

бактерий как активном метаболическом процессе позволяют рассматривать его в качестве самостоятельного теста для определения глубины нарушения жизнеспособности клеток при действии экстремальных факторов на бактериальные культуры.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Александров В.Я. Клетки, макромолекулы и температура. – Л.: Наука, 1975. – 330 с. – 2. Игнатов С.Г., Красильников В.А., Перельгин В.В. и др. // Биохимия. – 1981. – Т. 46, вып. 11. – С. 1996–2003. – 3. Игнатов С.Г., Андреева О.В., Евдокимова О.А. и др. // Биохимия. – 1982. – Т. 47, вып. 10. – С. 1621–1623. – 4. Кробиология и биотехнология / Под ред. А.А.Цуцаевой. – Киев: Наукова думка, 1987. – 5. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1980. – 6. Лукьянова Л.Д., Балмуханов Б.С., Уголев А.Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. – М.: Наука, 1982. – 302 с. – 7. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К.Ерошина. – Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – С. 8–45. – 8. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом. Под ред. Г.М.Франка. – М.: Наука, 1973. – 9. Чеботарев Е.В., Пименов Е.В., Бывалов А.А. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2006. – Вып. 2 (91). – С. 49–53. – 10. Beuchat L.R. // Adv. Appl. Microbiol. – 1978. – Vol. 23. – P. 219–243. – 11. Ray B., Janssen D.W., Busta F.F. // Appl. Microbiol. –

1972. – Vol. 23, N 4. – P. 803–809. – 12. Ray B., Jereski J.I., Busta F.F. // Appl. Microbiol. – 1971. – Vol. 22, N 3. – P. 401–407. – 13. Ray B., Speck M.L. // Appl. Microbiol. – 1972. – Vol. 24, N 4. – P. 585–590. – 14. Tain V.K., Gupta I., Lata K. // Realist. Res. – 1982. – Vol. 92, N 3. – P. 463–473.

E.V.Chebotaryov, A.A.Byvalov, N.N.Zaitseva,  
V.V.Roman, A.V.Kozhemyako

#### Oxygen-Dependent Recovery of *Yersinia pestis* Viability

48<sup>th</sup> Central Research Institute of the RF Defense Ministry, Kirov

The following technique is offered for restoration of viability of *Yersinia pestis* cultures lyophilized at  $-(20\pm 2)^{\circ}\text{C}$  and stored for a long time (7–16 months): 10 cm<sup>3</sup> melted culture in a 120 cm<sup>3</sup> glass bottle under cotton stoppers is aerated by rocking in a shaker at  $(27\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . The process of reparation of the injured bacteria was shown to depend on the presence of the oxygen and energetic sources. Viability reparation was prevented in the atmosphere of argon, when cells' breath was inhibited by cyanide (KCN), and in the case of uncoupling of the oxidative phosphorylation process by 2,4-dinitrophenol (2,4-DNF). Reparation capability was manifested by the bacterial cultures that had retained energy-dependent autoregulation of the breathing activity, estimated according to the respiration parameters, and especially by the magnitude of the metabolic breathing control (MBC).

Key words: *Yersinia pestis*, bacterial cells reparation, metabolic respiratory control (MRC).

Поступила 04.06.07.

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 616.932:615.371/372

О.А.Волох, И.А.Шепелёв, С.П.Заднова, И.М.Крепостнова, С.А.Еремин

### ИЗУЧЕНИЕ БИОКИНЕТИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА – ПРОДУЦЕНТОВ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ВНЕДРЕНИЯ В ПРОИЗВОДСТВО

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлены основные биокинетические показатели роста штаммов *V. cholerae* O1 (классического и эльтор биоваров), O139, не O1 / не O139 – серогрупп, являющихся продуцентами основных протективных антигенов (O1 и O139 антигенов, холерного токсина I и II типов, В-субъединицы холерного токсина II типа, токсин-корегулируемых пилей адгезии) при глубинном культивировании. Для каждого штамма определены оптимальные условия (питательные среды, pH, время культивирования, использование дополнительного источника углеводов) для максимальной продукции протективных антигенов в условиях производства, что позволит использовать их для изготовления более эффективных вакцинных препаратов, а также для получения в очищенном виде основных протективных антигенов *V. cholerae* с целью создания диагностических препаратов.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, глубинное культивирование, протективные антигены.

Холера – опасное эпидемическое заболевание, вызываемое токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 (классического и эльтор биоваров) и O139 серогрупп. В связи с сохранением эндемичных по холере территорий в Азии и Африке и постоянной миграцией населения обстановка по холере в мире и Российской Федерации остается неблагоприятной. Поэтому существует настоятельная необходимость создания химических холерных вакцин, эффективных против всех трех эпидемических вариантов *V. cholerae*, а также диагностических тест-систем, на основе очищенных основных протективных антигенов, для оценки качества выпускаемых вакцинных препаратов.

В России производится химическая вакцина «холероген-анатоксин», содержащая O1-антиген сероваров Инаба и Огава и анатоксин, а также ряд ферментов – протеазу, фосфолипазу, нейраминидазу [2], формирующая анитоксический и антибактериальный иммунитет. Для изготовления указанной вакцины используют штамм O1 серогруппы классического биовара *V. cholerae* 569 серовара Инаба, который продуцирует незначительное (9 мкг/мл) количество холерного токсина (ХТ) в среду выращивания и синтезирует незначительное количество токсин-корегулируемых пилей адгезии (ТКПА) на поверхности клеток, выявляющихся только высокочувстви-

тельным методом иммуноблоттинга. Для внесения О1 антигена Огава применяют штамм *V. cholerae* М41 серовара Огава. Кроме того, изготавливаются экспериментальные серии вакцины, дополненные О139 антигеном [1]. Однако недостатком данных вакцин является отсутствие в их составе ТКПА, необходимых для образования антиколонизирующего иммунитета, предотвращающего инфекционный процесс на его первой стадии – колонизации, а также протективных антигенов *V. cholerae* эльтор биовара – возбудителя текущей пандемии холеры [7]. В лаборатории патогенных вибрионов РосНИПЧИ «Микроб» сконструировано значительное количество штаммов-продуцентов протективных антигенов О1, О139 и не О1/не О139 серогрупп, в том числе *V. cholerae* КМ206 и 2415 О1 серогруппы классического биовара продуценты ХТ I типа, секретирующие соответственно 40,0 и 38,4 мкг/мл данного белка. Данные штаммы образуют также значительное количество ТКПА на поверхности клеток, которые определяются визуально при постановке реакции самоагглютинации [6, 8]. Штамм *V. cholerae* КМ137 О139 серогруппы образует в значительном количестве О139 антиген [4], *V. cholerae* КМ234 О1 серогруппы эльтор биовара – продуцент ХТ II типа (24,0 мкг/мл). Необходимо отметить, что штаммы эльтор вибрионов, продуцирующие ХТ *in vitro*, существуют только за рубежом. *V. cholerae* КМ93 не О1/не О139 серогруппы – продуцент (14,3 мкг/мл) иммуногенной В-субъединицы ХТ [5]. Штаммы депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб».

При проведении малообъемного культивирования [3] подобрано оптимальное время и среда для максимальной продукции антигенов указанными штаммами-продуцентами, но масштабированное культивирование в ферментере отличается от таковых в малообъемных экспериментах. Для эффективного использования среды выращивания и образования значительного количества бактериальной массы при масштабированном культивировании штаммов-продуцентов необходимо оптимизировать схемы культивирования на основе подбора благоприятных физико-химических условий и компонентов питания, а также изучить популяционный состав штаммов и продукцию протективных антигенов, что и явилось целью данной работы.

### Материалы и методы

Глубинное культивирование штаммов-продуцентов проводили на ферментере «New Brunswick М19» (США) с рабочим объемом 10 л и с автоматическими системами поддержания параметров культивирования. Объем питательной среды составлял 4 л. Исследуемые штаммы выращивали как на питательных средах, широко используемых в лабораторной практике (LB и АК1), так и на питательных средах, используемых при культивировании штаммов-продуцентов при производстве химической холерной

вакцины (Хоттингера и казеиновой). При выращивании штаммов, содержащих мобильные генетические элементы, для создания селективных условий в бульон добавляли или канамицин в концентрации 25 мкг/мл (*V. cholerae* 2415, КМ234), или тетрациклин в количестве 2 мкг/мл (*V. cholerae* КМ93).

Температура культивирования для штаммов КМ137 и КМ234 составляла 37 °С, остальные штаммы выращивали при 30 °С. В ходе выращивания контролировали такие параметры, как рН среды, концентрация биомассы (м.к./мл по стандарту мутности ГИСК им. Л.А.Тарасевича), жизнеспособность (КОЕ), продукция антигенов. В зависимости от этих показателей изменяли уровень подаваемого кислорода (газообмен), скорость перемешивания питательной среды и подачу дополнительного источника питания – глюкозы (массообмен). Бульонную культуру обеззараживали добавлением формалина до конечной концентрации 0,6 %. Содержание О1 и О139 антигенов определяли в реакции диффузионной преципитации в агаровом геле (РДП) со специфическими сыворотками. Продукцию ХТ и В-субъединицы измеряли иммуноферментным методом GM<sub>1</sub> ELISA [9], ТКПА – методом иммуноблоттинга со специфической сывороткой [10].

### Результаты и обсуждение

Культивирование штаммов О1 серогруппы классического биовара серовара Огава *V. cholerae* КМ206 и Инаба *V. cholerae* 2415 показало, что при выращивании в LB бульоне (рН 6,8) они активно синтезируют все антигены (О-антиген, ХТ и ТКПА). Минимальное время генерации для этих штаммов составило 0,8 ч, что в два раза короче этого же показателя для штаммов классического биовара (569В и М41), используемых при производстве коммерческой химической холерной вакцины – «холероген-анатоксин». Посевная доза для штамма *V. cholerae* КМ206 составила 1 млрд м.к./мл, а для *V. cholerae* 2415 – 1,4 млрд м.к./мл. Установлено, что оптимальным значением рН питательной среды являются значения 7,2–7,8, время культивирования – 12 ч, при удлинении времени выращивания начинается лизис клеток.

При культивировании штаммов отмечено две экспоненциальные фазы роста. После 7 ч выращивания заметна фаза подавления роста, однако при добавлении глюкозы (40 %) происходит возрастание рН среды с 6,8 до 7,2–7,6 и наблюдается процесс нарастания количества клеток. Очевидно, происходит адаптация популяции к физико-химическим условиям и переходу на другой субстрат питания (рис. 1). Для штамма КМ206 рост биомассы достигает своего максимума к 10 ч от начала культивирования, затем отмечается переход в стационарную фазу. Через 12 ч культивирования концентрация микробных клеток для данного штамма составила 32 млрд м.к./мл, а КОЕ – 14,4 млрд м.к./мл. При вы-

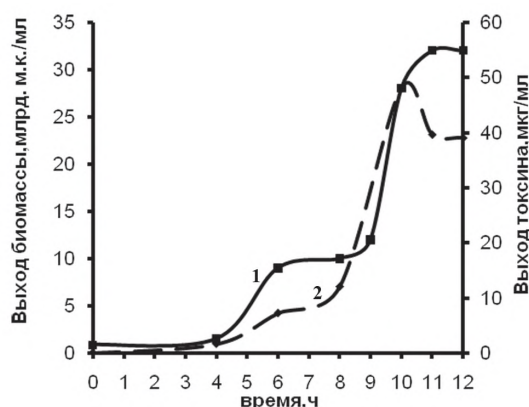


Рис. 1. Глубинное культивирование штамма O1 серогруппы серовара Огава *V. cholerae* KM206 на бульоне LB (pH 6,8):

1 — выход биомассы, млрд м.к./мл; 2 — выход ХТ, мкг/мл

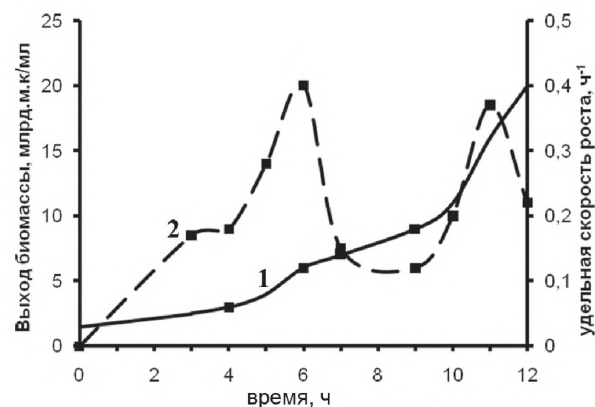


Рис. 2. Глубинное культивирование штамма-продуцента O-антигена O139 серогруппы *V. cholerae* KM137 на бульоне LB (pH 7,5±0,1):

1 — выход биомассы, млрд м.к./мл; 2 — удельная скорость роста, ч<sup>-1</sup>

раживании штамма *V. cholerae* 2415 отмечено удлинение лаг-фазы до 9 ч и короткая экспоненциальная фаза роста — 3 ч. Максимальное количество биомассы образовывалось также к 12 ч выращивания и составило 30 млрд м.к./мл, из которых жизнеспособных клеток было 14,1 млрд м.к./мл. Возможно, необходимость применения антибиотиков при культивировании этого штамма приводит к увеличению лаг-фазы и обуславливает потребность в высоких посевных дозах (не менее 1,4 млрд м.к./мл). Однако добавление дополнительных источников углерода в ходе выращивания данных штаммов дает возможность продлевать экспоненциальную фазу роста.

При изучении популяционного состава культур после выращивания в ферментере (проверено по 200 клонов) обнаружено, что штаммы стабильно сохраняют свои свойства. Выявлено незначительное количество клонов — 0,8 % в штамме *V. cholerae* KM206, снизивших продукцию ХТ и ТКПА, и 1 % клонов *V. cholerae* 2415, утративших плазмидный репликон и переставших синтезировать ХТ в среде выращивания, что не повлияло на выход конечного продукта.

Для контроля процесса накопления ХТ в среде выращивания через равные промежутки времени брали пробы бульона и определяли наличие данного антигена. При этом обнаружено, что штаммы *V. cholerae* KM206 и 2415 синтезировали ТКПА и ХТ в среде уже с 4 ч выращивания, а к концу культивирования концентрация токсина в бульоне составила 38,0 и 36,4 мкг/мл соответственно. Титр O1 антигена в РДП составил — 1:32. Способность синтезировать сразу три иммуногена (ХТ, ТКПА, O1 антиген) в большом количестве делает эти штаммы перспективными для использования в производственных условиях.

Глубинное культивирование штамма-продуцента O-антигена O139 серогруппы *V. cholerae* KM137 проводили на бульоне LB при pH 7,5±0,1. Для создания оптимального уровня pH питательной среды использовали фосфатный буфер (0,4 М), который добавляли в начале выращивания для сокращения времени адаптации (лаг-фаза). Оптимальное время выращивания данного штамма составляло 11–12 ч, при этом выход

биомассы составил 20 млрд м.к./мл (рис. 2), а КОЕ — 5,4 млрд м.к./мл. При переходе микробной популяции в экспоненциальную фазу роста осуществлялась дробная подача глюкозы (40 %), что позволило увеличить удельную скорость роста ( $\mu = 0,32\text{--}0,4\text{ ч}^{-1}$ ) и сократить время генерации ( $T = 1,7\text{--}1,8\text{ ч}$ ). При изучении продукции O139 антигена клетками установлено, что титр по данным РДП составил 1:128, что указывает на присутствие значительного количества O-антигена на поверхности клеток.

При оптимизации условий выращивания штамма KM93 для высокого выхода биомассы и продукции в среде выращивания В-субъединицы холерного токсина, установлено, что при культивировании в бульоне LB (pH 7,6) и Хоттингера с 2 % пептона (pH 8,0) выход биомассы был высоким — 15–16 млрд м.к./мл, но продукция ХТ была низкой — 1,5–1,7 мкг/мл. Кроме того, при выращивании в питательной среде с низкой буферной емкостью (LB) отмечен резкий переход в фазу отмирания, при которой в результате лизиса клеток часть продукта под действием ферментов разрушается. В результате проведения экспериментов установлено, что культивирование данного штамма целесообразно проводить на казеиновом бульоне с 1 % пептоном (pH 7,6) отъемно-доливным способом (методом фазовых культур), позволяющим получать большой объем биомассы за короткий промежуток времени. Концентрация микробных клеток в конце выращивания составила 16 млрд м.к. В связи с удлинением экспоненциальной фазы роста после замены 1/2 объема питательной среды удельная скорость образования холерного токсина ( $qr$ ) увеличилась с 0,13 до 0,21. Кроме того, синтез продукта продолжался и после выхода культуры в стационарную фазу роста (рис. 3) и составил 10,3 мкг/мл. Необходимо отметить, что при периодическом культивировании в этом случае начинается частичный лизис клеток и разрушение под действием ферментов содержащего в среде выращивания ХТ. При изучении популяционного состава клеток после выращивания в ферментере (проверено 300 клонов) установлено, что все изоляты стабильно продуцировали В-субъединицу ХТ в

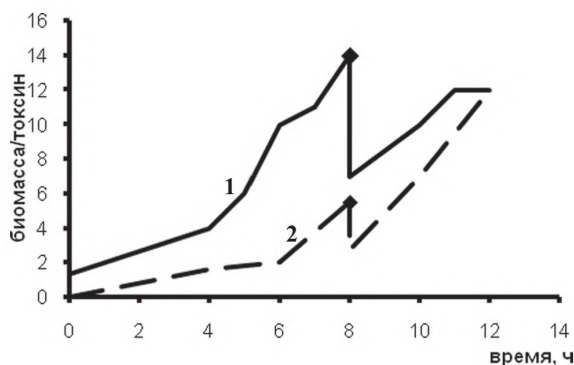


Рис. 3. Глубинное культивирование штамма не O1 / не O139 серогруппы *V. cholerae* KM93 на казеиновом бульоне с 1 % пептоном (pH 7,6) отъемно-доливным способом:

1 – выход биомассы, млрд м.к./мл; 2 – выход ХТ

среду выращивания.

Культивирование штамма-продуцента ХТ II типа *V. cholerae* KM234 проводили на среде АК1 (pH 8,0), являющейся оптимальной для продукции ХТ штаммами эльтор биовара. Скорость роста этого штамма в ферментере была очень низкой, добавление глюкозы привело к переходу к экспоненциальной фазе с двукратным ростом скорости, максимум удельной скорости роста наблюдался через 11 ч от начала выращивания. Выход биомассы и продукта, несмотря на увеличение времени культивирования до 24 ч, в этом случае остался низким (концентрация бактериальных клеток – 8 млрд м.к./мл и количество ХТ – 7,6 мкг/мл). Более продуктивным (10 млрд м.к./мл и 10,4 мкг/мл ХТ) было выращивание в бутылках емкостью 250 мл с использованием термостатированной качалки в течение 20 ч. В этих условиях газообмен и массообмен менее интенсивны, чем в ферментере, что приводит к постепенному и полному потреблению питательных веществ из среды и, соответственно, более продуктивному росту биомассы и синтезу антигена. Популяционный состав штамма после выращивания был однородным, все клоны сохранили способность к синтезу ХТ II типа. Несмотря на полученные положительные результаты, необходимо проведение дальнейшей работы по подбору сред и схемы выращивания данного штамма в производственных условиях.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для высокой продукции основных протективных антигенов холерного вибриона штаммами-продуцентами при масштабированном культивировании необходимо использовать богатые питательные среды, контролируя pH среды и время культивиро-

вания, а также дополнительные источники углерода (глюкоза).

Таким образом, в процессе проведенной работы определены оптимальные условия масштабированного культивирования в условиях производства пяти штаммов-продуцентов холерного вибриона разных серогрупп и биоваров для активной продукции ими протективных антигенов, что позволит использовать их для изготовления более эффективных вакцинных препаратов, а также для получения в очищенном виде основных протективных антигенов *V. cholerae* с целью создания диагностических препаратов.

Работа поддержана грантом РФФИ ОФИ № 06-04-08122.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Дятлов И.А. и др. Оральная химическая вакцина против холеры. Патент РФ № 2159128. – 2000. – 10 с. – 2. Джапаридзе М.Н., Никитина Г.П., Куликова В.Л. и др. // ЖМЭИ. – 1984. – № 4. – С. 70–74. – 3. Заднова С.П., Волох О.А., Крепостнова И.М. и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – Вып. 1 (95). – С. 50–55. – 4. Смирнова Н.И., Чеховская Г.В., Ливанова Л.Ф. и др. // ЖМЭИ. – 2000. – № 3. – С. 47–51. – 5. Смирнова Н.И., Крепостнова И.М., Ливанова Л.Ф. и др. // Мол. генет. микробиол. вирусол. – 2007. – № 4. – С. 7–13. – 6. Топорков А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Штамм бактерий *Vibrio cholerae* KM206 классического биовара серовара Огава – продуцент протективных антигенов. Патент РФ № 2222594. – 2004. – 6 с. – 7. Kabir S. // J. Med. Microbiol. – 2005. – Vol. 16. – P. 101–116. – 8. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Toporkov A.V., Kutyrev V.V. // New Research on Biotechnology and Medicine / Edit. A.M.Egorov, G.E.Zaikov. – New York, 2006. – P. 177–188. – 9. Svennerholm A.M., Holmgren J. // Curr. Microbiol. – 1978. – Vol. 1. – P. 19–23. – 10. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1979. – Vol. 76. – P. 4350–4354.

O.A. Volokh, I.A. Shepelev, S.P. Zadnova, I.M. Krepostnova, S.A. Yerechin

## A Study of Biokinetic Peculiarities and Optimization of the Conditions for Culturing *Vibrio cholerae* Strains Overproducing Protective Antigens Suitable for Use in the Production

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe", Saratov

Described in the work are the major biokinetic criteria of the submerged growth process of *V. cholerae* O1 strains (classical and eltor biovars), O139, non-O1 and non-O139 serogroups, capable of overproducing the main protective antigens (O1 and O139 antigens, type I and II cholera toxin, cholera toxin type II B subunit, toxin-coregulated adhesion pili). The optimal parameters were defined for each strain (nutritional media, pH indices, cultivation time, application of an additional carbohydrate source) facilitating the maximal yield of the protective antigens under the production conditions, thus making it possible to use them as a basis for manufacturing more efficient vaccinal preparations as well as to obtain the main *V. cholerae* protective antigens as purified drugs for constructing diagnostic preparations.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, submerged cultivation, protective antigens.

Поступила 24.10.07.