

Висновки.

1. Відпрацьовано та адаптовано методику виявлення генетичного матеріалу *B. ovis* за допомогою ПЛР на панелі зразків ДНК, отриманих з різних ізолятів збудника інфекційного епідидиміту баранів, а також одного штаму *B. abortus*. Встановлено високу видоспецифічність використаної методики по відношенню до *B. ovis*, при чому чутливість тесту у цих дослідах дорівнювала 10^9 м.к./см³.

2. При дослідженні зразків клінічного матеріалу від баранів-плідників за допомогою модифікованої методики ДНК *B. ovis* виявили у зразках еякуляту від серопозитивних тварин. Зразки ДНК, отримані з проб придатку сім'яника баранів-плідників, не містили генетичний матеріал бруцел.

3. Результати проведених досліджень свідчать про перспективність застосування ПЛР у системі діагностики інфекційного епідидиміту баранів, а також при контролюванні баранів-плідників.

Список літератури

1. Бабкин, А.Ф. Серологическая идентификация культур возбудителя инфекционного эпидидимита баранов – *Brucella ovis* / А.Ф. Бабкин, Н.И. Галищев и С.В. Мелихов // Пробл. зооинженерии та вет. медицины: Матеріали 5-го з'їзду паразитологів України (м. Харків, 5-6 квітня 2001 р.): 36. наук. праць / ХЗВІ. – Х., 2001. – С. 68-69. 2. Бабкин, А.Ф. RS-форми бруцелл как индикатор антигенной неоднородности штаммов возбудителя инфекционного эпидидимита баранов *Brucella ovis* / А.Ф. Бабкин и С.В. Мелихов // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 82. – С. 63-66. 3. Настанова по діагностиці бруцельозу тварин. – Державний департамент ветеринарної медицини, К., – 1998. – 59 с. 4. Office international epizootical Terrestrial Code [E. source] // 18th Edition, 2009, Спосіб доступу URL: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.07.09_OVINE_EPID.pdf – Title from the screen. 5. Kulakov, Y.K. Identification of genetic markers in *Brucella* strains circulating in Russia for use in molecular epidemiology / Y.K. Kulakov, M.M. Zheludkov, O.D. Sklyarov // Mat. Intern. Confer. Brucellosis 2008, UK. – London. – 2008. – P.67. 6. Xavier, M.N. Development and evaluation of a specific PCR test for detection of *Brucella ovis* in semen, urine and blood samples. / M.N. Xavier, T.A. Paixão, A.M.G. Gouveia et al. // Mat. Intern. Confer. Brucellosis 2008, UK. – London. – 2008. – 184 p. 7. Almendra, C. Development and validation of a quantitative PCR test to detect *Brucella* spp in non-invasive fecal and urine samples / C. Almendra, A. Beja-Pereira, A.C. Ferreira // Mat. Intern. Confer. Brucellosis 2008, UK. – London. – 2008. – 187 p. 8. Bricker, B.J. Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. / B.J. Bricker, S.M. Halling // J. Clin Microbiol. – 1994. – №32(11) – P.2660-2666.

DIAGNOSTIC ASPECTS AND DIRECTIONS OF POLYMERASE CHAIN REACTION USING FOR THE *BRUCELLA OVIS* GENOME DETECTION IN BIOMATERIALS

Stegniy B.T., Babkin A.F., Gerilovych A.P., Bolotin V.I., Raiko D.Yu.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

Symonenko S.I.

Kharkiv State Zooveterinary Academy

This work is dedicated to improving the diagnosis of infectious epididymitis of rams by the use of molecular-genetic methods for studying the clinical material from animals, as well as cultures of Brucella. It was selected and adapted the method of insertion element amplification with the length 976 bp, optimized reaction protocol and selected components of the reaction composition. As the results the DNA B. ovis was detected in samples of semen from seropositive rams, but the samples of the epididymitis testis were free from the B. ovis genetic material.

УДК 57.043:578.71

**ТРИВАЛЕ ЗБЕРІГАННЯ ВІРУСІВ ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР
У БІОТЕХНОЛОГІЇ ВИРОБНИЦТВА ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ПРЕПАРАТІВ**

Стегній М.Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

На цей час одним з найбільш надійних методів, що забезпечують довгострокове зберігання біологічних об'єктів, є криоконсервування. Його успіх залежить від низки факторів: виду біологічного об'єкту, концентрації біологічного матеріалу в суспензії, режимів криоконсервування, складу середовища консервування, типу й концентрації криопротектора тощо. Одним з найбільш широко використовуваних методів, що забезпечують довгострокове зберігання біологічних об'єктів, є криоконсервування та зберігання їх у рідкому азоті. Застосування криопротекторів дозволяє знизити ушкоджуючу дію фізико-хімічних факторів при криоконсервуванні. Проте, як свідчать численні дані, більшість криопротекторів є токсичними для біологічних об'єктів, що потребує або сконструювати склад середовища з мінімальною токсичністю, або підібрати оптимальні режими охолодження та відтавання без використання криопротекторів з наступним оптимальним режимом тривалого зберігання для довгочасного збереження їх вихідних властивостей.

Збереження вихідної антигенної структури і стабілізація біологічних властивостей вірусів дуже важливі як елемент біотехнології виробництва засобів специфічної профілактики та діагностики грипу птиці, ньюкаслської хвороби пазух, а також актуальних адено- та ротавірусних інфекцій людини з одного боку, та для збереження колекційних штамів цих захворювань – з іншого. Безперервне культивування вірусних штамів у лабораторних умовах являє трудомісткий, економічно не вигідний процес, який нерідко призводить до зміни їхньої антигенної структури й біологічних властивостей. Отже мета досліджень – вивчення збереженості вірусів, підданих криоконсервуванню, та розробка на цій основі оптимальних режимів їхнього довгострокового зберігання є важливим елементом біотехнології виробництва імунобіологічних препаратів.

Матеріали і методи досліджень. У проведених дослідженнях вивчалась збереженість вихідних властивостей вірусу високопатогенного грипу (ВГП) штам «А/курка/Сиваш/02/05(Н5N1)». Для чого вірусмішучу екстраембріональну рідину після проведення 5 пасажів на SPF курячих ембріонах розфасували в криопробірки ємністю 1,8 мл фірми «Nunc» (Данія) і криоконсервували за температур мінус 20 °С та мінус 70 °С. Іншу частину екстраембріональної рідини в таких же пробірках заморожували шляхом прямого занурення в рідкий азот (мінус 196 °С) зі швидкістю 300-400° за хвилину. Розморозування зразків здійснювали на водяній бані за температури 39 °С протягом 2 хвилин.

Інфекційну активність визначали титруванням вірусу на 9-10 добових курячих ембріонах за стандартною методикою. Розрахунок титру вели за Рідом й Менчем. Стандартне відхилення титру розраховували згідно з формулою Піцці. Гемаглютинуючу активність визначали у РГА з 1 % суспензією еритроцитів півня за загальноприйнятою методикою [4].

Розділ 2. Загальні питання та новітні методи в біотехнології

Імуногенність вірусу вивчали за рівнем титру антитіл у курчат 45-добового віку, яким був уведений інактивованим препарат, виготовлений з матрової розплодки, що зберігався при мінус 20 °С протягом 115, 210 діб. Рівень антитіл досліджували в РЗГА через 14 діб після введення імуногену за загально прийнятою методикою [2, 4].

Вірус грипу птиці штаму «А/Сиваш/02/05(Н5N1)» культивували на 10 добових ВСП-курячих ембріонах протягом 48 часів. Ембріони заражали нативним та кріоконсервованим вірусомісним матеріалом в умовах температур мінус 20 °С, мінус 70 °С протягом 25; 210 та 350 діб в алантоїсну порожнину в об'ємі 0,2 см³ (500 LD₅₀).

Після загибелі курячих ембріонів були проведені електронно-мікроскопічні дослідження екстраембріональної рідини, а також хоріоналантаїсної оболонки, мозку та печінки ембріонів. Для вивчення морфології вірусу грипу птиці Н5N1 нами були використані методи негативного контрастування препаратів, виготовлених з екстраембріональної рідини.

Польовий ізолят вірусу ньюкаслської хвороби «ІФ-07» виділили співробітники відділу вивчення хвороб птиці ННЦ «ІЕКВМ» 30.03.07 з головного мозку хворого курчати 26-добового віку з присадибного господарства Івано-Франківської області. Ізолят був культивований на 9-добових ембріонах курей упродовж 5-ти пасажів. Виділений збудник ньюкаслської хвороби планується використовувати в якості контрольного штаму для вивчення імуногенності відповідних вакцин, оскільки він є епізоотично актуальним для українського птахівництва. Кріоконсервування здійснювали за температури мінус 20 °С, мінус 70 °С та мінус 196 °С. Розморожували зразки вірусів повільно в умовах кімнатної температури.

Ротавірус (РВ) мавп, родинний ротавірус людини (штам SA-11) і аденовірус людини 3 серотипу отримано з колекції завідувача лабораторії вірусології Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМН України професора Панченко Л.О. Неочищений від клітинного детриту РВ зберігався в умовах холодильника за температури мінус 20 °С з 08.06. 1988 року. Антигенна структура РВ мавп подібна до структури ротавірусу людини, тому еталонний штам SA-11 застосовують для діагностики ротавірусних інфекцій і в людини [5].

Аденовірус людини 3 серотипу, виділений із тканин мигдаликів хворого на хронічний тонзиліт у 1978 році отримано з Інституту вірусології РАН РФ (Москва). В Інституті мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова АМНУ він зберігався неочищеним від клітинного детриту у кріоконсервованому стані за температури мінус 20 °С з 03.01.1994 року.

Розморожування досліджених зразків вірусів здійснювали повільно в умовах кімнатної температури. Потім розмороженим РВ штамом SA-11 інфікували перещеплювану культуру клітини нирки ембріона свині (СНЕМ) і клітинну культуру нирки зеленої мавпи (Vero) за стандартною методикою. Клітини культивувалися на суміші середовищ 199 (70 %), Ігла (30 %), 10 % інактивованої за температури 56 °С упродовж 30 хв. сироватці крові великої рогатої худоби. Після зараження ротавірусом до культури клітин вносили підтримуюче середовище з додаванням 0,25 % розчину трипсину [5].

Розмороженим аденовірусом заражали моношарову перещеплювану культуру клітин нирки зеленої мавпи (Vero) і культивували за стандартною методикою. Іншу частину розмороженого вірусного матеріалу піддавали дослідженню в полімеразній ланцюговій реакції (ПЛР). Дослідження проводилися на базі лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ». Досліджено 6 проб культуральної біомаси РВ штаму SA-11. При цьому екстракція сумарної РНК вірусу проводилася за допомогою комерційного набору «Рибо-Сорб-50» виробництва ФГУН Інституту мікробіології та епідеміології, ім. М.Ф. Гамалеї, Москва, РФ. Виділену РНК використовували в якості матриці для наробки к-ДНК.

Реакцію зворотної транскрипції проводили за допомогою комерційного набору РЕВЕРТА-Л, ампліфікацію – за допомогою комерційного набору «Амплісенс варіант 50R для ампліфікації ділянки к-ДНК довжиною 290 пар нуклеотидів ротавірусу» того ж виробництва. Після розморожування аденовірусу людини третього серотипу виділяли ДНК вірусу за допомогою вищезгаданого набору «Рибо-Сорб-50». Ампліфікацію проводили із застосуванням праймерів аденовірусу довжиною 462 пар нуклеотидів.

Аналіз продуктів ампліфікації проводили поділом фрагментів ДНК в агарозному гелі [1, 3]. Параметри електрофорезу: 120 В, 50 мА., концентрація агарози в гелі становила 1 %. Документування гелю проведено за допомогою відеосистеми Samsung.

Результати досліджень. Результати проведених досліджень показали, що інфекційна активність вірусу грипу птиці штаму «А/Сиваш/02/05(Н5N1)», кріоконсервованого в умовах побутового холодильника за температури мінус 20 °С та в умовах рідкого азоту за мінус 196 °С, що зберігався впродовж 25 діб вірогідно не відрізнялися. У той же час інфекційний титр вірусу, кріоконсервованого в умовах помірно-низької температури (мінус 20 °С) впродовж 115 та 210 діб знизився на 0,8 Іg, у порівнянні з вихідним.

Що стосується титрів гемаглютинуючої активності вірусу в РГА, вона становила 1:512 і не змінювалася під дією кріоконсервування як в умовах помірно-низької температури, так і в умовах рідкого азоту протягом 25 і 115 діб зберігання. Однак, після 350 діб зберігання в умовах мінус 20 °С гемаглютинуючі властивості вірусу втрапились. При цьому вірулентність також знизилась у порівнянні зі зразками, які зберігали за температури мінус 70 °С. Загибель курчат 90-добового віку спостерігали через 72 години після зараження вірусом, що зберігався за температури мінус 20 °С. Загибель таких же курчат спостерігали через 40-48 годин після зараження вірусом, що зберігався за температури мінус 70 °С.

Електронно-мікроскопічне дослідження вірусу ВПГ, що зберігався протягом більш ніж 18 місяців (557 діб) за температури мінус 20 °С, показало відсутність цільних віріонів в 6-ти пробах із 8 досліджених зразків. Поодинокі віріони ВПГ були виявлені тільки у двох зразках. Однак структура вивчених віріонів відрізнялася від будови нативного вірусу відсутністю паличкоподібних шпів гемаглютиніна. Показники гемаглютинуючої активності цього вірусу в РГА також дорівнювали нулю. У той же час інфекційні властивості не були втрачені вірусом повністю, хоча інфекційний титр знизився більш ніж на 3,0 Іg ELD_{50/0,2CM}³.

Вірус ВПГ, що був кріоконсервований за температури рідкого азоту як з використанням швидкого охолодження (зі швидкістю пониження температури 300-400 °С на хвилину) шляхом занурення у рідкий азот, так і шляхом поступового охолодження зі швидкістю охолодження 2 °С на хвилину до мінус 70 °С з наступним зануренням у рідкий азот, зберігали цілість віріонів в однаковому ступені. Електронно-мікроскопічним дослідженням піддавали розморожені зразки, що зберігались протягом 6-ти та більше місяців за вищенаведених умов.

Польовий ізолят вірусу ньюкаслської хвороби «ІФ-07» після другого пасажу та зберігання протягом 30 діб вірусомісної екстраембріональної рідини за температурних умов мінус 20 °С та рідкого азоту (мінус 196 °С) досліджено за допомогою електронно-мікроскопічних методів й отримано електроннограми кріоконсервованих вірусів (рис. 1-2).

Виявлено пошкодження ліпопротеїдної оболонки віріонів, кріоконсервованих в умовах мінус 20 °С.

Інфекційна активність ізоляту після 4-го пасажу становила 5,5 Іg ELD_{50/0,2CM}³ та 8,0 Іg EID_{50/0,2CM}³; ізолят був патогенним для 9-добових ембріонів курей та для 14-добових курчат. Після вивчення морфології та біологічних властивостей ізолят був депонований як штам НХ/Курка/Івано-Франківськ/58/2007.

Вивчення збереженості інфекційних властивостей кріоконсервованого в умовах температури мінус 20 °С упродовж 18 років ротавірусу мавп (РВ) показало, що проведення 3-х сліпих пасажів вірусу на клітинних культурах СНЕМ і Vero, не викликало цитопатичної дії (ЦПД) протягом всіх 3 пасажів на обох клітинних культурах за терміном одного пасажу 12 діб культивування. Електронно-мікроскопічні дослідження не виявили цільних віріонів РВ у досліджених зразках. Отримані результати свідчать про те, що в процесі тривалого зберігання в умовах помірно-низької температури відбувається руйнування віріонів і концентрація вірусу у суспензії зменшилась нижче інфікуючої дози.

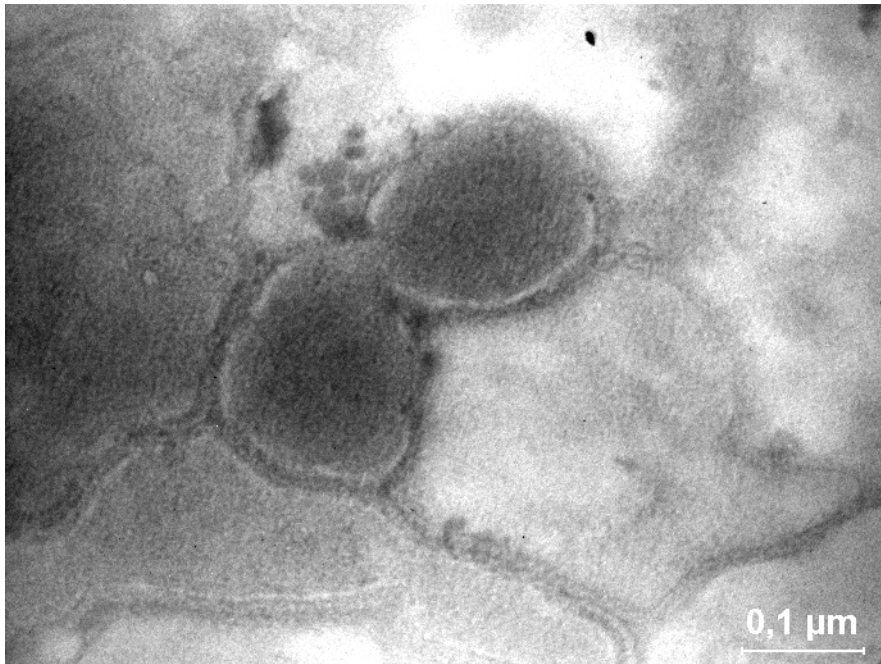


Рис. 1 Віріони ньюкаслської хвороби ізолят «ІФ-07» після зберігання протягом 30 діб в умовах рідкого азоту

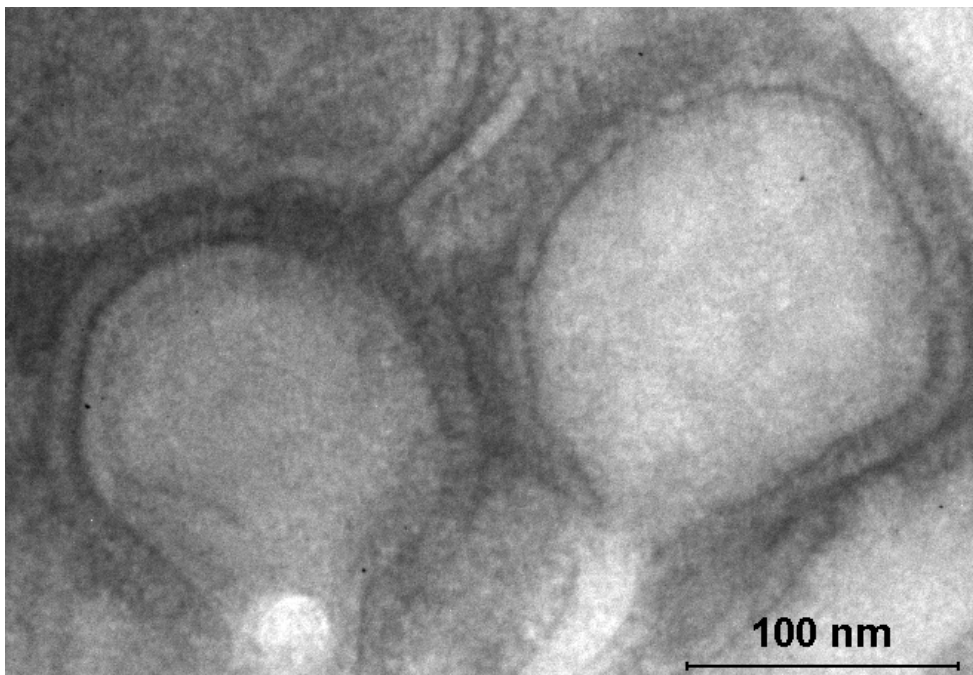


Рис. 2 Віріони ньюкаслської хвороби ізолят «ІФ-07» після зберігання протягом 30 діб в умовах мінус 20 °С. Пошкодження оболонки віріонів.

Результати молекулярно-генетичних досліджень кріоконсервованих зразків ротавірусу мавп, подібного до людського, які зберігалися за мінус 20 °С упродовж 18 років показали, що в пробах №№ 1, 2, 5 та 6 матеріалу міститься РНК ротавірусу мавп. У двох пробах ампліфікації не відбулося (проби № 3 і № 4), що свідчить про відсутність у них РНК даного вірусу.

Таким чином, наявність ділянок довжиною 290 пар нуклеотидів РНК вірусу тільки в 4 пробах з 6 досліджених свідчить про низьку концентрацію вірусу в досліджених зразках. Зниження концентрації вірусної РНК відбулося, можливо, за рахунок її деградації в процесі довгострокового зберігання протягом 18 років в умовах температури мінус 20 °С.

Що стосується інфекційних властивостей *Adenovirus type 3* (Ade 3), то при зараженні ним моношарової перещеплюваної клітинної культури Vero та наступному проведенні 3 послідовних пасажів цитопатогенна дія вірусу не спостерігалась за тривалістю одного пасажу культивування 14 діб. Електронно-мікроскопічні дослідження не виявили цільних віріонів аденовірусу в досліджених зразках. Отже, зберігання кріоконсервованого Ade 3 людини протягом 12 років в умовах помірно-низької температури – 20 °С призводить до деструкції компонентів вірусних часток, із втратою ними інфекційної активності.

При дослідженні дванадцяти культуральних зразків аденовірусу людини 3 серотипу щодо стабільності генетичних характеристик в умовах зберігання за температурним режимом мінус 20 °С упродовж 12 років тільки в пробах № 7, 9, 10 культуральної

розплодки аденовірусу людини (*Adenovirus type 3*) була виявлена ДНК аденовірусу людини 3 типу в достатній кількості для гель-детекції. У пробах №№ 1-6, 8, 11, 12 амплікони з довжиною 462 пар нуклеотидів не знайдено.

Отже, зберігання Ade 3 упродовж 12 років за температури мінус 20 °С призводить до значної деструкції ДНК, на що вказує відсутність ампліконів довжиною 462 пар нуклеотидів у 9 пробах з 12 досліджених культуральних зразків аденовірусу людини. Отримані результати свідчать, що довгострокове зберігання досліджених вірусів у вищенаведених умовах не є оптимальним.

Висновки. Кріоконсервування вірусу грипу птахів штаму «А/курка/Сиваш/02/05(Н5N1)» в умовах помірно-низької температури мінус 20 °С, мінус 70 °С і за температури рідкого азоту мінус 196 °С протягом 25 діб дозволяє зберігати такі біологічні властивості як інфекційна активність та аглютинуючі властивості на вихідному рівні. Зниження інфекційної активності на 0,8 lg спостерігалось в зразках, кріоконсервованих при мінус 20 °С, що зберігалися в даних умовах протягом 115 та 210 діб. Після зберігання вірусу протягом 7 місяців за температури мінус 70 °С та у рідкому азоті інфекційні властивості не змінилися в порівнянні з вихідними.

Результати молекулярно-генетичних та електронно-мікроскопічних досліджень кріоконсервованих зразків РВ мавп, подібно до людського, які зберігалися за мінус 20 °С упродовж 18 років показали, що в процесі тривалого зберігання в умовах помірно-низької температури відбувається руйнування віріонів і концентрація вірусу у суспензії зменшилась нижче інфікуючої дози.

Зберігання кріоконсервованого аденовірусу (Ade 3) людини протягом 12 років в умовах температури мінус 20 °С призводить до деструкції компонентів вірусних часток, з втратою ними інфекційної активності, значної деструкції ДНК, на що вказує відсутність ампліконів довжиною 462 пар нуклеотидів у 9 пробах з 12 досліджених культуральних зразків аденовірусу людини. Отримані результати свідчать, що довгострокове зберігання досліджених вірусів РВ та Ade 3 у вищенаведених умовах не є оптимальним.

Електронно-мікроскопічні дослідження вірусу ньюкаслської хвороби ізоляту «ІФ-07», показали пошкодження ліпопротеїдної оболонки віріонів кріоконсервованих в умовах мінус 20 °С протягом 30 діб. Тому оптимальним режимом тривалого кріоконсервування вірусів є їх кріоконсервування та збереження за температури рідкого азоту (мінус 196 °С).

Список літератури

1. Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции. /Под ред. А.А.Гусева, А.Н.Панина. – Владимир: ОК НИИ и МС ВНИИЖЗ, 1998. – 519 с. 2. Микробиологические и микроскопические методы исследований в ветеринарной медицине. Справочное пособие. / А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов, В.Г. Скрыпник, Б.Т. Стегний и др.; Под ред. А.Н. Головкин. – Харьков. «НТМТ», 2007. – 512 с. 3. Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с англ./Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – М.: Мир, 1999. – 558 с. 4. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals //Edited by the OIE Biological Standards Commission. Fifth Edition, – 2004. - Vol. 1. – P. 474-485. 5. Стегний, М.Ю., Волянський, Ю.Л., Стегний, Б.Т.. Інфекційні й молекулярно-генетичні властивості кріоконсервованих штамів адено- і ротавірусів // Мікробіологічний журнал. – 2008. – 70, №4. – С. 51-56.

PROLONGED CONSERVATION OF VIRUSES AT LOW TEMPERATURES IN BIOTECHNOLOGY OF DEVELOPMENT OF IMMUNOBIOLOGICAL PREPARATIONS

Stegniy M. Yu.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine, Kharkiv

Conservation of morphology, ultrastructure and biological properties of viruses that are used in development of immunobiological preparations at different conditions of its cryoconservation is studied in the article. It was proved that the cryoconservation at the temperature of liquid nitrogen (minus 196 °C) is the most optimal regime which provides the safety of its ultrastructure and biological properties.

УДК 619:616.98:579.842.11:631

МЕТОД ГЛИБИННОГО КУЛЬТИВУВАННЯ ЕНТЕРОТОКСИГЕННИХ *ESCHERICHIA COLI*

Сухарєв Ю.С.

Харківська державна зооветеринарна академія, м. Харків

В основі більшості методів отримання ентеротоксинів лежить здатність бактерій продукувати ці речовини в оточуючий клітинний простір (екзотоксини). У зв'язку з цим, при вирощуванні токсигенних штамів в рідких поживних середовищах ентеротоксини накопичуються в культуральній рідині. Відділяючи центрифугуванням або фільтрацією бактерійні клітини від середовища культивування, отримують безклітинний супернатант що містить нативні ентеротоксини [1].

Було помічено, що штами *Escherichia coli* – продуценти термолабільного (LT) і термостабільного (ST) ентеротоксинів по різному проявляють свою здатність до синтезу того або іншого типу токсинів в рідких поживних середовищах різного складу [2].

У зв'язку з цим була поставлена мета удосконалити метод глибокого культивування токсигенних штамів *E.coli*, шляхом визначення найбільш ефективних поживних середовищ і оптимальних параметрів для токсиноутворення.

Матеріали і методи досліджень. Токсигенні штами *E. coli* O9 ST і O26 LT з колекції лабораторії хвороб молодняка ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН України. Поживне середовище Finkelstein [3]. Синтетичне поживне середовище [4].

Глибоке культивування токсигенних штамів *E. coli*, здійснювали в розробленому малогабаритному лабораторному реакторі (МЛР), схема облаштування якого показана на рис. 1.

Ентеротоксигенні штами *E. coli* O26 LT і O9 ST висівали окремо на Синтетичне поживне середовище і середовище Finkelstein, в пробірках по 10 мл і двічі пересівали впродовж 5 годин. Після повторного пасажу культури пересівали в 500 мл флакони, і інкубували при 37 °С впродовж 4-х годин, потім, з дотриманням правил асептики, цим матеріалом засівали бутлі МЛР об'ємом 10 л, причому співвідношення об'єму середовища до об'єму бутля не перевищувало 1/5, а об'єм мікробного матеріалу, що засівався, не менше 1/50 об'єму середовища. Культивування штамів проводили при 37 °С впродовж 18 годин.

Для стерилізації подаваного в культуральне середовище повітря, патрубок подання повітря мікрокомпресора МК-1 (призначеного для аерації повітря в акваріумах) сполучали за допомогою гнучкого гумового шланга, діаметром 6-8 мм, з верхнім патрубком малогабаритного фільтра Зейтца із стерилізуючою пластиною.

МК-1 підключали до джерела електричного струму 220 В, і уся система поміщалася в термостат при 37 °С на 18 годин. Необхідний режим аерації підтримували за допомогою регулятора, що знаходиться на тильній стороні мікрокомпресора. Через зливний патрубок скляної ємності, кожні дві години, відбирали проби мікробної суспензії і визначали рівень накопичення бактерійних клітин за оптичним стандартом каламутності.