы, 1994. – Ч. 1. – С. 157.

214. Шилов, П.И. Основы клинической витаминологии / П.И. Шилов, Т.Н. Яковлев. – Ленинград: Медицина, 1974. – 342 с.

215. Школьников, Е.В. Усовершенствование питательной среды и условий культивирования бактерий рожы свиней / Е.В. Школьников, А.Я Самуйленко, В.И. Еремец // Междунар. научно-практ. конф. «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными, экзот. и зооантропоноз. болезнями животных»: Сб. ст. – Покров, 2000. – С. 251–252.

216. Шуляк, Ф.С. Разработка новых методов бактериологической диагностики листериоза /Ф.С. Шуляк // Лептоспироз и листериоз сельскохозяйственных животных и меры борьбы с ними. – М., 1965. – С.117–119.

217. Щербаков, Л. Биохимия и товароведенье масличного сырья / Л. Щербаков. – М: Агропромиздат, 1991. – 304 с.

218. Эмануэль, Н.М. Порядок тестирования химических соединений как стабилизаторов полимерных материалов / Н.М. Эмануэль, В.И. Гладышев, Е.Т. Денисов, В.Ф. Цепалов, В.В. Харитонов, К.Б. Пиотровский. -Черноголовка, 1976. -С.35.

219. Ягодин, Б.А. Практикум по агрохимии. / Б.А. Ягодин, И.П. Дерюгин, Ю.П. Жуков. – М., 1987. – 511 с.

220. Ярцев, М.Я. Биологические свойства и анализ периодического культивирования пастерелл на разных питательных средах / М.Я. Ярцев, А.А. Раевский, Е.И Сотникова // Перед. научно-практический опыт в биол. промышленности. – 1987. – №12. – С. 1–4.

221. Ярцев, М.Я. Изучение влияния компонентов защитной среды на сохранемость вакцины против листериоза животных из шт. «АУФ» в прцессе сублимационной сушки / М.Я. Ярцев, И.В. Павленко, А.А. Раевский, В.П. Шишов, М.Л. Александрова // Тез. докл. V Всерос. конф. – Щелково, 1996. – С. 120–121.

222. Adele, E.G. Effect of temperature and pH on survival of *Listeria monocytogenes*

- in coleslaw / E.G. Adele, P.N. Levett // *Int. J. Food Microbiol.* – 1990. – Vol. 11. – №.3–4. – P. 345–350.
223. Amezaga, M.R. The role of peptide metabolism in the growth of *Listeria monocytogenes* ATCC 23074 at high osmolarity / M.R. Amezaga, I. Davidson, D. McLaggan, A. Verheul, T. Abee, I.R. Booth // *Microbiology.* – 1995. – №141. – P. 41–49.
224. Anderson, J.O. Effects of Freeze-Preservation on Some Pollen Enzymes. II. Freezing and Freeze-Drying Stresses / J.O. Anderson, J. Nath, E.G. Harner // *Cryobiol.* – 1978. – V. 15. – №4. – P. 469–477.
225. Angus, R.D. Evaluation of five mediums for the stabilization of Br. Abortus strain 19 desiccated by lyophilization / R.D. Angus, E.Z. Zove, D.E. Pietz // *Develop. Biol. Stand.* – 1977. – V.36. – P. 307–312.
226. Barreto, M. Extracts from seaweeds can promote fungal growth / M. Barreto, A.T. Critchley, C.J. Straker // *J. Basic Microbiol.* – 2002. – Vol. 42. – N 5. – P. 302–310.
227. Bohne, J. Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes* / J. Bohne, Z. Sokolovic, W. Goebel // *Molecular Microbiology.* – 1994. – №11. – P. 1141–1150.
228. Bohne, J. Differential regulation of the virulence genes of *Listeria monocytogenes* by the transcriptional activator PrfA / J. Bohne, H. Kestler, C. Uebele, Z. Sokolovic, W. Goebel // *Molecular Microbiology.* – 1996. – №20. – P. 1189–1198.
229. Brison, J. Action de cations Ca et Mg sur la croissance de quelques bacteriens halophiles d'origine marine / J. Brison, H. Vargues // *Ann. Inst. Past.* – 1963. – Vol. 105. – №3. – P. 580–596.
230. Bickley, J., Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions / J. Bickley, J. Short, D. Mc Dowell, H. Parkets // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1996. – V.22. – P. 153–158.
231. Corrigan, P.J. Pesticide residues in Australian meat / P.J. Corrigan, P. Seneviratna // *Veter. Rec.* – 1989. – T.125. – № 8. – P. 181–184.
232. Cowart, R.E. Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition / R.E. Cowart, B.G. Foster

// The Journal of Infectious Diseases. – 1985. – 151. – P. 721–730.

233. Cruz, N. Ultra high pressure homogenization of soymilk: Microbiological, physicochemical and microstructural characteristics / N. Cruz, M. Capellas, M. Herna'ndez, A.J. Trujillo, B. Guamis, V. Ferragut // Food Research International. – 2007. – V.40. – P. 725–732.

234. Curts, G.D. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* / G.D. Curts // Lett. Appl. Microbiol. – 1989. – V.8. – P. 95–98.

235. Dalton, C.B. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *Listeria Monocytogenes* in Milk / C.B. Dalton, C.C. Austin, J. Sobel, P. Hayes, W. Bibb, L. Graves // New Engl. J. Medicine. – 1997. – V. 336. – n.2. – P. 100–105.

236. Diels, A.M.J. Inactivation of *Escherichia coli* by high-pressure homogenisation is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition / A.M.J. Diels, L. Callewaert, E.Y. Wuytack, B. Masschalk, W. Michiels // International Journal of Food Microbiology. – 2005. – V.101. – P. 281–291.

237. Duszkiwicz-Reinhard, W. Badania microbiologiczne preparatow bialkowych z fasoli w ukladach modelowych oraz w polaczeniu z meisem / W. Duszkiwicz-Reinhard. – Warszawa; Wydaw. SGGW, 1992. – 59 c.

238. Ergun, A. Marek asisanda kullanilan cesitli su-landirma sivilarinin lagsiklik uzerinde in vivo ve in vitro atkilerin arastiril-masi / A. Ergun, H. Girgin, D. Eren // Etlik Met. Mikrob. Enst. Derg. – 1982/1983. – V. 4–5. – P. 39–49.

239. Flechtenmacher, W. Sprühgetrocknetes Proteinkonzentrat aus Säureoberläugen-behandeltem Rohkrill und Enzyvatisch / W. Flechtenmacher, W. Wanke // Inform. Fishwirtschaft. – 1976. – Vol. 25. – № 6. – P. 196–207.

240. Franks, F. Biological freezing and cryofixation / F. Franks // J. Microsc. - Gr. Brit. – 1977. – V. 111. – №1. – P. 3–16.

241. Fry, R.M. Freezing and drying of bacteria / R.M. Fry // Cryobiology. – London: acad. Press., 1966. – P.676–695.

242. Gadgil, M.D. The role of nutrient and temperature in the growth of *P. pestis* for vaccine production. 1. Effect of Ca^{++} and Mg^{++} on the growth of *Pasteurella pestis* in relation to the temperature of incubation / M.D. Gadgil, Y.S. Nimbkar, H.I. Ihala // Ind.

J. Pathol. and Bact.. – 1967.– V.10. – №.3. – P. 235–244.

243. Gandhi, M. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive / M. Gandhi, M.L. Chikindas // Intern. J. Food Microbiol. – 2007. – Vol. 113. – P. 1–15.

244. Gray, M. J. *Listeria monocytogenes* Isolates from Foods and Humans Form Distinct but Overlapping Populations / M. J. Gray, R.N. Zadoks, E.D. Fortes, B. Dogan, S. Cai, Y. Chen, V. N. Scott et al. // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – 70 (10). –P. 5833-5841.

245. Guzman, C.A. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant / C.A. Guzman, E. Domann, M. Rohde et al. // Mol. Microbiol. – 1996. – Vol. 20. – P. 119-126.

246. Jarvis, N.A. A review of minimal and defined media for growth of *Listeria monocytogenes* / N.A. Jarvis, C.A. O'Bryan, S.C. Ricke, M.G. Johnson, P.G. Crandall // Food Control. – 2016. – 66. – P. 256-269.

247. Jayko, L.G. Nutritional factors concerned with growth and lecithinase production by *Clostridium perfringens* / Jayko, L.G., H.C. Lichstein // J. Infect Dis. – 1959. – 104(2). – P.142–151.

248. Just, O. Ein Beitrag zur Stabilisierung des MVA-Impfstoffs / O. Just, J. Finke // Zbl. Bakteriол., Parasitenk., Infectioskrankh. Und Hyg. – 1979. – Abt. 1. Orig., A 245. – №3. – P. 276–282.

249. Kuldeep, D. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review / D. Kuldeep, K. Kumaragurubaran, T. Ruchi, Z.S. Muhammad, B. Sukhadeo, V.S.M. Satya, K.S. Raj // Veterinary Quarterly. – 2015. – Vol. 35. – No. 4. – P. 211–235.

250. Lanciotti, R. Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization / R. Lanciotti, F. Gardini, M. Sinigaglia', M.E Guerzoni // Letters in Applied Microbiology. – 1996. – 22. P. 165–168.

251. Le, D.T. A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-100) and a live attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS- 207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction / D.T. Le, D.G. Brockstedt, R. Nir-Paz, J. Hampl, S. Mathur, J. Nemwaitis, D.H. Serman, R. Hassan, E. Lutz, B. Moyer, et al. // Clin Cancer

Res. – 2012. – №18. – P. 858-868.

252. Leighton, P.M. Yersinia hepatic abscesses to longterm iron therapy / P.M. Leighton, H.M. Macsween // J. Amer. med. Ass. – 1987. – Vol. 257. – № 7. – P. 964–965.

253. Levitt, J. Cryobiology / J. Levitt. – London: Acad. Press. N.Y., 1966. – 495 p.

254. Lindsay, D.G. Monitoring and testing for residues of therapeutics in meat. / D.G. Lindsay // Veter. Rec. - 1983. – T. 112. – № 20. – P. 469–471.

255. Lion, M.B. The effect of oxygen on freeze-dried *Escherichia coli* / M.B. Lion, E.D. Bergmann // J. Gen Microbiol. – 1961. – V.24. – P.191-200.

256. Macfarlane, D.E. Improved media for the culture of *Neisseria gonorrhoea* / D.E. Macfarlane, T.E. Elian-Jones // J. Microbiol. – 1980. – Vol. 13. – №4. – P. 595–607.

257. Machalski, F. Nhermal inactivation of rabies and other rhabdoviruses: stabilization by the chelating agent ethylenediaminetetraacetic acid at physiological temperatures / F. Machalski, N.F. Parks, F. Solol, H.F. Chark // Infect. And Immun. – 1976. – V.14. – №1. – P. 135–153.

258. Mandelstam, J. Biochemistry of Bacterial Growth. 3rd edition / J. Mandelstam, K. McQuillen, I. Dawes. - Oxford etc.: Blackwell Scientific Publications, 1982. –VIII. – 449 p.

259. Matsumoto, Toshisada Assembly of paramyxo-viruses / Toshisada Matsumoto // Microbiol. And Immunol. – 1982. – V. 26. – № 4. – P. 285–320.

260. Mazur, P. Ciyobiology: The freezing of biological system / P. Mazur // I I Sciece. – 1970. – V. 168. – № 393. – P. 939–949.

261. McGann, L.E. Differing action of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents / L.E. McGann // Ciyobiol. – 1978. – V. 15. – №4. – P. 382–390.

262. Mead, P.S. Food-related illness and death in the Unites States / P.S. Mead, L. Slutsker, V. Dictz // Emerg. Infect. Dis. – 1999. –№223. – P. 607–625.

263. Meryman, H.T. Cryoprotective agents / H.T. Meryman // Cryobiol. – 1971. – V. 8. – №5. – P. 173–180.

264. Meryman, H.T. Colligative cryoprotection: The only artificial protective mechanism at slow cooling rates / H.T. Meryman, M. Douglas // Cryobiology. – 1977. – V. 14. – № 6. – P. 684.

265. Miller, J.S. Role of cryoprotective agents as hydroxyl radical scavengers / J.S. Miller, D.G. Cornwell // *Cryobiol.* – 1978. – V. 15. – №5. – P. 585-588.
266. Morichi, T. Protective effects of DL-threonine on bacterial cells during freeze-drying and ineffectiveness of its optically active forms / T. Morichi, K. Irie, N.K. Yano, H. Kembo // *Ag. Biol. Chem.* – 1966. – V.29. – №1. – P. 66–75.
267. Morio, A. Protein production by yeast in acidic cultural condition / A. Morio, N. Yukinobu, Yamada Tetsua // *Agr. And Biol. Chem.* – 1978. – V. 42. – № 12. – P. 91–92.
268. Murakami, K. Acids proteases of Antarctic Krill *Euphausia Superba* purification and some properties / K. Murakami, K. Kimoto // *Food Sci. Techn. Abstr.* – 1979. – Vol. 11. – № 2. – P. 200.
269. Neilands, J.B. Some aspects of iron metabolism / J.B. Neilands // *Bacterial. Rev.* – 1957. – №21. – P. 101–111.
270. Nieman, C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms / C. Nieman // *Bact. Rev.* – 1954. – P. 18–20.
271. Orii, I. Measurement of the pH of frozen Buffer solutions by using pH indicators / I. Orii, M. Morita // *G. Biochem.* – 1977. – V. 81. – № 1. – P. 163–168.
272. Rocourt, J. Epidemiology of human listeriosis and seafoods / J. Rocourt, C. Jacquet, A. Reilly // *Int. J. Food Microbiol.* – 2000. – 62 (3). – P. 197–209.
273. Phan-Thanh, L. A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria* / L. Phan-Thanh, T. Gormon // *International Journal of Food Microbiology.* – 1997. – 35. – P. 91–95
274. Premaratne, R.J. Development of an Improved Chemically Defined Minimal Medium for *Listeria monocytogenes* / R.J. Premaratne, W.J. Lin, E.A. Johnson // *Applied and environmental microbiology.* – 1991. – Vol. 57. – № 10. – P. 3046–3048.
275. Pollock, M.R. Unsaturated fatty acids in cotton wool plugs / M.R. Pollock // *Nature.* – Lond., 1948. – P. 161–165.
276. Rice, D.N. Nebraska residue avoidance program report reducing residues in meat and milk / D.N. Rice, S. Wallen, D. Nitzel // *Proceedings*, 1984. – P. 116–120.
277. Schlech, W.F. Foodborne listeriosis / W.F. Schlech, D. Acheson // *Clin. Infect.*

Dis. – 2001. – 31 (3). – P. 770-775.

278. Ripio, M.T. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition / M.T. Ripio, G. Dominguez-Bernal, M. Suarez, K. Brehm, P. Berche, J.A. VazquezBoland // *Research in Microbiology*. – 1996. – 147. – P. 371–384.

279. Serwer, Ph. Stability and in vitro DNA packaging of bacteriophages: effects of dextrans, sugars and polyons / Ph. Serwer, W.E. Masker, J.L. Allen // *J. Virol.* – 1983. – V. 45. – №2. – P. 665–671.

280. Siddiqi, R. Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and hemolysin production / R. Siddiqi, M.A. Khan // *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* – 1982. – A 253. – P. 225–235.

281. Sussman, A.J. Peptide transport and metabolism in bacteria / A.J. Sussman, C. Gilvarg // *Annual Reviews in Biochemistry*. – 1971. – 40. – P. 397–408.

282. Suzuki, M. Stability and residual moisture content of dried vaccinia virus / M. Suzuki // *Cryobiol.* – 1973. – V. 10. – №5. – P. 432–434.

283. Sword, C.P. Mechanisms of pathogenesis in *Listeria monocytogenes* infection. I. Influence of iron / C.P. Sword // *J. Bacteriol.* – 1966. – Sep.92(3). – P. 536–542.

284. Thiele, M. Untersuchungen zur embryotoxizität von ozon nach einer in ovo-begasung beim huhn: dis. ...Dr. med. vet.: 11.10.11 / M. Thiele. - Leipzig, 2011.–129 p.

285. Valder, G.F. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying / G.F. Valder, G.S. de Giory // *Appl. And Environ Microbiol.* – 1983. – V.45. – №1. – P. 302–304.

286. Venant, A. Emploi actuel des pesticides organochlores en France. Toxicite-residus dans les denrees alimentaires d'origine animale / A. Venant, L. Richou-Bac // *Bull. Soc Veter. Prat.* – Fr., 1984. – T. 68. - №1. – P. 31–59.

287. Waguespack, M. Eliminating residue in «Bob» veal calves / M. Waguespack // *Anim. Health Nutrit.* – 1986. – T.41. – №6. – P. 28–30.

288. Wesley, I.V. Listeriosis in animals / I.V. Wesley // *Listeria, listeriosis and food safety*. 2nd ed. Marcel Dekker Inc., New York, N.Y., 1999. – P. 39–73.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



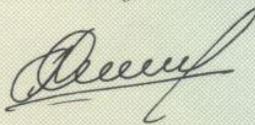
ПАТЕНТ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2525637

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ПЛОТНАЯ ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЛИСТЕРИОЗА**

Патентообладатель(ли): *Федеральное казенное учреждение
здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский
противочумный институт Федеральной службы по надзору в
сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2012148031
Приоритет изобретения 12 ноября 2012 г.
Зарегистрировано в Государственном реестре
изобретений Российской Федерации 23 июня 2014 г.
Срок действия патента истекает 12 ноября 2032 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2535980

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СТИМУЛЯТОРА РОСТА
 LISTERIA MONOCYTOGENES ИЗ АКТИВИРОВАННОЙ
 ЭМБРИОНАЛЬНО-ЯИЧНОЙ МАССЫ ПЕРЕПЕЛОК**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Северо-Кавказский федеральный университет" (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2013112979

Приоритет изобретения **22 марта 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации **20 октября 2014 г.**

Срок действия патента истекает **22 марта 2033 г.**

Врио руководителя Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Л.Л. Кирий



«УТВЕРЖДАЮ»
 Генеральный директор ФГУП
 «Ставропольская биофабрика»
 д-р.вет.наук В.И. Заерко
 « 26 » октября 2012 г.



АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы

« 26 » октября 2012 г.

№ 1

Мы, нижеподписавшиеся представители Ставропольской биофабрики: начальник цеха ЦППБВБП и ПС Лемешко В.Н., микробиолог цеха ЦППБВБП и ПС Булгакова И.В., начальник ОКК Медушевский А.Г., микробиологи ОКК Жаренко Л.Ю. и Рощина С.В., и представители Института живых систем Северо-Кавказского федерального университета: заведующий ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» доктор ветеринарных наук профессор Тимченко Л.Д., аспиранты кафедры ботаники, зоологии и общей биологии Сизоненко М.Н., Романенко О.А. составили настоящий акт о том, что в период с августа по сентябрь 2012 года на базе ФГУП «Ставропольская биофабрика» была изготовлена и испытана экспериментальная серия «Вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма АУФ».

При изготовлении экспериментальной серии вакцины, в процессе культивирования штамма АУФ *Listeria monocytogenes* на питательной среде бульон Хоттингера, в качестве стимулятора роста

«УТВЕРЖДАЮ»
 Директор
 ФКП «Ставропольская биофабрика»,
 д-р.вет.наук В.И. Заерко
 « 25 » _____ 2015 г.



АКТ

внедрения результатов научно-исследовательской работы

« 25 » марта 2015 г

№ 2

Мы, нижеподписавшиеся представители Ставропольской биофабрики: начальник цеха ПВБП Лемешко В.Н., начальник ОВБК Геладзе В.Ш., заместитель начальника ОПГФВБП Фомина И.О., микробиолог цеха ОПВВБП Булгакова И.В. и представители ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии, иммунопатологии и иммунобиотехнологии» Центра коллективного пользования научным оборудованием Северо-Кавказского федерального университета: заведующий лабораторией, доктор ветеринарных наук, профессор Тимченко Л.Д., младший научный сотрудник Сизоненко М.Н. составили настоящий акт о том, что в период с сентября по ноябрь 2015 года на базе ФГУП «Ставропольская биофабрика» была изготовлена и испытана экспериментальная серия «Вакцины сухой живой против листериоза сельскохозяйственных животных из штамма АУФ».

В среду высушивания вакцины в качестве дополнительного компонента была внесена биологически-активная субстанция на основе активированной эмбрионально-яичной массы перепелов «СРМП-СВ» в концентрации 1%, приготовленная на базе ПНИЛ «Экспериментальной иммуноморфологии,

