View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Directory of Open Access Journals

УДК 616.932: 576.809.33

И.М. Жулидов, М.В. Антонычева, О.А. Лобовикова, Е.Г. Абрамова, А.К. Никифоров, И.В. Шульгина, Л.В. Зайцева, Н.П. Миронова, Н.И. Вахрушина, С.В. Астафьева, В.И. Павлова, В.С. Бронникова, О.А. Волох, Н.Г. Авдеева, Г.В. Базлов, А.В. Комиссаров

НОВАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА НА ОСНОВЕ СУХОГО ГИДРОЛИЗАТА ФИБРИНА ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов)

Представлены данные по исследованию биологических показателей экспериментальных плотных и жидких питательных сред на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина из отхода производства антирабического иммуноглобулина. Сконструированные питательные среды соответствуют требованиям нормативной документации и не уступают по качественным характеристикам контрольным. Предлагаемые среды могут быть использованы для культивирования холерных вибрионов, в том числе глубинного, при производстве холерных профилактических и диагностических препаратов.

Ключевые слова: *фибрин, питательная среда, холерный вибрион*

NEW NUTRIENT MEDIUM ON THE BASIS OF DRY FIBRIN HYDROLYSATE FOR *V. CHOLERAE* CULTIVATION

I.M. Zhulidov, M.V. Antonycheva, O.A. Lobovikova, E.G. Abramova, A.K. Nikiforov, I.V. Shulgina, L.V. Zaitseva, N.P. Mironova, N.I. Vakhrushina, S.V. Astafieva, V.I. Pavlova, V.S. Bronnikova, O.A. Volokh, N.G. Avdeyeva, G.V. Bazlov, A.V. Komissarov

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov

The data on exploration of biological properties of experimental solid and liquid media on the basis of dry enzymatic hydrolysate of fibrinobtained from production waste of anti-rabies immunoglobulin is presened here. The culture media engineered meets the requirements of normative documents and is highly competitive with the test medium in their qualitative characteristics. Suggested media can be used for V. cholerae cultivation, including submerged cultivation, in production of cholera preventive and diagnostic preparations.

Key words: *fibrin, nutrient medium, V. cholerae*

ВВЕДЕНИЕ

Создание эффективных противохолерных вакцин продолжает оставаться актуальной научной проблемой, в связи с этим выбор питательной среды (ПС) для глубинного культивирования холерных вибрионов является одним из важных факторов для решения данной биотехнологической задачи [4, 8].

Для глубинного культивирования производственных штаммов *Vibrio cholerae* применяют ПС из дорогостоящего сырья на основе мяса крупного рогатого скота (КРС) и казеина. Однако практика показывает, что при использовании традиционных сред все чаще возникают серьезные затруднения, связанные с получением бактериальной массы, необходимой для производства медицинских иммунобиологических препаратов. Не исключено, что проблемы, связанные с качеством ПС, обусловлены снижением качества сырья природного происхождения, в том числе в связи со сложной экологической обстановкой и антропогенным воздействием на окружающую среду. В частности, в мясных и молочных продуктах могут содержаться антибиотики, химикаты, нитраты, токсические продукты, что отрицательно отражается на производственном процессе культивирования штаммов [1]. Вышеизложенное диктует необходимость конструирования ПС на основе непищевого, экономичного вида сырья [3, 5, 6].

В производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина (АИГ) при получении сыворотки из иммунной плазмы крови лошадей побочным продуктом является ценный белок – фибрин, который вполне может быть применим для изготовления питательных основ сред для культивирования микроорганизмов [2, 7].

Целью настоящей работы явилась оценка качества разработанной для культивирования холерного вибриона питательной среды на основе сухого гидролизата фибрина, полученного из отхода производства АИГ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибрин отделяли на этапе дефибринации иммунной антирабической плазмы крови лошадей. Для получения ферментативного гидролизата фибрина (ФГФ) использовали панкреатическую железу КРС (ГОСТ 112-85-93). Концентрирование жидкого гидролизата фибрина проводили на аппарате УВВ-50 с последующей сушкой на установке распылительного типа КЯУЛ 101325.002.

Для приготовления экспериментальных ПС для культивирования холерных вибрионов использовали сухой ФГФ.

Для исследования биологических показателей экспериментальных ПС использовали полученные из Государственной коллекции патогенных бакте-

рий РосНИПЧИ «Микроб» тест-штамм *V. cholerae* O1 P-1 (145) классического биовара серовара Огава и применяемые в производстве холерной вакцины штаммы: *V. cholerae* M-41 классического биовара серовара Огава, *V. cholerae* 569 B классического биовара серовара Инаба.

В качестве контрольных ПС использовали традиционно применяемые плотную среду по Хоттингеру и 1% пептонную воду, имеющие соответственную для культивирования холерного вибриона реакцию (7,7 ± 0,1).

Определение физических свойств, химического состава и биологических показателей экспериментальной питательный основы и сконструированных сред проводили в соответствии с методиками, изложенными в МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» и МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред». Определяли цветность, прозрачность среды и биологические показатели качества ПС — чувствительность, скорость роста, показатель прорастания, стабильность морфологических, биохимических, фаголизабельных и серологических свойств штаммов холерного вибриона.

Для исследования биологических показателей плотных экспериментальных ПС готовили взвесь 3—5-часовой культуры тест-штамм *V. cholerae* O1 P-1 (145) по стандартному образцу мутности ОСО 42-08-86П ФГБУ «НЦ ЭСМП», эквивалентного $1{,}1 \times 10^9$ м.к./мл, и разводили до 10^{-6} (10^3 м.к./мл) и 10^{-7} (10^2 м.к./мл), высевая в объеме 0,1 мл на 3 свежеприготовленные агаровые пластинки в чашки Петри с испытуемыми и контрольной средами. Посевы инкубировали при температуре (37 ± 1) °С в течение 12 ч. Плотные ПС считали пригодными, если на них вырастали типичные по морфологии колонии диаметром не менее 1 мм, в количестве не менее 30 % от расчетной посевной дозы 100 м.к., при наличии единичных колоний на 3 чашках Петри с посевной дозой 10 м.к. Экспериментальные жидкие накопительные ПС считали пригодными, если после 6 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С в контролируемой жидкой среде при пересеве на агаровые пластинки петлей № 5, число колоний культуры тест-штамма, выросших после накопления при посевном числе 100 м.к., составило не менее 10; при посевном числе 10 м.к. — не менее 1.

Расчет вели по среднему числу колоний на 3 чашках с одной посевной дозой.

Для контроля стабильности морфологических, биохимических, фаголизабельных свойств тест-штамма *V. cholerae* O1 P-1 (145), после выращивания культуры на исследуемых плотных средах просматривали колонии на атипичность роста и отбирали по 3 колонии для посева на среды с углеводами (манноза, сахароза, арабиноза), ставили пробу с холерными бактериофагами классическим и эльтор методом стерильного пятна.

Для определения показателя эффективности плотных и жидких питательных сред на основе ФГФ использовали штаммы *V. cholerae* M-41 и *V. cholerae* 569 B. При контроле плотных ПС, разлитых в пробирки по 5 мл, посевная доза культуры тест-штамма составляла $5{,}5 \times 10^7$ м.к. Через 18 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С культуру смывали с поверхности агара 2,5 мл 0,9% раствором натрия хлорида. К 0,5 мл полученной взвеси мерно добавляли 0,9% раствор натрия хлорида до концентрации $1{,}1 \times 10^9$ м.к./мл, эквивалентной 5 единицам ОСО 42-28-86П, и рассчитывали выход биомассы с 1 мл среды.

При контроле эффективности жидких питательных сред посевная доза культуры тест-штамма составляла 10^5 м.к. и 10^6 м.к. После инкубации при температуре (37 ± 1) °С в течение 6 ч проводили инактивацию бульонной культуры при 56 °С в течение 30 мин и определяли оптическую плотность на спектрофотометре СФ-56 против образца соответствующей среды при длине волны 590 нм в кювете 5 мм. Все замеры проводили в троекратном повторе для каждой серии ПС.

Для малообъемного глубинного культивирования использовали колбу Эрленмейера и термостатируемый шейкер-инкубатор RC-TK (США).

Продукцию антигенов холерных вибрионов выявляли в РДП. Для штамма *V. cholerae* 569 B продукцию холерного токсина (ХТ) кроме РДП оценивали в ИФА с GM1-ганглиозидами и антитоксической холерной сывороткой.

Статистическую обработку результатов исследования физико-химического состава основ проводили с использованием программы «Statistica».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Фибрин является побочным продуктом переработки плазмы лошадей при производстве АИГ. По своей биологической структуре — полноценный и сбалансированный по аминокислотному составу глобулярный белок, аминокислотный состав которого близок к таковому миозина, что дает основание для использования данного отхода производства иммуноглобулина при изготовлении белкового гидролизата — основы для ПС [2, 7].

Методом ферментативного гидролиза, используя фарш поджелудочной железы КРС, был приготовлен гидролизат фибрина. По истечении времени созревания питательной основы (5—6 мес.) проводили ее концентрирование и высушивание. Подобраны экспериментальным путем условия концентрирования и высушивания гидролизата. Концентрирование в 4—5 раз, температура греющего пара (79 ± 1) °С, температура вторичного пара (59 ± 1) °С, вакуум (0,75 ± 0,1) кгс/см^2. Конвекционное высушивание вели в псевдокипящем слое на установке КЯУЛ 101325.002 при следующих оптимальных значениях: размер фторопластовых частиц сушильной камеры (0,4 ± 0,1) см^3, температура на входе в камеру (123 ± 2) °С, температура на выходе из камеры (98 ± 2) °С, скорость расхода сырья по ротаметру (6 ± 1) л/ч, давление (0,3 ± 0,05) кгс/см^2.

Были получены 3 экспериментальные серии сухого ФГФ, по агрегатному состоянию представляющего собой мелкодисперсный порошок с нежно-желтым оттенком и белковым запахом. Физико-химические характеристики сухого ФГФ: содержание общего азота — (0,756 ± 0,031) %; аминного азота — (0,391 ± 0,031) %; процент расщепления белка — (50,7 ± 1,68) %; содержание пептона (по шкале Дифко) — (53,67 ± 1,53) %; следы белка отсутствовали; сухой остаток — (4,78 ± 0,201) %; хлориды — (0,22 ± 0,012) %; влажность — (2,4 ± 0,204) %; pH — (6,73 ± 0,22).

На основе сухого ФГФ были сконструированы жидкие и плотные ПС для культивирования холерных вибрионов с pH (7,7 ± 0,1). Кроме этого, из ФГФ были изготовлены ПС с добавкой до 1% автолизата пекарских дрожжей (АПД).

Все среды были прозрачными. Жидкие среды имели нежный соломенно-желтый цвет.

На испытуемых и контрольной средах отмечали рост холерного вибриона из разведения 10^{-7}, обеспечивающего посевную дозу 10 м.к., что свидетельствует о высокой чувствительности плотных и жидких экспериментальных сред на основе сухого ФГФ.

Показатель прорастания для плотных сред на основе ФГФ составил 97 %; для сред на основе ФГФ с добавкой АПД — 89 %; для контрольной среды — 91 %.

При культивировании на плотных испытуемых средах тест-штамма *V. cholerae* O1 P-1 (145), через 24 ч инкубации при температуре (37 ± 1) °С колонии были: гладкими, округлыми, прозрачными, голубоватыми в проходящем свете, диаметром 1,5 мм. Атипичные колонии на всех средах отсутствовали. На жидких средах через 18 — 24 ч роста при температуре (37 ± 1) °С регистрировали равномерное помутнение среды и нежную пленку на поверхности. Во всех мазках при окраске по Граму — грамотрицательные изогнутые палочки.

При исследовании биохимических свойств холерного вибриона после культивирования на экспериментальных плотных и жидких ПС зарегистрированы типичные результаты, штамм ферментировал маннозу, сахарозу и не утилизировал арабинозу.

Изучение фаголизабельности штамма *V. cholerae* O1 P-1 (145) классического биовара, инкубированного на экспериментальных средах на основе ФГФ, выявило лизис только гомологичным (классическим) фагом.

Полученные данные свидетельствуют о стабильности свойств холерного вибриона при выращивании на контролируемых плотных и жидких средах. Полученные результаты позволяют считать плотные и жидкие экспериментальные среды на основе сухого ФГФ удовлетворяющими требованиям НД.

Эффективность экспериментальных ПС была определена как по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды, так и по способности штамма холерных вибрионов продуцировать в процессе культивирования антигены (О-АГ и холерный токсин).

При определении показателя эффективности экспериментальных плотных ПС выход биомассы *V. cholerae* 569 B составил с ПС на основе ФГФ и с ПС на основе ФГФ с добавкой АПД по $9{,}24 \times 10^9$ м.к./мл; с контрольной среды — $11{,}44 \times 10^9$ м.к./мл. Выход биомассы *V. cholerae* M-41 составил: $10{,}1 \times 10^9$ м.к./мл с ПС на основе ФГФ; $11{,}66 \times 10^9$ м.к./мл с ПС на основе ФГФ с добавкой АПД; $13{,}36 \times 10^9$ м.к./мл — с контрольной среды.

Для экспериментальных жидких ПС на основе ФГФ зарегистрированы следующие показатели эффективности. При высеве культуры в количестве 10^5 м.к. и 10^6 м.к. на испытуемых средах на основе ФГФ и ФГФ с добавкой АПД выход биомассы для *V. cholerae* 569 B был одинаковым — $1{,}4 \times 10^9$ и $1{,}7 \times 10^9$ м.к./мл, соответственно; на контрольной среде соответственно — $1{,}3 \times 10^9$ и $2{,}0 \times 10^9$ м.к./мл. Для *V. cholerae* M-41 на среде из ФГФ и ФГФ с добавлением АПД соответственно — $1{,}5 \times 10^9$ и $1{,}7 \times 10^9$ м.к./мл и на контрольной среде этим показателям культуры штамма соответствовали значения накопленной биомассы — $2{,}2 \times 10^9$ и $2{,}5 \times 10^9$ м.к./мл. Добавление в рецептуру среды АПД до 1 % не оказало стимулирующего эффекта и показатели эффективности в этом случае соответствовали результатам, полученным со среды на монооснове ФГФ.

Для моделирования условий глубинного культивирования производственных штаммов *V. cholerae* 569 B и *V. cholerae* M-41 при производстве холерной вакцины были проведены эксперименты по малообъемному глубинному выращиванию холерных вибрионов на экспериментальных и контрольной ПС. Результаты экспериментов представлены в

Таблица 1

Результаты малообъемного глубинного культивирования штаммов V. cholerae 569 B и V. cholerae M-41

Жидкие среды	*V. cholerae* 569 B				*V. cholerae* M-41		
	Эффективность, м.к./мл	О-АГ (титр РДП)	ХТ		Эффективность, м.к./мл	О-АГ (титр РДП)	О-АГ* (титр РДП)
			титр РДП	ИФА, мкг/мл			
ФГФ	15×10^9	1/2	1/2	5,13	20×10^9	1/2	1/32
ФГФ с добавлением 1% АПД	20×10^9	1/2	1/2	5,28	16×10^9	1/2	1/16
Контроль, среда по Хоттингеру pH (7,7 ± 0,1)	17×10^9	1/2	1/2	6,13	20×10^9	1/2	1/32

Примечание:* – концентрация О-АГ (титр РДП) в формализированном безмикробном цунтрифугате.

таблице 1 «Результаты малообъемного глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* 569 В и *V. cholerae* М-41 на экспериментальных средах на основе ФГФ».

При глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* 569 В и *V. cholerae* М-41 на экспериментальных и контрольной среде получены сопоставимые результаты как по способности накапливать биомассу, так и продуцировать АГ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, представленные образцы экспериментальных плотных и жидких питательных сред, приготовленных с использованием питательной основы «Ферментативный гидролизат фибрина, сухая форма» соответствуют требованиям МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» и МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» и вполне могут быть использованы для культивирования холерных вибрионов, в том числе глубинного.

Подтверждены данные об индивидуальной чувствительности штаммов к составу ПС и необходимости дифференциального выбора питательной среды в зависимости от поставленной перед микробиологом задачи по получению целевого продукта.

Применение гидролизата фибрина, полученного из отхода производства АИГ, в качестве основы ПС расширяет ассортиментный ряд ПС, экономически целесообразно и является примером снижения экологической нагрузки на окружающую среду.

ЛИТЕРАТУРА

1. Панова Н.В. Разработка нового стимулятора роста микроорганизмов и изучение его влияния на их биологические свойства на примере некоторых вакцинных штаммов бактерий: дис. ... канд. биол. наук. — Ставрополь, 2006. — 173 с.

2. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона / М.В. Антонычева [и др.] // Патент № 2425866 РФ, МПК C12N1/20, C12R1/63; 10.08.2011, Бюл. № 22.

3. Разработка питательных сред из растительного сырья для культивирования возбудителей особо опасных инфекций / А.А. Курилова [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2009. — Вып. 3 (101). — С. 66—68.

4. Современное состояние научных исследований в области вакцинопрофилактики особо опасных бактериальных инфекций / В.В. Кутырев [и др.] // Пробл. особо опасных инф. — 2006. — Вып. 2 (92). — С. 18—24.

5. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка ее свойств / С.Ю. Калягина // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. — 2008. — № 3. — С. 91—94.

6. Султанов З.З. Разработка и усовершенствование технологий получения микробиологических питательных основ и сред : автореф. дисс. ... докт. биол. наук. — Махачкала, 2008. — 45 с.

7. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. — М.: Аграрная наука, 2000. — 296 с.

8. Kabir S. Cholera vaccines: the current status and problems // Rev. Med. Microbiol. — 2005. — Vol. 16. — P. 101—116.

Сведения об авторах

Жулидов Иван Михайлович – биолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (e-mail: zhulidovim@yandex.ru)
Антонычева Марина Владимировна – к.м.н., зав. отделом питательных сред, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Лобовикова Оксана Владимировна – к.б.н., зав. ОБТК, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Абрамова Елена Геннадьевна – к.б.н., зав. лаб. профилактических иммуноглобулинов, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Никифоров Алексей Константинович – к.м.н., доцент, зам. директора по экспериментальной и производственной работе, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Шульгина Ирина Витальевна – к.м.н., зав. отделом стандартизации, качества и метрологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Зайцева Людмила Владимировна – врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Миронова Наталья Петровна – врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Вахрушина Наталья Ивановна – врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Астафьева Светлана Васильевна – биолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Павлова Варвара Игоревна – н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Бронникова Валерия Сергеевна – м.н.с., Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Волох Оксана Александровна – к.б.н., зав. лабораторией экспериментальной биотехнологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Авдеева Наталья Григорьевна – врач-бактериолог, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Базлов Григорий Васильевич – ведущий инженер, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»
Комиссаров Александр Владимирович – к.т.н., с.н.с., доцент, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»