



Разработка способа глубинного культивирования вакцинного штамма *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*

О. Г. Лаптева

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» (ФГБНУ ФИЦВиМ), пос. Вольгинский, Владимирская обл., Россия

РЕЗЮМЕ

Представители рода *Mycoplasma* широко распространены в природе (почве, воде, навозе, злаках, пищевых продуктах), среди них имеются виды, патогенные для человека, животных и птиц. К группе особо опасных инфекционных болезней отнесена контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота, возбудителем которой является *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. В настоящее время риск заноса возбудителя инфекции на территорию России с импортным скотом и сырьем из неблагополучных регионов сохраняется. В связи с этим совершенствование технологии изготовления вакцины против контагиозной плевропневмонии является актуальной задачей. Целью данного исследования явилась разработка глубинного способа культивирования вакцинного штамма *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Данный метод позволяет получать за короткий промежуток биомассу в больших объемах и упрощает технологию изготовления биопрепаратов. В процессе работы изучена динамика накопления биомассы микоплазмы при безопорном методе культивирования. Наглядно продемонстрированы 4 фазы роста бактерии. В первые двое суток выращивания отмечали незначительное снижение концентрации микробных клеток, третьи – четвертые сутки характеризовались увеличением биомассы на несколько порядков от $2,5 \times 10^8$ до $4,5 \times 10^9$ клеток в единице объема, на 5-е сутки концентрация находилась в равновесном положении, и начиная с 6-х суток регистрировали наступление фазы гибели микроорганизма. Аналогичная динамика прослеживалась и при культивировании в биореакторе. При визуализации микоплазмы, полученной при выращивании глубинным способом, на твердой питательной среде наблюдали единичные колонии или их скопления, имеющие вид яичницы-глазуньи. Таким образом, используя безопорный метод культивирования и такие параметры, как засев микоплазмы в дозе 10^5 микробных клеток в единице объема, объем заполнения на 2/3, температура инкубирования ($37 \pm 0,5$) °C, перемешивание при 90 об/мин, а также применение синтетической питательной среды бактерия накапливается в титре 10^9 клеток в единице объема.

Ключевые слова: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, контагиозная плевропневмония крупного рогатого скота, культивирование, фазы роста

Благодарности: Автор выражает признательность заместителю директора по производству и качеству биопрепаратов (ФГБНУ ФИЦВиМ) А. В. Луницину. Работа выполнена в рамках государственного задания.

Для цитирования: Лаптева О. Г. Разработка способа глубинного культивирования вакцинного штамма *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (2): 158–163. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-158-163.

Конфликт интересов: Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Для корреспонденции: Лаптева Оксана Георгиевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории «Лекарственные средства для животных» ФГБНУ ФИЦВиМ, 601125, Россия, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский, ул. Академика Бакулова, стр. 1, e-mail: oksana-lapteva@rambler.ru.

Development of submerged cultivation method for vaccine *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strain

O. G. Lapteva

Federal Research Center for Virology and Microbiology (FRCVM), Volginsky, Vladimir Oblast, Russia

SUMMARY

Members of *Mycoplasma* genus are widely spread in nature (soil, water, manure, cereals, food products), and there are ones pathogenic for humans, animals and birds. The group of highly dangerous diseases include contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) caused by *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*. Risk of the disease agent introduction to Russia with imported livestock and raw materials still remains. Therefore, of topical importance is the improvement of the CBPP vaccine manufacturing technology. The studies were aimed at the development of the method of the submerged cultivation of the vaccine *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strain. This method allows production of a large amount of the biological material and simplification of the biological product manufacturing technology. Dynamics of the mycoplasma mass accumulation during the submerged cultivation was examined within the studies. Four phases of the bacterial growth were clearly demonstrated. Insignificant decrease of the microbial cell concentration was reported in the first two days of cultivation; days 3 and 4 were specified by the increase of the microbial mass concentration by several orders of magnitude: from 2.5×10^8 to 4.5×10^9 cells/volume unit, on day 5 the concentration was in equilibrium and starting from day 6 the onset of the microorganism's death phase was reported. Similar dynamics was demonstrated during cultivation in the bioreactors. Singular fried egg-shaped colonies or their accumulations were observed at the visual examination of the submerged cultivated mycoplasma. Therefore, when using submerged cultivation method and such parameters as mycoplasma seeding at a dose of 10^5 microbial cells / volume unit; 2/3 filling volume; incubation at (37 ± 0.5) °C; agitation at 90 rpm and use of synthetic nutrient medium, the bacterium accumulates at the titre of 10^9 cell/volume unit.

Keywords: *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, contagious bovine pleuropneumonia, cultivation, growth phases

Acknowledgements: The author expresses gratitude to A. V. Lunitsyn, Deputy Head for Biological Product Manufacture and Quality (FGBRI FRCVM). The works have been completed under the state assignment.

For citation: Lapteva O. G. Development of submerged cultivation method for vaccine *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* strain. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (2): 158–163. DOI: 10.29326/2304-196X-2023-12-2-158-163.

Conflict of interest: The author declare no conflict of interest.

For correspondence: Oksana G. Lapteva, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory for Veterinary Medicinal Products, FRCVM, 601125, Russia, Vladimir Oblast, Petushinsky District, Volginsky, ul. Akademika Bakulova, str. 1, e-mail: oksana-lapteva@rambler.ru.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе производства бактериальных препаратов используется большое количество биомассы, которую получают с применением глубинного метода культивирования. Этот метод был внедрен в практику Н. Е. Лебедевым в 1950 г. Ученый доказал возможность выращивания бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в реакторах, применяя принудительную аэрацию и перемешивание [1].

Использование данного способа позволило достичь значительных успехов в развитии технологий производства биопрепаратов в промышленных объемах [2]. Например, были усовершенствованы технологии выращивания тулярийного микроба [3], бактерий *Bacillus subtilis* и *Bacillus licheniformis* для производства пробиотиков [4] и т. д.

При глубинном культивировании микробные клетки выращивают в жидкой питательной среде в специальных аппаратах – ферментерах различных модификаций. Емкость снабжена разнообразной по конфигурации мешалкой с регулируемым числом оборотов, датчиками температуры, pO_2 , pH и уровня пены, показания которых выводятся на табло компьютера. Снаружи имеются порты отбора проб и другие устройства [5].

При культивировании микроорганизмов глубинным способом применяют жидкие питательные среды. В таком физическом состоянии они облегчают доступ бактериям к питательным веществам, легко перемешиваются при инкубировании, что обеспечивает обновление питательных веществ для культуры [6].

Такие бактерии, как микоплазмы, крайне требовательны к средам выращивания. В естественных условиях они находятся в тесном контакте с клеткой хозяина, получая все необходимые вещества в готовом виде для своего развития. Поверхностные мембраны микоплазм и клетки организма имеют почти одинаковую структуру, в результате чего возникает тесный мембранный контакт по типу «растворения» друг в друге. Это взаимодействие облегчает транспорт необходимых питательных материалов для микоплазмы из цитоплазмы клетки хозяина. Такое сотрудничество привело к тому, что данный микроорганизм в процессе эволюции утратил гены, кодирующие эти вещества. Поэтому искусственные питательные среды для культивирования микоплазм должны содержать сложные компоненты, необходимые для их выращивания. Белковую основу в среде составляет вытяжка из бычьего

сердца или пептона. В 70-е гг. XX века наибольшее признание получили среды, основа которых состояла из пептона Мартена и бульона из сердца крупного рогатого скота. В качестве ростового фактора и источника витаминов группы В используют дрожжевой экстракт. Источником стеролов служит сыворотка лошади, реже свиньи, которую добавляют в большом количестве. Сыворотку крови крупного рогатого скота не используют, так как она способна задерживать рост некоторых видов микоплазм [7]. Так, для культивирования *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae* применяют сыворотку крови свиней, которая обеспечивает получение биомассы данных микоплазм на модифицированной питательной среде Фрея [8]. Источником энергии служат глюкоза, L-аргинин или мочевины [9].

Большинство микоплазм являются факультативными паразитами или комменсалами животных и растений. Объекты паразитирования микоплазм весьма обширны – начиная от растений и заканчивая млекопитающими (включая человека). Существуют виды микоплазм, патогенные для человека, животных и птиц. К ним следует отнести *M. mycoides* – возбудитель пневмонии крупного и мелкого рогатого скота, *M. agalactiae* – возбудитель ревматоидного синдрома мелкого рогатого скота, *M. pneumoniae* – возбудитель острых респираторных заболеваний и первичной атипичной пневмонии человека, обладающий высокой гемолитической активностью [10].

Среди микоплазм следует выделить *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*, вызывающую такое высококонтагиозное заболевание крупного рогатого скота, как контагиозная плевропневмония. Болезнь характеризуется лихорадкой, фибринозной интерстициальной пневмонией, серозно-фибринозным плевритом с последующим образованием анемических некрозов и секвестров в легких, скоплением большого количества экссудата в грудной полости [11–13].

Болезнь оценивается мировым сообществом как особо опасная и входит в список notiфицируемых инфекций Всемирной организации охраны здоровья животных (WOAH). Также это заболевание является трансграничным, при распространении которого возможны серьезные последствия на национальном уровне. Ежегодные экономические потери при контагиозной плевропневмонии в странах Африканского континента составляют 30 млн евро [14–16].

В конце XIX – начале XX века это заболевание было распространено в странах Европы, Азии, Африки и в Австралии. Введение жестких ветеринарных мер в различных государствах способствовало ликвидации заболевания во многих частях земного шара. В естественных условиях указанный патоген поражает только жвачных животных, главным образом крупный рогатый скот и зебу. Контагиозная плеввропневмония у крупного рогатого скота проявляется в виде изменения общего состояния организма (отсутствия аппетита, лихорадки) и наличия респираторных признаков (одышки, полипноэ, кашля и выделений из носа). Чаще всего болезнь регистрируют в подострой и бессимптомной форме. В случаях хронической формы без проявления клинических признаков животные являются наиболее опасными в отношении распространения инфекции [17].

Российская Федерация – первая из стран ЕАЭС, которая в 2020 г. включена ВОАН в список из 20 стран, официально благополучных по контагиозной плеввропневмонии крупного рогатого скота (все члены ВОАН являются 182 страны мира). В настоящее время основное внимание сосредоточено на предотвращении заноса возбудителя болезни на территорию нашей страны с импортным скотом и сырьем из неблагополучных регионов [18].

В связи с этим должна быть разработана технология изготовления вакцины, в процессе производства которой существуют критические контрольные точки. Для культивирования микоплазм применяют такие обогащенные питательные среды, как F₆₆ и Gourlay, что, в свою очередь, ведет к возможности бактериальной контаминации (неумышленной контаминации). Использование антибиотиков на стадии приготовления среды крайне затруднительно ввиду высокой чувствительности к ним микоплазм (кроме пенициллинов и сульфаниламидов). Данный микроорганизм требователен к pH среды, поэтому при ее приготовлении водородный показатель устанавливают в пределах 7,8–8,0. Однако в процессе культивирования pH быстро снижается, что оказывает влияние на урожай микоплазм и сохранность бактерии вне условий культивирования [18].

Таким образом, технология культивирования микоплазм имеет ряд сложностей, которым необходимо уделить особое внимание, а использование глубинного метода культивирования бактерий в биотехнологии является актуальным.

Целью данного исследования явилась разработка глубинного метода культивирования вакцинного штамма *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали вакцинный штамм «МАННИИВВиМ» *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides*. Используемый штамм бактерии получали из «Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных» (реестровый номер ЦКП – 441429)¹.

Питательные среды: питательный бульон и питательный агар (Oxoid Ltd., Великобритания), дрожжевой

экстракт (Sanofi Diagnostics Pasteur, Франция) и сыворотка лошади (ООО «БиолоТ», Россия). Питательные среды готовили по рекомендованным производителем прописям. Среда стерилизовали автоклавированием при 121 °C в течение 15 мин.

Оборудование: биореактор 5-литрового объема (NBS, США), шейкер. В условиях шейкера-инкубатора культивирование проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см³ с внесением 50 см³ питательной среды. Выращивание в ферментере осуществляли с автоматическим контролем ключевых параметров: температуры, скорости перемешивания, pH питательной среды.

Культивирование в колбах на шейкере. Приготовили питательную среду на основе жидкого бульона и 10% дрожжевого экстракта, добавили к ней 20% инактивированной сыворотки лошади и разлили по 50 см³ в колбы объемом 250 см³. Посевной материал бактерии восстановили до исходного объема и приготовили десятикратные разведения 10⁻¹ и 10⁻². Затем 5,0 см³ посевного материала в разведении 10⁻² вносили в готовую питательную среду. Колбы с инфицированным материалом и контрольную инкубировали при (37 ± 0,5) °C и статическом перемешивании 100 движ/мин.

Культивирование в реакторе. Рабочим посевным материалом в объеме 300 см³ инфицировали готовую питательную среду объемом 3,0 дм³ и вносили в реактор по замкнутой системе. Устанавливали автоматический режим культивирования: температура – (37 ± 0,5) °C, перемешивание – 90 об/мин, аэрация путем барботирования с последующим перемешиванием начиная с 2-х сут культивирования.

После окончания выращивания оценивали концентрацию жизнеспособных клеток, визуализацию микро-организма и микробиологическую чистоту культуры.

Микробиологическую чистоту культуры контролировали путем посева на питательные среды по ГОСТ 28085-2013².

Концентрацию жизнеспособных клеток оценивали методом предельных разведений. Из объединенной пробы готовили десятикратные разведения на забуференном физиологическом растворе (pH 7,2–7,4) с 10⁻¹ по 10⁻⁹, затем по 1,0 см³ каждого разведения начиная с 10⁻⁴ по 10⁻⁹ засевали в 3 пробирки с готовой питательной средой. Пробирки инкубировали при (37 ± 0,5) °C в течение 14 сут. Затем визуально регистрировали наличие или отсутствие роста микроорганизма по проявлению опалесценции. Наиболее вероятное число клеток в единице объема рассчитывали по таблице Мак-Креди.

Визуализацию штамма проводили путем посева по 0,1 см³ из наивысших разведений, где наблюдали в бульоне ярко выраженную опалесценцию, на чашки с твердой синтетической питательной средой. После полного впитывания содержимого чашки с посевами помещали в CO₂-инкубатор. Инокулянты инкубировали в течение 5–7 сут при температуре (37 ± 0,5) °C в атмосфере с повышенным до 5% содержанием CO₂ и с 95%-й относительной влажностью. Затем исследовали выросшие на плотных средах колонии путем микроскопирования с помощью светового микроскопа Opton ID 03 (ZEISS, Германия).

¹ Государственная коллекция микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных. Режим доступа: <https://ckp-rf.ru/catalog/ckp/441429>.

² ГОСТ 28085-2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности. Режим доступа: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293775/4293775115.pdf>.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии исследований определяли динамику накопления биомассы микоплазмы при культивировании во взвеси в колбах на шейкере. Культивирование осуществляли до момента выхода культуры на фазу стационарного роста. Была определена исходная концентрация микоплазмы в питательной среде при посеве – $11,5 \times 10^6$ наиболее вероятных единиц микробных клеток в единице объема. Далее на протяжении 7 сут культивирования отбирались пробы для оценки накопления биомассы. Результаты представлены на рисунке 1.

Как видно из графика, лаг-фаза длилась первые 2 сут выращивания, в течение которых наблюдали незначительное снижение концентрации микробных клеток, титры составляли $2,5 \times 10^5$ – $9,5 \times 10^5$. Третьи – четвертые сутки рассматривались как фаза логарифмического роста, когда шло увеличение бактериальной популяции на несколько порядков. В этот период времени произошло накопление микоплазмы до $2,5 \times 10^8$ – $4,5 \times 10^9$ клеток в единице объема. На 5-е сут концентрация находилась в равновесном положении с лог-фазой и составила $4,5 \times 10^9$, что свидетельствовало о переходе культуры в фазу стационарного роста. Начиная с 6-х сут культивирования наблюдали заметное снижение бактериальной массы, что указывало на наступление фазы гибели.

Таким образом, результаты данного опыта наглядно продемонстрировали, как микоплазма проходит все 4 фазы роста при безопорном методе культивирования. Максимальное накопление клеток в единице объема наблюдали на 4-е сут культивирования в фазе экспоненциального роста, продолжительность которой для исследуемого штамма составила 48 ч.

Оптимальные значения водородного показателя среды для размножения *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* штамма «МА-ВНИИВВиМ» лежат в диапазоне от 7,8 до 8,0. При культивировании в колбах отмечено изменение уровня pH в зависимости от наступающей фазы роста. В первые 2 сут кислотность среды соответствовала исходной величине pH приготовленной среды культивирования, равной 8,0. На третьи – четвертые сутки уровень pH составил 7,8. При наступлении новой фазы культивирования происходило постепенное снижение значения водородного показателя, свидетельствующее об активном приросте биомассы. На 5–6-е сут уровень pH варьировал от 7,7 до 7,5, это связано с накоплением продуктов жизнедеятельности бактерии, снижением необходимых питательных веществ для роста микроорганизма, что, в свою очередь, оказало влияние на рост культуры.

Таким образом, в процессе культивирования микоплазмы, в зависимости от фазы роста бактерии, происходит изменение концентрации водородных ионов в среде культивирования.

Выбранные параметры выращивания в колбах (степень заполнения, доза инфицирования, длительность культивирования, скорость перемешивания) были применены для размножения в реакторе 5-литрового объема. При культивировании особое внимание уделяли барботированию, так как в питательной среде содержался высокий процент сыворотки, что могло вызвать образование пены. Результаты изучения динамики накопления микробных клеток представлены в таблице.



Рис. 1. Динамика роста популяции микоплазмы при культивировании во взвеси

Fig. 1. Dynamics of mycoplasma population growth at suspension cultivation

Таблица

Накопление микоплазмы вакцинного штамма «МА-ВНИИВВиМ» в ферментере

Table

Accumulation of mycoplasma vaccine strain "MA-VNIIVViM" in the fermenter

	Время культивирования (сут)			
	0	2	3	4
Активность (НВЧ)	$9,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$9,5 \times 10^8$	$2,8 \times 10^9$

НВЧ – наиболее вероятное число в единице объема.

MPN – most probable number.

Как видим, в ферментере прослеживаются все стадии роста бактерии, как и при культивировании на шейкере в колбах. На 4-е сут культивирования отмечали высокое накопление микоплазмы – $2,8 \times 10^9$ клеток в единице объема. Продолжительность фазы экспоненциального роста в реакторе также составила 48 ч, и накопление биомассы было равноценным.

Таким образом, метод глубинного культивирования можно использовать на этапе наработки бактерии в технологии изготовления вакцины против контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота.

Для визуализации микоплазмы, полученной при культивировании глубинным способом, осуществляли посев испытуемого образца на твердую питательную среду. На 5-е сут культивирования при микроскопии хорошо видны выросшие колонии микоплазмы. В поле зрения наблюдали как единичные колонии, так и их скопление (рис. 2).

Колонии имели правильную округлую форму, напоминающую блюдце, с желтоватого цвета сердцевинкой и прозрачно-сероватыми краями (рис. 3). Были колонии, которые находились в стадии деления путем почкования (рис. 4).

Таким образом, при глубинном культивировании была получена биомасса с высокой степенью накопления, при высеве на плотную питательную среду колонии микоплазмы имели характерный внешний вид личинки-глазуньи.

Бактерии, в частности микоплазмы, подобно перевиваемым культурам клеток, выращиваются суспензионным методом и проходят все фазы цикла роста [19]. Микоплазмы культивируются довольно продолжительное

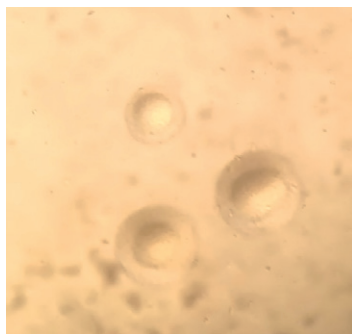


Рис. 2. Колонии микоплазмы

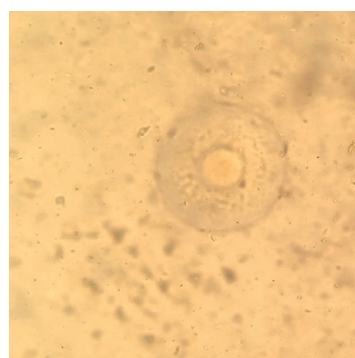
Fig. 2. *Mycoplasma* colonies

Рис. 3. Сердцевина колонии

Fig. 3. Colony center

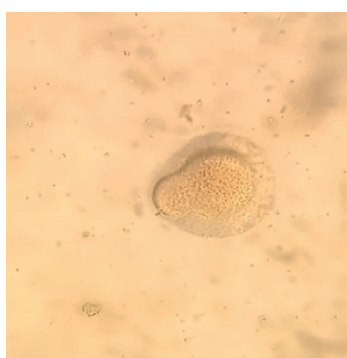


Рис. 4. Колония в процессе деления

Fig. 4. Colony in the process of replication

время, в отличие от других бактерий, у которых весь этот процесс может занимать 18 ч, например у сальмонелл [20].

При культивировании микоплазмы во взвешенном состоянии довольно ярко показан процесс роста как при использовании шейкера, так и в ферментере. Все 4 стадии имели определенный промежуток времени. Определено, что в лаг-фазе наблюдали потерю бактериальной массы на один порядок, и она длилась 2 сут. Экспоненциальная, или лог-фаза, продолжалась также 2 сут, в отличие от других бактерий, у которых она длится от нескольких минут до суток. Например, при культивировании сальмонелл она равна 20–30 мин, кишечной палочки – 15–17 мин, стафилококков – 25–35 мин, туберкулезной палочки – 19–20 ч [19]. Стационарная фаза, при которой наблюдали равновесное состояние между ростом и гибелью бактерии, длилась одни сутки, и далее наступала фаза гибели.

Использование в работе биореактора при выращивании микоплазмы позволило автоматизировать основные параметры культивирования: температуру, перемешивание жидкой и воздушной фазы. За счет непрерывного процесса перемешивания все компоненты, входящие в состав среды, а также микробные клетки равномерно распределялись по всему рабочему объему ферментера, что позволило получить однородную бактериальную массу [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали результаты исследований, возможно использовать метод глубинного культивирования для получения биомассы микоплазмы. При таких параметрах культивирования, как засев микоплазмы в дозе

10^5 микробных клеток в единице объема, объем заполнения на 2/3, температура инкубирования ($37 \pm 0,5$) °C, перемешивание жидкости при 90 об/мин, а также при использовании синтетической питательной среды в стадии логарифмического роста бактерия накапливается в титре 10^9 клеток в единице объема.

Установлено, что при безопорном культивировании рост вакцинного штамма «МА-ВНИИВВиМ» *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* при прохождении 4 фаз цикла подчиняется классическим закономерностям. Продолжительность экспоненциальной фазы роста составила 48 ч. При данном способе выращивания штамм сохранял характерные для микоплазм признаки роста: ярко выраженную опалесценцию в жидкой синтетической питательной среде и развитие выраженной картины «яичницы-глазуньи» при высеве на твердую синтетическую питательную среду.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Медведев А. П., Вербицкий А. А. Основы получения противобактериальных вакцин и сывороток: монография. Витебск: ВГАВМ; 2010. 196 с.
2. Фирсова М. С., Евграфова В. А., Потехин А. В. Подбор питательной среды и оптимизация режима глубинного культивирования *Avibacterium paragallinarum*. *Ветеринария сегодня*. 2019; (2): 12–16. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-12-16.
3. Шенелев И. А., Волох О. А., Еремичев С. А., Авдеева Н. Г., Кузнецова Е. М. Способ получения биомассы туляремиального микроба. Патент № 2451743 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/00 (2006.01). «РосНИПЧИ «Микроб». № 2010131275/10. Заявл. 26.07.2010. Оpubл. 27.05.2012. Бюл. № 15. Режим доступа: <https://patentimages.storage.googleapis.com/27/d7/d2/cc31eed5004cbb/RU2451743C2.pdf>.
4. Лиморенко А. П. Разработка технологии глубинного способа культивирования микроорганизмов *B. subtilis* и *B. licheniformis* для производства пробиотиков: дис. ... канд. биол. наук. М.; 2002. 149 с.
5. Панкратова Н. А., Табакова Д. А., Гусева Е. В. Исследование процесса культивирования *E. coli* в реакторе периодического действия. *Успехи в химии и химической технологии*. 2017; 31 (9): 32–33. EBN: ZTMGJD.
6. Bonnet M., Lagier J. C., Raoult D., Khelaifa S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 2019; 34:100622. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100622.
7. March J. B., Clark J., Brodrie M. Characterization of strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type isolated from recent outbreaks of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana and Tanzania: evidence for a new biotype. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (4): 1419–1425. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1419-1425.2000.
8. Козлов Д. А., Волков М. С., Черняева Т. Ю., Сорокина М. И., Ирза В. Н. Влияние сыворотки крови крупного рогатого скота на ростовые свойства питательной среды для культивирования *Mycoplasma gallisepticum* и *Mycoplasma synoviae*. *Ветеринария сегодня*. 2022; 11 (2): 156–162. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-156-162.
9. Орлова С. Т., Сидорчук А. А., Гребенникова Т. В. Культивирование микоплазм – ретроспектива и перспективы. *Российский ветеринарный журнал*. 2018; (5): 6–13. DOI: 10.32416/article_5d1caf6645a4b1.87344381.
10. Суханова С. М., Бердникова З. Е., Тихонова А. С. Совершенствование методики оценки качества питательной среды для выявления микоплазм. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2019; 19 (3): 161–168. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168.
11. Бессарабов Б. Ф., Вашутин А. А., Воронин Е. С. и др. Инфекционные болезни животных. Под ред. А. А. Сидорчука. М.: КолосС; 2007. 671 с.
12. Amanfu W. Contagious bovine pleuropneumonia (lung sickness) in Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2009; 76 (1): 13–17. DOI: 10.4102/ojvr.v76i1.55.
13. Di Teodoro G., Marruchella G., Di Provvido A., D'Angelo A. R., Orsini G., Di Giuseppe P., et al. Contagious bovine pleuropneumonia: a comprehensive overview. *Vet. Pathol.* 2020; 57 (4): 476–489. DOI: 10.1177/0300985820921818.
14. Karimuribo E. D., Kambarage D. M., Lema B., Kazwala R. R., Mtambo M. M. A., Kusiluka L. J. M. Factors influencing the effective control of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) in Tanzania. *Tanzania Veterinary Journal*. 1997; 17 (3): 195–206.
15. Tambi N. E., Maina W. O., Ndi C. L. An estimation of the economic impact of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Rev. Sci. Tech.* 2006; 25 (3): 999–1011. DOI: 10.20506/rst.25.3.1710.

16. Alhaji N. B., Ankeli P. I., Ikpa L. T., Babalobi O. O. Contagious bovine pleuropneumonia: challenges and prospects regarding diagnosis and control strategies in Africa. *Veterinary Medicine: Research and Reports*. 2020; 11: 71–85. DOI: 10.2147/VMRR.S180025.

17. Пискунов А. В., Кононов А. В., Мищенко А. В. Проблема контагиозной плевропневмонии крупного рогатого скота. *Ветеринария сегодня*. 2016; (3): 27–36.

18. WOA. Infection with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia). Chapter 11.5. Режим доступа: https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_mycoplasma_mycoides.htm.

19. Сергеев В. А. Репродукция и выращивание вирусов животных. М.: Колос; 1976. 303 с.

20. Медведев А. П., Вербицкий А. А., Асташонков Ю. О., Огурцова К. А. Динамика накопления биомассы сальмонелл при их глубинном культивировании. *Ветеринарный журнал Беларуси*. 2018; 1 (8): 9–11. Режим доступа: <https://repo.vsvam.by/bitstream/123456789/5113/1/j-2018-1-9-11.pdf>.

21. Самуйленко А. Я., Рубан Е. А. Основы технологии производства ветеринарных биологических препаратов: в 2 т. М.: ВНИТИБП; 2000. 782 с.

REFERENCES

1. Medvedev A. P., Verbitsky A. A. Basics of antibacterial vaccine and serum production: monograph. Vitebsk: VSAVM; 2010. 196 p. (in Russ.)

2. Firsova M. S., Yevgrafova V. A., Potekhin A. V. Nutrient medium selection and optimization of *Avibacterium paragallinarum* deep culture method. *Veterinary Science Today*. 2019; (2): 12–16. DOI: 10.29326/2304-196X-2019-2-29-12-16.

3. Shepelev I. A., Volokh O. A., Eremin S. A., Avdeeva N. G., Kuznetsova E. M. Method of producing tularemia microbe biomass. Patent No. 2451743 Russian Federation, Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/00 (2006.01). "RosNIPChl "Mikrob". No. 2010131275/10. Date of filing: 26.07.2010. Date of publication: 27.05.2012. Bull. No. 15. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/27/d7/d2/cc31eed5004cbb/RU2451743C2.pdf>. (in Russ.)

4. Limorenko A. P. Development of *B. subtilis* and *B. licheniformis* submerged cultivation technique for production of probiotics: Author's Thesis for degree of Candidate of Science (Biology). Moscow; 2002. 149 p. (in Russ.)

5. Pankratova N. A., Tabakova D. A., Guseva E. V. Investigation of *E. coli* cultivation in batch bioreactor. *Advances in Chemistry and Chemical Technology*. 2017; 31 (9): 32–33. EDN: ZTMGJD. (in Russ.)

6. Bonnet M., Lagier J. C., Raoult D., Khelaifia S. Bacterial culture through selective and non-selective conditions: the evolution of culture media in clinical microbiology. *New Microbes New Infect.* 2019; 34:100622. DOI: 10.1016/j.nmni.2019.100622.

7. March J. B., Clark J., Brodli M. Characterization of strains of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony type isolated from recent outbreaks of contagious bovine pleuropneumonia in Botswana and Tanzania: evidence for a new biotype. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38 (4): 1419–1425. DOI: 10.1128/JCM.38.4.1419-1425.2000.

8. Kozlov D. A., Volkov M. S., Chernyayeva T. Yu., Sorokina M. I., Irza V. N. Influence of bovine blood serum on growth properties of nutrient media for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* cultivation. *Veterinary Science Today*. 2022; 11 (2): 156–162. DOI: 10.29326/2304-196X-2022-11-2-156-162.

9. Orlova S. T., Sidorchuk A. A., Grebennikova T. V. Cultivation of mycoplasmas – a retrospective and prospects. *Russian veterinary journal*. 2018; (5): 6–13. DOI: 10.32416/article_5d1caf6645a4b1.87344381. (in Russ.)

10. Sukhanova S. M., Berdnikova Z. E., Tikhonova A. S. Ways to improve quality control of culture medium used for *Mycoplasma* detection. *Biopreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2019; 19 (3): 161–168. DOI: 10.30895/2221-996X-2019-19-3-161-168. (in Russ.)

11. Bessarabov B. F., Vashutin A. A., Voronin Ye. S., et al. Infectious animal diseases. Ed. by A. A. Sidorchuk. Moscow: Kolos; 2007. 671 p. (in Russ.)

12. Amanfu W. Contagious bovine pleuropneumonia (lung sickness) in Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2009; 76 (1): 13–17. DOI: 10.4102/ojvr.v76i1.55.

13. Di Teodoro G., Marruchella G., Di Provvido A., D'Angelo A. R., Orsini G., Di Giuseppe P., et al. Contagious bovine pleuropneumonia: a comprehensive overview. *Vet. Pathol.* 2020; 57 (4): 476–489. DOI: 10.1177/0300985820921818.

14. Karimuribo E. D., Kambarage D. M., Lema B., Kazwala R. R., Mtambo M. M. A., Kusiluka L. J. M. Factors influencing the effective control of contagious bovine pleuropneumonia (CBPP) in Tanzania. *Tanzania Veterinary Journal*. 1997; 17 (3): 195–206.

15. Tambi N. E., Maina W. O., Ndi C. An estimation of the economic impact of contagious bovine pleuropneumonia in Africa. *Rev. Sci. Tech.* 2006; 25 (3): 999–1011. DOI: 10.20506/rst.25.3.1710.

16. Alhaji N. B., Ankeli P. I., Ikpa L. T., Babalobi O. O. Contagious bovine pleuropneumonia: challenges and prospects regarding diagnosis and control strategies in Africa. *Vet. Med (Auckl.)*. 2020; 11: 71–85. DOI: 10.2147/VMRR.S180025.

17. Piskunov A. V., Kononov A. V., Mischenko A. V. Problem of contagious bovine pleuropneumonia. *Veterinary Science Today*. 2016; (3): 27–36. (in Russ.)

18. WOA. Infection with *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC (contagious bovine pleuropneumonia). Chapter 11.5. Available at: https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_mycoplasma_mycoides.htm.

19. Sergeev V. A. Reproduction and cultivation of animal viruses. Moscow: Kolos; 1976. 303 p. (in Russ.)

20. Medvedev A. P., Viarbitski A. A., Astaschonok Y. O., Ogurchova K. A. The dynamics of *Salmonella* accumulation during in-depth cultivation. *Veterinarnyi zhurnal Belarusi*. 2018; 1 (8): 9–11. Available at: <https://repo.vsvam.by/bitstream/123456789/5113/1/j-2018-1-9-11.pdf>. (in Russ.)

21. Samuylenko A. Ya., Ruban E. A. Basics of veterinary biologicals production technology: in 2 vol. Moscow: VNITIBP; 2000. 782 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 02.12.2022

Поступила после рецензирования / Revised 25.01.2023

Принята к публикации / Accepted 09.03.2023

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРЕ / INFORMATION ABOUT THE AUTHOR

Лаптева Оксана Георгиевна, кандидат ветеринарных наук, старший научный сотрудник лаборатории «Лекарственные средства для животных» ФГБНУ ФИЦВиМ, пос. Вольгинский, Владимирская обл., Россия;
<https://orcid.org/0000-0002-4435-8368>,
e-mail: oksana-lapteva@rambler.ru.

Oksana G. Lapteva, Candidate of Science (Veterinary Medicine), Senior Researcher, Laboratory for Veterinary Medicinal Products, FRCVM, Volginsky, Vladimir Oblast, Russia;
<https://orcid.org/0000-0002-4435-8368>,
e-mail: oksana-lapteva@rambler.ru.