

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142

УДК 616.98:579.842.23

Р.Р. Салихов, С.В. Борисова, Н.Г. Авдеева, Ю.И. Самохвалова, О.А. Волох

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS* В ПРОЦЕССЕ ПОЛУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ МАССЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель исследования – оптимизация условий глубинного периодического культивирования и состава питательной среды для получения клеточной массы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis*, применяемой в качестве адсорбента при производстве чумных диагностических иммуноглобулинов. **Материалы и методы.** Использовали штаммы-адсорбенты *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70, относящиеся к V, I, III, IV, V серотипам соответственно, полученные из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Процесс культивирования осуществляли на шейкере-инкубаторе, лабораторном и пилотном ферментерах с варьированием условий процесса, различными вариантами подкормок и питательных сред. **Результаты и обсуждение.** В ходе работы определены оптимальные параметры периодического глубинного культивирования. Установлено, что наибольший выход биомассы обеспечивает комбинация «питательная среда – углеродный субстрат» в виде бульона на основе ферментативного гидролизата фибрина с внесением в качестве субстратной подкормки галактозы. При этом морфология и иммунохимические свойства микробных клеток, полученных при оптимизированном процессе, не отличались от таковых при контрольном. Проведен процесс оптимизации условий получения клеточной массы *Y. pseudotuberculosis* с последующим масштабированием.

Ключевые слова: *Yersinia pseudotuberculosis*, периодическое глубинное культивирование, ферментативный гидролизат фибрина, галактоза, питательная среда, субстратная подкормка.

Корреспондирующий автор: Салихов Руслан Римович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Салихов Р.Р., Борисова С.В., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Оптимизация условий культивирования *Yersinia pseudotuberculosis* в процессе получения клеточной массы. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 4:137–142. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142

Поступила 29.06.2021. Принята к публ. 02.07.2021.

R.R. Salikhov, S.V. Borisova, N.G. Avdeeva, Yu.I. Samokhvalova, O.A. Volokh

Optimization of the Conditions for Cultivation of *Yersinia pseudotuberculosis* in the Process of Obtaining Cell Mass

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to optimize the conditions of submerged recurrent cultivation and the composition of the nutrient medium for obtaining the cell mass of *Yersinia pseudotuberculosis* strains, used as an adsorbent in the preparation of diagnostic plague immunoglobulins. **Materials and methods.** We utilized *Y. pseudotuberculosis* adsorbent strains 6; 31; 68; 69; and 70 belonging to V, I, III, IV, and V serotypes, respectively, received from the State Collection of Pathogenic Bacteria at the premises of the RusRAPI “Microbe”. The cultivation process was carried out on an incubator-shaker, laboratory and pilot fermenters with variation of the process parameters, different options for feeding and nutrient media. **Results and discussion.** In the course of work, the optimal parameters of recurring submerged cultivation have been established. It was found that the highest biomass yield is provided by a combination of a nutrient medium – a carbon substrate in the form of a broth, based on an enzymatic fibrin hydrolysate, with the addition of galactose as a substrate feeding. Thereat, the morphology and immunochemical properties of microbial cells obtained through modified preparation process do not differ from those produced in the control run. The optimization of the parameters for *Y. pseudotuberculosis* cell mass cultivation with subsequent upscaling has been performed.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis*, recurrent submerged cultivation, enzymatic fibrin hydrolysate, galactose, nutrient medium, substrate feeding.

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

Corresponding author: Ruslan R. Salikhov, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Salikhov R.R., Borisova S.V., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Volokh O.A. Optimization of the Conditions for Cultivation of *Yersinia pseudotuberculosis* in the Process of Obtaining Cell Mass. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:137–142. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-137-142

Received 29.06.2021. Accepted 02.07.2021.

Salikhov R.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4980-4109>

Borisova S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3793-6526>

Volokh O. A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

На сегодняшний день в лабораторной диагностике возбудителя чумы применяются «Иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие чумные адсорбированные лошадиные сухие» и

«Иммуноглобулины диагностические чумные адсорбированные лошадиные для реакции агглютинации на стекле» производства РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов) [1]. Одной из стадий производства имму-

ноглобулинов диагностических чумных лошадиных (ИДЧЛ) является проведение сорбции перекрестно-реагирующих антител по методу Кастеллани [2]. Данный этап проводится с использованием бактериальных клеток штаммов-адсорбентов, в частности *Yersinia pseudotuberculosis*.

В настоящее время получение биомассы *Y. pseudotuberculosis* проводят в условиях периодического глубинного культивирования с использованием среды на основе ферментативного гидролизата казеина с дозированным добавлением субстратной подкормки в виде раствора глюкозы. Одной из перспективных производственных питательных сред является среда на основе панкреатического гидролизата фибрина (ФГФ), полученного из отхода производства гетерологичного антирабического иммуноглобулина, согласно патенту RU 2425866 C1 [3]. В институте «Микроб» разработаны и апробированы питательные среды на основе ФГФ для глубинного культивирования *Vibrio cholerae* и *Francisella tularensis* [4, 5]. Использование ФГФ в производственной практике получения штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis* позволяет сократить расходы при получении клеточной массы, что в конечном итоге может значимо отразиться на себестоимости препарата. Внесение в питательную среду ряда веществ, в частности углеродного субстрата, также позволяет увеличить выход клеточной массы. Так, согласно результатам ряда авторов, использование галактозы при культивировании штаммов *Y. pseudotuberculosis* способствует активному приросту клеточной массы [6]. Исходя из вышесказанного, актуальным является подбор оптимальных сред и условий культивирования с целью увеличения выхода клеточной массы *Y. pseudotuberculosis*.

Цель данной работы – оптимизация условий культивирования и состава питательной среды для получения клеточной массы штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis*.

Материалы и методы

В работе использовались штаммы-адсорбенты *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70, относящиеся к V, I, III, IV, V серотипам соответственно. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Сахаролитическую активность штаммов оценивали на пестром ряде Гисса с использованием различных вариантов углеродных субстратов: арабинозы, ксилозы, галактозы, глюкозы, маннозы, рамнозы, раффинозы, мальтозы, маннита, глицерина. Для оценки влияния углеродных субстратов на рост *Y. pseudotuberculosis* использовалась минимальная среда М9 [7]. В качестве полноценных экспериментальных сред применялись среды на основе: ФГФ, панкреатического гидролизата рыбной муки (ПГРМ) и панкреатического гидролизата казеина (ПГК) производства ФБУН «Государственный научный центр

прикладной микробиологии и биотехнологии» (Оболенск). Содержание аминного азота в полноценных средах доводили до 0,1 %, водородный показатель – до 7,4. В качестве плотной питательной среды использовали агар Хоттингера pH 7,2.

Для глубинного культивирования штаммов *Y. pseudotuberculosis* использовали термостатируемый шейкер-инкубатор, лабораторный и пилотный ферментеры с общими объемами 1,5 и 70 л соответственно. В условиях шейкера-инкубатора культивирование проводили на колбах Эрленмейера объемом 250 мл с внесением 25 мл среды в течение 24 ч при 130 об/мин и поддержанием температуры 28 °С. Выращивание на лабораторном и пилотном ферментерах осуществляли с автоматическим контролем ключевых параметров: температура 28 °С, содержание растворенного кислорода в культуральной жидкости поддерживали на уровне (40±5) %, pH питательной среды поддерживали добавлением 10 % раствора NaOH.

Для вариантов культивирования в условиях шейкера-инкубатора и лабораторного ферментера инокулят готовили путем смыва двухсуточной культуры с плотной среды 0,9 % раствором NaCl, посевная доза составляла 2 % от объема культивирования. Для пилотного ферментера использовали суточную бульонную культуру в размере 10 % от объема культивирования.

После окончания выращивания инактивацию культуры проводили: а) при объемах до 1 л путем нагрева культуральной жидкости до 100 °С с поддержанием заданной температуры в течение 30 мин; б) в условиях пилотного ферментера после прогрева дополнительно вносили в культуральную жидкость формалин до конечной концентрации 0,6 % с последующей экспозицией длительностью 18 ч. Осадок клеточной массы штаммов-адсорбентов отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге в течение 15 мин при 10000 об/мин, на проточной центрифуге – со скоростью подачи 10 л/ч при 20000 об/мин.

Концентрацию микробных клеток в культуральной жидкости определяли турбидиметрически при длине волны 540 нм. При культивировании на лабораторном ферментере рост культуры контролировали в режиме реального времени при длине волны 600 нм в проточной ячейке.

Микробиологическую чистоту культуры контролировали путем посева на плотную среду и микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Иммунохимическую активность полученной клеточной массы контролировали следующими методами: реакция агглютинации на стекле (с применением иммуноглобулинов диагностических псевдотуберкулезных адсорбированных лошадиных для реакции агглютинации на стекле производства РосНИПЧИ «Микроб») и методом флуоресцирующих антител (с использованием иммуноглобулинов диагностических флуоресцирующих псевдотуберку-

лезных адсорбированных лошадиных производства РосНИПЧИ «Микроб»). Все этапы работы выполнялись в соответствии с СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

Расчет удельной скорости роста (μ) определяли согласно общепринятой методике [8]. Статистический анализ проводили с использованием пакета Microsoft Excel 2010. Выявление статистической значимости различий результатов производили методом двухфакторного дисперсионного анализа (two-way ANOVA), для апостериорного анализа применяли метод множественного сравнения Тьюки (Tukey HSD test) [9]. В качестве пограничного уровня статистической значимости принимали значение $p \leq 0,05$. Кривые линии роста культуры строили с величиной достоверности аппроксимации $R^2 \geq 0,95$.

Результаты и обсуждение

На первом этапе проводили определение сахаролитической активности изучаемых штаммов. Ключевым аспектом выбора углеродного субстрата для использования в дальнейшем исследовании стала обязательная его ферментация всеми штаммами. Так, маннит не ферментировался штаммом *Y. pseudotuberculosis* 70, а раффиноза – штаммами *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 70, поэтому данные углеродные субстраты исключались из дальнейших экспериментов. Культивирование с применением остальных вариантов сахаров и спиртов показало изменение цвета индикатора среды для всех штаммов, что говорит об их успешной ферментации. Полученные результаты согласуются с данными, представленными в литературе [10, 11]. Кроме того, отмечено сильное изменение цвета индикатора в вариантах с глюкозой и маннозой для всех штаммов, что указывает на наибольшее изменение водородного показателя среды в ходе роста культуры. Использование в качестве углеродного субстрата арабинозы, ксилозы, галактозы, мальтозы, рамнозы, глицерина не показало значительного изменения pH среды.

Следующий этап работы заключался в определении влияния отобранных вариантов углеродных субстратов на конечный прирост биомассы штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis*. Для оценки влияния углеродного субстрата с параллельным нивелированием воздействия компонентов среды на рост изучаемой культуры использовалась минимальная среда М9. Штаммы *Y. pseudotuberculosis* в условиях малообъемного культивирования выращивали в течение 24 ч в шейкере-инкубаторе на минимальной среде с добавлением соответствующего варианта субстратной подкормки до конечной концентрации 1,2 мг/мл. В качестве контроля использовалась минимальная среда без внесения субстратной подкормки. Так как при использовании в качестве субстратной подкормки маннозы, рамнозы, арабинозы, мальтозы не выявлен рост, отличный от контроля, для всех исследуемых штаммов, результаты, полученные при культивировании на данных углеродных субстратах, не принимались в расчет. На рис. 1 представлены результаты влияния различных вариантов субстратной подкормки на прирост биомассы *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70.

Значение критерия Фишера, полученное нами при использовании различных вариантов субстратных подкормок, превысило критическое значение $F_{\text{экс}} = 11,53 > F_{\text{крит.}} = 3,00$, что говорит о влиянии субстратной подкормки на прирост биомассы. Степень влияния субстратной подкормки на количественный прирост биомассы оценивалась в 60,11 %. Попарные сравнения средних значений по выборкам отдельных углеродных субстратов согласно методу Тьюки показали, что варианты культивирования на различных углеродных субстратах статистически отличались от контрольного варианта. Таким образом, прирост биомассы относительно контроля составил для ксилозы ($44,0 \pm 8,81$ %), галактозы – ($48,0 \pm 5,4$ %), глюкозы и глицерина – ($50,0 \pm 5,0$) и ($32,4 \pm 9,5$) % соответственно. Вариант штамма не оказывал статистически значимого влияния на прирост биомассы.

Следующий этап исследования заключался в подборе полноценной питательной среды для максимального прироста биомассы штаммов

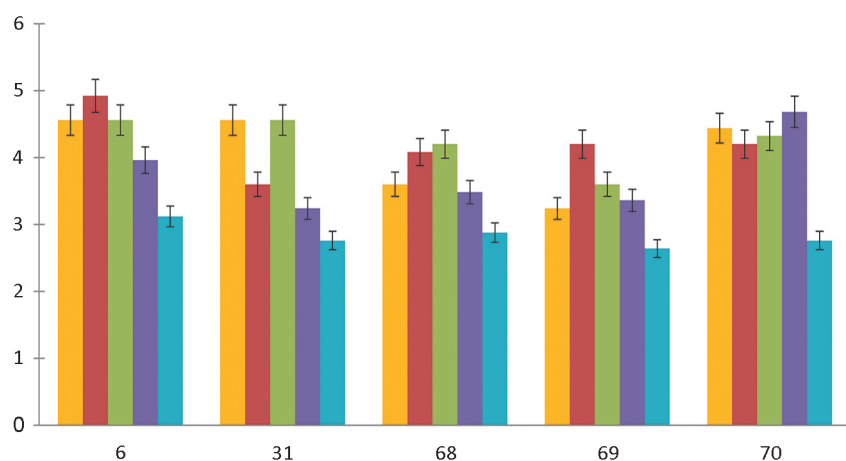


Рис. 1. Влияние углеродного субстрата на прирост биомассы штаммов *Y. pseudotuberculosis* при культивировании на минимальной среде в условиях шейкера-инкубатора:

Цветом столбца обозначен вариант углеродного субстрата: желтый – ксилоза, красный – галактоза, зеленый – глюкоза, фиолетовый – глицерин, синий – контроль. Ось ординат: концентрация $\times 10^9$ м.к./мл. Ось абсцисс: культивируемые штаммы *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

Fig. 1. Effect of the carbon substrate on the biomass growth of *Y. pseudotuberculosis* strains when cultivated on a minimal medium in a shaker-incubator:

The color of the column indicates the variant of the carbon substrate: yellow – xylose, red – galactose, green – glucose, violet – glycerin, blue – control. Y-axis: concentration $\times 10^9$ m.c./ml. X-axis: cultivated strains of *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

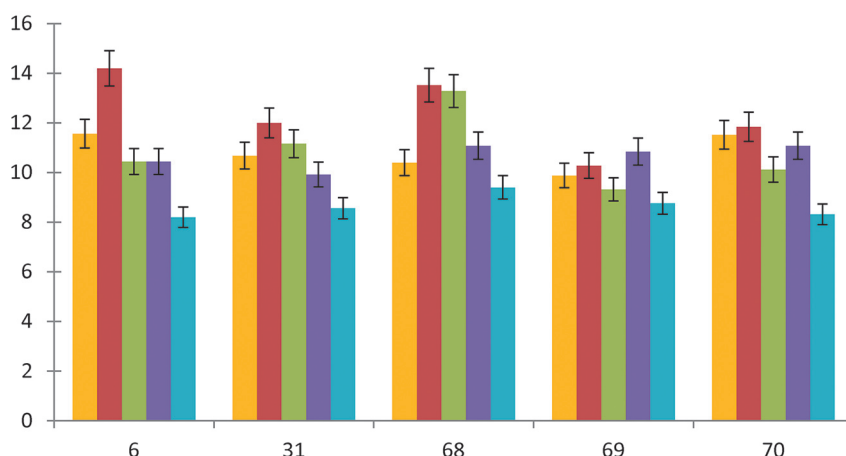


Рис. 2. Влияние углеродного субстрата на прирост биомассы штаммов *Y. pseudotuberculosis* при культивировании на питательной среде на основе ФГФ в условиях шейкера-инкубатора:

Цветом столбца обозначен вариант углеродного субстрата: желтый – ксилоза, красный – галактоза, зеленый – глюкоза, фиолетовый – глицерин, синий – контроль. Ось ординат: концентрация × 10⁹ м.к./мл. Ось абсцисс: культивируемые штаммы *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

Fig. 2. Effect of carbon substrate on biomass growth of *Y. pseudotuberculosis* strains during cultivation on a nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate under shaker-incubator conditions:

The color of the column indicates the variant of the carbon substrate: yellow – xylose, red – galactose, green – glucose, violet – glycerin, blue – control. Y-axis: concentration × 10⁹ m.c./ml. X-axis: cultivated strains of *Y. pseudotuberculosis* 6, 31, 68, 69, 70

Y. pseudotuberculosis. Культивирование проводилось качалочным методом, по аналогии с предыдущим этапом. Исследовались два варианта полноценных питательных сред на основе ПГРМ и ФГФ. Среда на основе ПГК принята в качестве контрольной. Согласно полученным результатам, тип полноценной питательной среды оказывал статистически значимое влияние на прирост биомассы, $F_{\text{эксп}} = 16,15 > F_{\text{крит.}} = 4,46$. Степень влияния фактора составила 65,05 %. Как и на предыдущем этапе, вариант штамма не оказывал статистически значимого влияния на увеличение концентрации микробных клеток штаммов-адсорбентов. Применение в качестве полноценных питательных сред ПГРМ и ФГФ дает больший прирост биомассы, чем культивирование на ПГК. ПГРМ показал средний прирост биомассы относительно контроля (10,20±6,48) %, а ФГФ – (26,14±1,95) %. Полученные данные указывают на то, что наиболее перспективной полноценной питательной средой для наработки бактериальной массы штаммов *Y. pseudotuberculosis* является ФГФ.

Опираясь на полученные результаты, проводили эксперимент по культивированию на среде ФГФ с внесением различных вариантов углеродных субстратов. В качестве контроля использовали ФГФ без внесения субстратной подкормки. Результаты представлены на рис. 2.

При культивировании на ФГФ внесение углеродного субстрата оказывало статистически значимое влияние на прирост биомассы, $F_{\text{эксп}} = 9,76 > F_{\text{крит.}} = 3,00$. Степень влияния типа субстратной подкормки на прирост биомассы составила 60,97 %, что аналогично результату, полученному при внесении углеродного субстрата на минимальной среде. Это указывает на отсутствие межфакторного взаимодействия по типу «среда – углеродный субстрат». Средний прирост биомассы относительно контроля составил для ксилозы (25,5±6,3) %, галактозы – (43,4±8,9) %, глюкозы и глицерина – (25,3±5,7) и (23,6±3,2) % соответственно.

С целью анализа влияния субстратной подкормки на кинетику роста *Y. pseudotuberculosis* проводили культивирование в условиях лабораторного ферментера. Так как в ходе предыдущих исследований установлено, что вариант штамма не влияет на прирост биомассы, в качестве модельного объекта в дальнейшей работе использовали *Y. pseudotuberculosis* 68. Высокая схожесть штаммов *Y. pseudotuberculosis* подтверждается литературными данными [10, 11]. Исследуемые образцы: ФГФ + субстратная подкормка, контроль – ФГФ. Субстратную подкормку вносили дозированно со второго по шестой час культивирования. Результаты культивирования представлены на рис. 3.

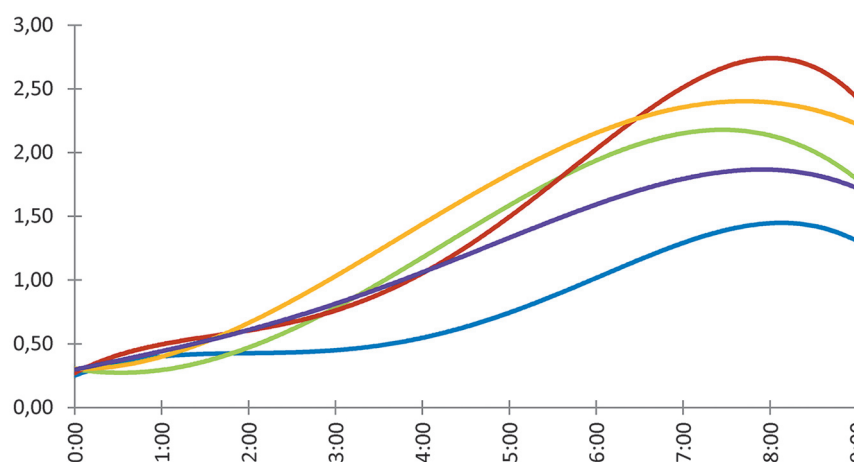


Рис. 3. Влияние углеродного субстрата на динамику роста *Y. pseudotuberculosis* 68 при культивировании в условиях лабораторного ферментера на питательной среде на основе ФГФ:

Цветом кривой обозначен вариант углеродного субстрата: желтый – ксилоза, красный – галактоза, зеленый – глюкоза, фиолетовый – глицерин, синий – контроль. Ось ординат: значения оптической плотности 600 нм. Ось абсцисс: время от начала культивирования, чч:мм

Fig. 3. Impact of carbon substrate on the dynamics of growth of *Y. pseudotuberculosis* 68 when cultivated in a laboratory fermenter on a nutrient medium based on enzymatic fibrin hydrolyzate:

The color of the curve indicates the variant of the carbon substrate: yellow – xylose, red – galactose, green – glucose, violet – glycerin, blue – control. Y-axis: absorbance values of 600 nm. X-axis: elapsed time from the beginning of cultivation, hh:mm

Культивирование осуществляли до момента выхода на стационарную фазу, которую обнаруживали по скачкообразному изменению оптической плотности микробной суспензии.

Наибольший конечный прирост биомассы относительно контроля отмечен в варианте культивирования с галактозой – $(62,2 \pm 8,4) \%$. Схожие результаты получены при культивировании с использованием в качестве углеродного субстрата ксилозы, прирост составил $(49,9 \pm 5,1) \%$. Внесение глюкозы и глицерина в культуральную среду обеспечило относительно равные показатели прироста микробной биомассы – $(20,1 \pm 6,0)$ и $(15,7 \pm 3,4) \%$ соответственно.

Длительность лаг-фазы во всех вариантах оказалась приблизительно одинаковой ($\approx 1,5$ ч от момента начала культивирования). Большой конечный прирост биомассы при дозированном внесении раствора галактозы, по-видимому, связан с продолжительной (≈ 7 ч) фазой экспоненциального роста, в то время как использование других углеродных субстратов отличалось меньшей длительностью ($\approx 5,5$ ч) аналогичной фазы.

Темпы прироста биомассы в период экспоненциальной фазы при внесении углеродных субстратов были выше, чем в контрольном варианте. Удельная скорость роста в экспоненциальной фазе при использовании в качестве углеродных субстратов галактозы, глюкозы, ксилозы, глицерина составила $(0,34 \pm 0,02)$, $(0,35 \pm 0,02)$, $(0,32 \pm 0,02)$, $(0,21 \pm 0,06) \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Удельная скорость роста в контрольном варианте – $(0,19 \pm 0,02) \text{ ч}^{-1}$.

При масштабировании процесса получения штаммов-адсорбентов выход за пределы оптимальных значений водородного показателя среды может значительно ингибировать процесс роста культуры, что негативным образом сказывается на конечном выходе продукта. Кроме того, согласно литературным данным, при значительных сдвигах pH среды возможно изменение антигенного состава клетки [8]. В свою очередь изменение антигенного состава микроорганизма недопустимо при получении штаммов-адсорбентов. Оптимальные значения концентрации водородных ионов для размноже-

ния *Y. pseudotuberculosis* лежат в диапазоне pH 6,6–7,8 [11]. В процессе периодического глубинного культивирования отмечено изменение значения pH, которое зависело от типа субстратной подкормки. Так, добавление глюкозы в культуральную жидкость приводило к постепенному снижению значения водородного показателя, вплоть до экстремальных ($< 6,0$ pH) значений. При использовании в качестве субстратной подкормки глицерина pH снижался до $(6,6 \pm 0,05)$. При внесении галактозы и ксилозы через 1 ч после начала подкормки происходило слабое снижение pH до $(7,1 \pm 0,05)$, затем водородный показатель среды повышался до $(7,8 \pm 0,05)$, чему соответствовал активный прирост биомассы.

В условиях глубинного культивирования аэробных микроорганизмов большое значение приобретает поддержание оптимальной концентрации растворенного кислорода в среде. В ходе работы эмпирическим путем установлено, что оптимальный уровень содержания растворенного кислорода в среде составляет $(40 \pm 5) \%$. Поддержание более высоких значений кислорода в среде связано со значительным увеличением числа оборотов мешалки и степени аэрирования, что приводит к сильному пенообразованию. Кроме того, высокая насыщенность кислородом приводит к ингибированию роста культуры, что, вероятно, связано с накоплением перекисных соединений клетками [8].

На основе полученных результатов проведения масштабирования процессов культивирования штаммов-адсорбентов *Y. pseudotuberculosis*. Применялись следующие комбинации питательных сред и углеродных субстратов: оптимизированный вариант – ферментативный гидролизат фибрина с внесением галактозы (ФГФ+галактоза), контрольный вариант (применяемый в производственном цикле) – панкреатический гидролизат казеина с внесением глюкозы (ПГК+глюкоза). В качестве модельного штамма использован *Y. pseudotuberculosis* 68. Культивирование проводили на пилотном ферментере с поддержанием уровня кислорода $(40 \pm 5) \%$, pH $(7,2 \pm 0,2)$, при температуре 28°C до момента выхода на стационарную фазу. Кривые роста представлены на рис. 4.

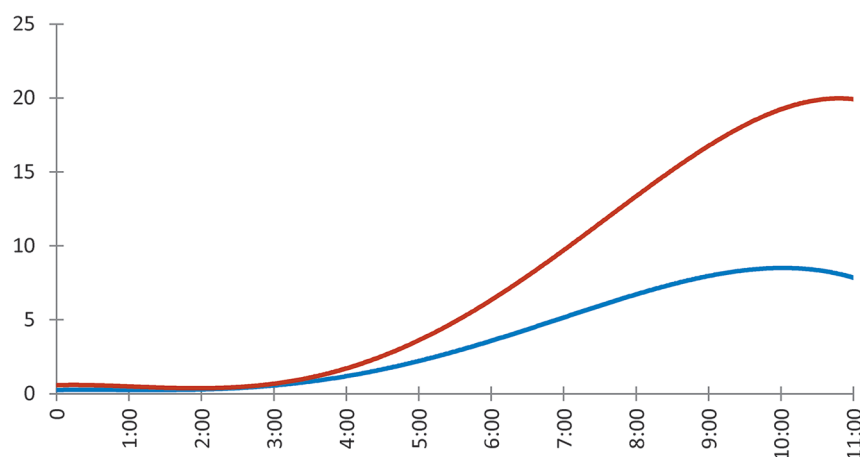


Рис. 4. Влияние варианта среда + углеродный субстрат на динамику роста *Y. pseudotuberculosis* 68 при культивировании в условиях пилотного ферментера:

Цветом кривой обозначен вариант питательной среды + углеродный субстрат: *красный* – ФГФ+галактоза, *синий* – ПГК+глюкоза. Ось ординат: концентрация $\times 10^9$ м.к./мл. Ось абсцисс: время от начала культивирования, ч:мм

Fig. 4. Impact of the medium + carbon substrate option on the growth dynamics of *Y. pseudotuberculosis* 68 when cultivated under the conditions of a pilot fermenter:

The color of the curve indicates the variant of the nutrient medium + carbon substrate: *red* – enzymatic hydrolysate of fibrin + galactose, *blue* – pancreatic hydrolysate of casein + glucose. Y-axis: concentration $\times 10^9$ mc/ml. X-axis: elapsed time from the beginning of cultivation, hh:mm

Прирост биомассы при выращивании на гидролизате фибрина с внесением галактозы выше контрольного варианта на $(0,65 \pm 0,05) \text{ ч}^{-1}$. Лаг-фаза и в первом, и во втором варианте культивирования была равной по длительности ($\approx 4,5 \text{ ч}$). Фаза экспоненциального роста в контрольном варианте была менее продолжительной ($\approx 4,5 \text{ ч}$), чем в оптимизированном варианте ($\approx 5,5 \text{ ч}$). Удельная скорость роста в данные временные промежутки составила $(0,26 \pm 0,01)$ и $(0,33 \pm 0,01) \text{ ч}^{-1}$ соответственно. Выход клеточной массы на единицу объема среды составил $(5,25 \pm 0,24) \text{ мг/мл}$ для контроля и $(15,13 \pm 0,19) \text{ мг/мл}$ для оптимизированного варианта. Морфология и иммунохимические свойства микробных клеток, полученных при оптимизированном и контрольном процессах, не различались между собой.

Таким образом, для увеличения выхода клеточной массы штаммов *Y. pseudotuberculosis*, используемых для получения чумных диагностических иммуноглобулинов, экспериментально доказана возможность применения питательной среды на основе ферментативного гидролизата фибрина с внесением в качестве субстратной подкормки галактозы.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: ЗАО «Шико»; 2013. 560 с.
2. Castellani A. Die Agglutination bei gemischter Infektion und die Diagnose der letzteren. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*. 1902; 40:1–19.
3. Антонычева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.В., Шульгина И.В., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона. Патент РФ № 2425866, опублик. 10.08.2011. Бюл. № 24.
4. Никифоров А.К., Антонычева М.В., Волох О.А., Еремин С.А., Киреев М.Н., Жулидов И.М., Алешина Ю.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Холматов К.И. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 1:85–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-85-88.
5. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М., Холматов К.И., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К. Жидкая питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2017; 2:81–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-81-83.
6. Бахолдина С.И., Шубин Ф.Н., Исаева М.П., Ракин А.В., Соловьева Т.Ф. Галактоза способствует размножению бактерий псевдотуберкулеза в условиях *in vitro* и *in vivo*. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2010; 4:16–9.
7. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М.: 2012. 415 с.
8. Перт С.Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. М.: Мир; 1978. 331 с.
9. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников. М.: Физматлит; 2006. 816 с.
10. Туманский В.М. Псевдотуберкулез. М.: Медгиз; 1958. 82 с.
11. Сомов Г.П., Покровский В.И., Беседнова Н.Н., Антоненко Ф.Ф. Псевдотуберкулез. М.: Медицина; 2001. 256 с.

References

1. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., editors. [Laboratory Diagnostics of Dangerous Infectious Diseases. Practice Guidelines]. Moscow: CJSC “Shiko”; 2013. 560 p.
2. Castellani A. Die Agglutination bei gemischter Infektion und die Diagnose der letzteren. *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*. 1902; 40:1–19.
3. Antonycheva M.V., Nizhegorodtsev S.A., Eremin S.A., Alenkina T.V., Shul'gina I.V., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Zhulidov I.M., Nikiforov A. K. [Nutrient medium for the cultivation of *Vibrio cholerae*]. RF patent No. 2425866, publ. 10.08.11. Bul. No. 24.
4. Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Volokh O.A., Eremin S.A., Kireev M.N., Zhulidov I.M., Aleshina Yu.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Kholmato V.K.I. [Development of nutrient media based on non-food raw materials for submerged cultivation of *Vibrio cholerae* strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (1):85–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-1-85-88.
5. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M., Kholmato V.K.I., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. [Liquid nutrient medium for submerged cultivation of the tularemia microbe]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; (2):81–3. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-81-83.
6. Bakholdina S.I., Shubin F.N., Isaeva M.P., Rakin A.V., Solov'eva T.F. [Galactose facilitates the propagation of pseudotuberculosis bacteria *in vitro* and *in vivo*]. *Tikhookeansky Meditsinsky Zhurnal [Pacific Medical Journal]*. 2010; 4:16–9.
7. Dyatlov I.A., Kutyrev V.V., Khramov M.V. [Nutrient Media for Isolation, Cultivation and Identification of Pathogens of Particularly Dangerous Infections of Bacterial Nature]. Moscow; 2012. 415 p.
8. Perth S.J. [Fundamentals of Cultivation of Microorganisms and Cells]. Moscow: “Mir”; 1978. 331 p.
9. Kobzar' A.I. [Applied Mathematical Statistics. For engineers and scientists]. Moscow: “Fizmatlit”; 2006. 816 p.
10. Tumansky V.M. [Pseudotuberculosis]. Moscow: “Medgiz”; 1958. 82 p.
11. Somov G.P., Pokrovsky V.I., Besednova N.N., Antonenko F.F. [Pseudotuberculosis]. Moscow: “Meditsina”; 2001. 256 p.

Authors:

Salikhov R.R., Borisova S.V., Avdeeva N.G., Samokhvalova Yu.I., Volokh O.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Салихов Р.Р., Борисова С.В., Авдеева Н.Г., Самохвалова Ю.И., Волох О.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.