

**А.К.Никифоров, М.В.Антонычева, О.А.Волох, С.А.Еремин, М.Н.Киреев, И.М.Жулидов,
Ю.А.Алешина, Н.Г.Авдеева, Н.И.Вахрушина, К.И.Холматов**

РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД НА ОСНОВЕ НЕПИЩЕВОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

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

Проведено сравнение эффективности жидких питательных сред на основе панкреатического перевара фибрина и автолизата пекарских дрожжей и сред, традиционно используемых в производстве холерной вакцины для глубинного культивирования штаммов *Vibrio cholerae* 569 В и *V. cholerae* М-41. Результаты исследования биологических показателей качества сред (стабильность морфологических и биохимических свойств, эффективность по накоплению биомассы и протективных антигенов) из гидролизата фибрина и автолизата пекарских дрожжей позволяют сделать вывод о возможности использования этих сред в производстве холерной вакцины. Применение сред из непищевого сырья в производстве холерной вакцины перспективно с точки зрения снижения себестоимости лечебно-профилактического препарата, кроме этого позволяет комплексно решать проблему утилизации белкового отхода, образующегося при производстве антирабического иммуноглобулина, снижая экологическую нагрузку на внешнюю среду.

Ключевые слова: питательная среда, гидролизат фибрина, автолизат пекарских дрожжей, вакцина холерная, глубинное культивирование.

**A.K.Nikiforov, M.V.Antonycheva, O.A.Volokh, S.A.Eremin, M.N.Kireev, I.M.Zhulidov, Yu.A.Aleshina,
N.G.Avdeeva, N.I.Vakhrushina, K.I.Kholmato**

Development of Food-Raw-Material-Based Nutrient Media for Submerged Cultivation of Cholera Vibrio Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Carried out has been comparative assessment between the performances of liquid nutrient pancreatic fibrin overcook-based and bakery yeast autolyzate-based media and conventionally used in manufacturing of cholera vaccine media for submerged cultivation of *Vibrio cholerae* 569B and *V. cholerae* M-41 strains. Results of investigation of media quality biological predictors (morphological and biochemical property stability, efficacy of biomass and protective antigen accumulation), which are fibrin hydrolyzate and bakery yeast autolyzate-based, suggest the possibility of using them for the production of cholera vaccine. Deployment of inedible raw material-based media in manufacturing of cholera vaccine is a prospective technology in view of reduction of medical-prophylactic preparation costs. Moreover it allows for solving the problem of protein waste-product disposal, which is generated in the process of anti-rabies immunoglobulin manufacturing, thus decreasing ecological impact on the environment.

Key words: nutrient medium, fibrin hydrolyzate, bakery yeast autolyzate, cholera vaccine, submerged cultivation.

Важным фактором технологического процесса в производстве многих иммунобиологических препаратов является выбор питательной среды, обеспечивающей рост микроорганизмов и синтез целевого продукта. При этом следует учитывать, с одной стороны, энергетические и материальные потребности микробной клетки, а с другой – экономичность сырья и его доступность. Из обзора литературы ясно, что для производства холерной вакцины (ХВ) используют ограниченное количество сред [3]. Эти среды содержат в качестве основы животный белок – гидролизат по Хоттингеру, пептон Мартена, гидролизат казеина, что в значительной мере обуславливает высокую стоимость выпускаемого препарата.

Ранее в РосНИПЧИ «Микроб» был предложен способ получения автолизата пекарских дрожжей и доказана эффективность его использования в качестве основы сред для культивирования чумного микроба и холерных вибрионов [6]. Продолжением этой работы стала разработка жидких сред на основе дрожжевого автолизата с целью получения посевных культур штаммов, используемых в производстве ХВ [2].

Имеются данные литературы об использовании комплекса диагностических питательных сред на основе гидролизата пекарских дрожжей для выделения и накопления холерных вибрионов [5, 7, 8]. Однако в доступной нам литературе нет сведений о возможности применения сред на основе автолизата или гидролизата дрожжей при глубинном культивировании штаммов, используемых в производстве ХВ.

Другой ценной белковой основой при изготовлении сред является гидролизат фибрина – панкреатический перевар фибриллярного белка крови лошадей. С целью внедрения малоотходных технологий в РосНИПЧИ «Микроб» разработан способ приготовления панкреатического гидролизата фибрина и запатентована питательная среда на его основе для глубинного культивирования холерных вибрионов [1, 4].

Учитывая стоимость традиционно используемых в производстве ХВ питательных сред, ожидаемый эффект от внедрения новых сред на основе непищевого белка заключается в снижении себестоимости ХВ и повышении выхода синтезируемых холерными вибрионами протективных антигенов – О-антигена

(О-АГ) и холерного токсина (ХТ).

Цель работы – сравнение эффективности жидких питательных сред на основе панкреатического перевара фибрина и автолизата пекарских дрожжей и сред, традиционно используемых для производственного культивирования штаммов холерного вибриона.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы холерных вибрионов *Vibrio cholerae* O1 М-41 и *V. cholerae* 569 В, полученные из Госколлекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

В качестве контрольных питательных сред (ПС) использованы жидкие среды лабораторного изготовления (РосНИПЧИ «Микроб») с рН (7,7±0,1): среда на основе гидролизата по Хоттингеру (ГХ) и среда на основе панкреатического гидролизата казеина (ГК), соответствующие 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».

Экспериментальными ПС являлись среды на основе гидролизата фибрина (ГФ), на основе автолизата пекарских дрожжей (АПД) и комбинированная среда (КС) с основой из ГФ с добавлением АПД до 1%. Физико-химические показатели используемых питательных основ соответствовали требованиям МУК 4.2.2316-08 [1, 2, 4, 6]. Все среды в процессе приготовления осветляли и очищали по единой технологии с использованием активированного угля и глубокой фильтрации. Стерилизацию сред осуществляли в реакторе-ферментере при 120 °С в течение 30 мин.

Для глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* использовали термостатируемый шейкер-инкубатор RC-ТК (USA) и реактор-ферментер с рабочим объемом 500 дм³ (Фастов, Украина), используемый в производстве холерной вакцины.

Концентрирование формализированной биомассы перед выделением антигена (АГ) осуществляли на центрифуге Beckman (Германия) при 15000 g.

Качество питательных сред оценивали по биологическим показателям согласно МУ 3.3.2.2124-06. Эффективность экспериментальных питательных сред при глубинном культивировании штаммов *V. cholerae* определяли как по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды, учитывая концентрацию микробных клеток в осадке после центрифугирования культуральной среды, так и по количеству продуцируемого вибрионами О-антигена (О-АГ) и холерного токсина (ХТ) на 1 мл среды. Материалом для выделения холерных антигенов служили обработанные формалином центрифугаты бульонной культуры указанных штаммов холерного вибриона.

Для количественной оценки О-АГ в центрифугате бульонной культуры *V. cholerae* М-41 применяли регламентированный тест – реакцию диффузионной

преципитации (РДП) в агаровом геле по Оухтерлони со специфическими агглютинирующими сыворотками производства РосНИПЧИ «Микроб» и иммуноферментный анализ (ИФА) с конъюгатом. Продукцию ХТ токсин-продуцирующим штаммом *V. cholerae* 569 В определяли в ИФА с GM1-ганглиозидами и антитоксической холерной сывороткой или в dot-иммуноанализе с стафилококковым белком А, меченным наночастицами коллоидного золота.

Для определения концентрации холерных вибрионов использовали отраслевой стандартный образец (ОСО) мутности 42-28-85-П ФГБУ НЦЭСМП (Москва).

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

В условиях малообъемного (125 мл) глубинного культивирования в термостатируемом шейкер-инкубаторе RC-ТК штаммы холерных вибрионов выращивали на экспериментальных и контрольных ПС в течение 9–10 ч при температуре (36±1) °С для *V. cholerae* М-41 и (30±1) °С для *V. cholerae* 569 В. Посевная доза, приготовленная по ОСО мутности, составляла 1 млрд м.к.

Морфологические и биохимические свойства штаммов холерного вибриона, выращенных на экспериментальных ПС, были типичными и не отличались от свойств штаммов, культивированных на контрольных средах, что свидетельствует о стабильности основных свойств штаммов холерного вибриона и оптимальном составе сред.

В таблице представлены результаты малообъемного глубинного культивирования штаммов *V. cholerae* O1 М-41 и *V. cholerae* O1 569 В в термостатируемом шейкере-инкубаторе RC-ТК на экспериментальных и контрольных ПС. В каждом эксперименте были использованы по три экспериментальные серии ПС, приготовленные из трех серий питательных основ. Анализ эффективности ПС по выходу биомассы холерных вибрионов и синтезу антигенного продукта (О-АГ и ХТ) выявил индивидуальную чувствительность каждого штамма к составу среды, что согласуется с литературными данными по оптимальным условиям для синтеза АГ штаммами-продуцентами [11].

Отмечено, что для накопления биомассы и синтеза О-АГ при культивировании штамма *V. cholerae* М41 оптимальной являлась среда на основе АПД, которая обеспечила выход биомассы культивируемого штамма на уровне (48,0±0,7) мг/мл и продукцию холерным вибрионом О-АГ в количестве (1,2±0,03) мг/мл ($t_{cr} < 2$, $p < 0,05$). Традиционная среда на основе ГХ уступала дрожжевым экспериментальным средам по количеству выхода биомассы штамма *V. cholerae* М41 – (32,8±0,4) мг/мл, однако превосходила экспериментальные среды по способ-

Накопление биомассы и продукция О-антигена и холерного токсина штаммами *V. cholerae* O1 при малообъемном глубинном культивировании на экспериментальных и традиционной питательных средах

Штамм	Питательная среда	N амин., %	Накопление биомассы, мг/мл среды	Продукция АГ			
				О-АГ, обратный титр в РДП	О-АГ, мг/мл в ИФА	ХТ, обратный титр в РДП	ХТ, мкг/мл в ИФА
<i>V. cholerae</i> M41	ГФ	0,1	30,8±0,8	32	1,28±0,05	-	-
	КС (ГФ+1% АПД)	0,12	34,8±0,5	16	0,7±0,08	-	-
	АПД	0,03	48,0±0,7	1	1,2±0,03	-	-
	ГХ	0,12	32,8±0,4	32	1,6±0,02	-	-
<i>V. cholerae</i> 569В	ГФ	0,1	38,2±0,8	8	2,4±0,04	32	8,73±0,08
	КС (ГФ+1% АПД)	0,12	39,1±0,7	8	1,6±0,03	8	6,95±0,06
	АПД	0,03	20,1±0,7	4	2,5±0,05	16	7,18±0,03
	ГХ	0,12	40,0±0,4	8	1,28±0,09	4	8,75±0,06

Примечание. «-» – не проводили измерений.

ности продукцировать на ней О-АГ – (1,6±0,02) мг/мл. Среда на основе ГФ по эффективности оказалась близка к контрольной среде при культивировании на ней *V. cholerae* M41 и обеспечила выход биомассы в количестве (30,8±0,8) мг/мл, а синтез культивируемым штаммом О-АГ – (1,28±0,05) мг/мл.

При малообъемном культивировании штамма *V. cholerae* 569 В на экспериментальных и контрольной ПС не отмечено достоверной разницы при накоплении биомассы на средах из ГФ, КС и ГХ – (40,0±0,4), (38,2±0,8) и (39,1±0,7) мг/мл соответственно, но по этому показателю все они были значительно эффективнее среды на основе АПД – (20,1±0,7) мг/мл. При культивировании на ПС, содержащих АПД, *V. cholerae* 569 В синтезировал ХТ в количестве (6,95±0,06) мкг/мл на КС и (7,18±0,03) мкг/мл на среде из АПД, уступая по данному показателю холерным вибрионам, культивированным на среде из ГФ и контрольной среде, – (8,73±0,08) и (8,75±0,06) мкг/мл соответственно.

При проведении сравнительного иммунохимического анализа выявлено, что *V. cholerae* 569 В при глубинном культивировании на среде из ГФ синтезировал О-АГ в количестве 2,4 мкг/мл, на среде из АПД – 2,5 мкг/мл, и эти результаты значительно превышали количество О-АГ, полученного после культивирования штамма на контрольной среде – (1,28±0,09) мкг/мл ($t_{cr} < 2, p < 0,05$). На комбинированной среде штамм *V. cholerae* 569 В синтезировал О-АГ достоверно меньше – (1,6±0,03) мкг/мл, чем на средах ГФ и АПД, однако превосходил результат, полученный с контрольной среды, – (1,28±0,09) мкг/мл ($t_{cr} < 2, p < 0,05$).

Таким образом, в экспериментах по малообъемному культивированию производственных штаммов холерного вибриона в шейкере-инкубаторе РС-ТК показана эффективность разработанных ПС на основе АПД и ГФ, данные среды по выходу биомассы и способности культивируемых на них штаммов продукцировать О-АГ и ХТ, в целом, не уступали традиционной среде из ГХ.

На основании результатов, полученных при малообъемном культивировании производственных штаммов холерного вибриона в шейкере-инкубаторе РС-ТК, представлялось целесообраз-

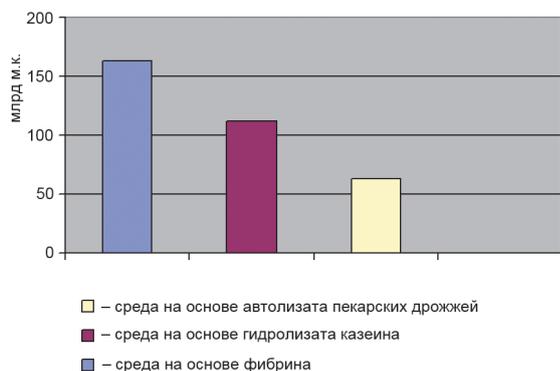
ным проведение экспериментального выращивания штамма *V. cholerae* М-41 в условиях глубинного культивирования в реакторе-ферментере объемом 500 дм³ на ПС из ГФ и АПД и на контрольной среде из гидролизата казеина (ГК). Среда на основе гидролизата казеина с добавлением 1 % пептона выбрана в качестве контрольной, так как используется для производственного культивирования штаммов холерного вибриона в соответствии с ПР 01898109-39-12 «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой».

Все ПС имели реакцию рН (7,8±0,2), содержание аминного азота составляло 0,2 % для ПС на основе ГФ и ГК и 0,05 % для ПС на основе АПД. Дополнительно в состав среды были включены соли NaCl в концентрации 0,5 % и Na₂HPO₄·x12H₂O в концентрации 0,006 %.

При глубинном культивировании *V. cholerae* М-41 в условиях ферментера при температуре (37±1) °С с автоматической подкормкой 40 % глюкозой и коррекцией рН аммиаком наиболее эффективной оказалась среда на основе ГФ – через 10 ч культивирования концентрация холерных вибрионов составила 158 млрд м.к./мл, в то время как на традиционной среде из ГК – 111,4 млрд м.к./мл. Наименее эффективной оказалась среда на основе АПД – через 10 ч культивирования зарегистрирована концентрация 64 млрд м.к./мл (рисунок).

В условиях масштабированного культивирования *V. cholerae* М-41 в реакторе-ферментере на среде с основой АПД выявлена тенденция быстрого закисления культуральной жидкости после трех часов культивирования, что создало проблему с поддержанием оптимального уровня рН. Возможно, проблема связана с неоптимальным режимом подкормки раствором 40 % глюкозы, поскольку среда на основе АПД уже имеет в своем составе глюкозу. В ряде работ установлено, что избыточное добавление глюкозы в культуральную жидкость в ходе периодического глубинного культивирования холерных вибрионов приводит к закислению, уменьшению скорости роста микроорганизмов и, соответственно, уменьшению накопления антигенов [10, 12].

При определении количества О-АГ в центрифугатах формализированной культуры *V. cholerae*



Эффективность жидких питательных сред по накоплению биомассы *V. cholerae* O1 M-41 в условиях глубинного культивирования в реакторе-ферментере

M-41, выращенной на экспериментальных средах из ГФ и АПД и контрольной ПС на основе ГК регистрировали положительную РДП в разведении 1/16, 1/4 и 1/8 соответственно.

Таким образом, сравнивая эффективность питательных сред на основе ферментативного гидролизата фибрина и автолизата пекарских дрожжей при глубинном культивировании *V. cholerae* M41 в условиях ферментера, можно сделать вывод о перспективности использования данных сред в производстве холерной вакцины. Применение среды на основе гидролизата фибрина позволит комплексно решить проблему утилизации белкового отхода, образующегося при производстве антирабического иммуноглобулина, снизить экологическую нагрузку на внешнюю среду и получить благоприятный экономический эффект.

Работа выполнена в рамках плановых НИР 40-2-09 «Оптимизация технологических этапов производства МИБП и разработка новых препаратов для диагностики особо опасных инфекций», № государственной регистрации 0120.0853923 и НИР 48-2-14 «Разработка и внедрение в производство МИБП новых решений, направленных на повышение качества препаратов и эффективности технологических процессов» (2014-2016), № государственной регистрации 01201457722.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонычева М.В., Нижегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.А., Шульгина И.В., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования холерного вибриона. Патент № 2425866 РФ, опубл. 10.08.11 г. Бюл. № 22.
2. Базлов Г.В., Авдеева Н.Г., Никифоров А.К., Еремин С.А., Волох О.А., Самохвалова Ю.И., Антонычева М.В., Белоусов А.Д., Комиссаров А.В., Сергеева И.В. Конструирование питательных сред на основе дрожжевого автолизата пекарских дрожжей для культивирования холерного вибриона в производстве вакцины холерной бивалентной химической таблетированной. *Вестник Саратовского государственного университета им. Вавилова*. 2012; 3:7–11.
3. Еремин С.А., Аleshina Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор). *Пробл. особо опасных инф.* 2013; 4:95–101.
4. Жулидов И.М., Абрамова Е.Г., Никифоров А.К., Антонычева М.В., Шульгина И.В., Лобовикова О.А., Вахрушина Н.И., Белоусов А.Д., Еремин С.А., Киреев М.Н., Шарпапова Н.А., Савицкая Л.В., Михеева Т.А., Минаева Л.Н., Галкина М.В., Свинцов Р.А., Аленкина Т.В., Васин Ю.Г., Базлов Г.В. Безотходные технологии в производстве гетерологичного антирабического иммуноглобулина. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 4:80–4.
5. Каминский Д.И., Мазрухо А.Б., Ломов Ю.М., Рожков К.И., Криваченко И.Б., Овсова Л.М., Монахова Е.В., Кругликов В.Д., Мазрухо Б.Л., Авдеева Е.П., Булахова О.Г., Киреев Е.Г., Долгова А.Б., Ершченко К.В. Оценка жидкой накопительной питательной среды ХДС-Н для культивирования и выделения холерного вибриона. *Биотехнология*. 2003; 4:70.
6. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Киреев М.Н., Плотников О.П., Грачева И.В., Виноградова Н.А., Солодовников Н.С., Нижегородцев С.А., Антонычева М.В. Способ получения питательной основы и питательная среда для культивирования микроорганизмов рода *Yersinia* и *Vibrio*. Патент № 2360962 РФ, опубл. 10.07.09 г. Бюл. № 19.
7. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Кругликов В.Д., Гончаренко Е.В., Тришина А.В., Пухов Ю.М., Прометный В.И., Пичурина Н.Л. Результаты использования нового комплекса питательных сред для диагностики холерного вибриона в ходе тактико-специального учения специализированной противочумной бригады. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 3:54–7.
8. Мазрухо А.Б., Шелохович А.И., Харабаджакян Г.Д., Карбышев Г.Л., Терентьев А.Н., Кругликов В.Д. и др. Оценка биологических показателей новой электроно-дифференциальной среды для выделения холерных вибрионов (СЭДХ-М) по результатам лабораторных испытаний. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 2:64–7.
9. Рекус И.Г., Шорина О.С. Основы экологии и рационального природопользования. М.: МГУП; 2001. 146 с.
10. De Mary L., Andersson L., Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2004; 25(4):221–8.
11. Evans D.J., Richardson S.H. In vitro production of cholera toxin and the vascular permeability factor by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1968; 96(1):126–30.
12. Suzuki H., Kishimoto M., Kamoshita T. On-line control of feeding of medium components to attain high cell density. *Bioprocess Eng.* 2000; 22:433–40.

1. Антонычева М.В., Низегородцев С.А., Еремин С.А., Аленкина Т.А., Шульгина И.В., Белоусов А.Д., Жулидов И.М., Никифоров А.К. [Nutrient medium for cholera vibrio submerged cultivation]. RF Patent No 2425866, 10.08.2011.
2. Bazlov G.V., Avdeeva N.G., Nikiforov A.K., Eremin S.A., Volokh O.A., Samokhvalova Yu.I., Antonycheva M.V., Belousov A.D., Komissarov A.V., Sergeeva I.V. [Construction of bakery yeast autolyzate-based nutrient media for cholera vibrio cultivation in manufacturing bivalent chemical tableted cholera vaccine]. *Bul. Saratov Gos. Agrar. Univer.* 2012; 3:7–11.
3. Eremin S.A., Aleshina Yu.A., Komissarov A.V., Gromova O.V., Vasin Yu.G., Nikiforov A.K., Livanova L.F., Volokh O.A., Lobovikova O.A., Bronnikova V.S. [Methods and technologies of cholera vibrio cultivation (Scientific Review)]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2013; 4:95–101.
4. Zhulidov I.M., Abramova E.G., Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Shul'gina I.V., Lobovikova O.A., Vakhrushina N.I., Belousov A.D., Eremin S.A., Kireev M.N., Sharapova N.A., Savitskaya L.V., Mikheeva T.A., Minaeva L.N., Galkina M.V., Svintsov R.A., Alenkina T.V., Vasin Yu.G., Bazlov G.V. [Non-waste alternative technologies in the production of heterologous antibodies immunoglobulin]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 4:80–4.
5. Kaminsky D.I., Mazrukho A.B., Lomov Yu.M., Rozhkov K.I., Krivachenko I.B., Ovsova L.M., Monakhova E.V., Savidkova V.D., Mazrukho B.L., Avdeeva E.P., Bulakhova O.G., Kireev E.G., Dolgova A.B., Eroshenko K.V. [Evaluation of liquid accumulative nutrient medium, CDM-A, for cholera vibrio cultivation and extraction]. *Biotekhnologiya*. 2003; 4:70.
6. Kuz'michenko I.A., Gromova O.V., Kireev M.N., Plotnikov O.P., Gracheva I.V., Vinogradova N.A., Solodovnikov N.S., Nizhegorodtsev S.A., Antonycheva M.V. [Method for the production of nutrient substrate and nutrient media for cultivation of microorganisms, genus *Yersinia* and *Vibrio*]. RF Patent No 2360962, 10.07.09.
7. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Rozhkov K.K., Kruglikov V.D., Goncharenko E.V., Trishina A.V., Pukhov Yu.M., Prometny V.I., Pichurina N.L. [Results of application of the new nutrient media set for cholera diagnostics within the frames of the special tactical training exercises for specialized anti-epidemic team]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 3:54–7.
8. Mazrukho A.B., Shelokhovich A.I., Harabadzhakian G.D., Karbyshhev G.L., Terent'ev A.N., Kruglikov V.D., Grigorenko L.V., Agapohova V.V., Savel'eva I.K., Simakova D.I., Sokirkina O.G., Bulakhova O.G., Gorenkova I.S. [Evaluation of biological properties of new selective differential medium for cholera vibrios isolation based on the results of laboratory trials]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 2:64–7.
9. Rekus I.G., Shorina O.S. [Basic Principles of Ecology and Rational Environmental Management]. М.: 2001. 146 p.
10. De Mary L., Andersson L., Hagander P. Probing control of glucose feeding in *Vibrio cholerae* cultivation. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 2004; 25(4):221–8.
11. Evans D.J., Richardson S.H. In vitro production of cholera toxin and the vascular permeability factor by *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1968; 96(1):126–30.
12. Suzuki H., Kishimoto M., Kamoshita T. On-line control of feeding of medium components to attain high cell density. *Bioprocess Eng.* 2000; 22:433–40.

References

Authors:
Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Volokh O.A., S.A. Eremin, Kireev M.N., Zhulidov I.M., Aleshina Yu.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Kholmatov K.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:
Никифоров А.К., Антонычева М.В., Волох О.А., Еремин С.А., Киреев М.Н., Жулидов И.М., Аleshina Ю.А., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Холматов К.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 04.12.14.