

Ю.С.Ковтун, А.А.Курилова, Л.С.Катунина, Е.И.Василенко

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ ПРИ РАЗРАБОТКЕ НА ИХ ОСНОВЕ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БРУЦЕЛЛ

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Цель. Сравнительная оценка специфической активности панкреатических гидролизатов белковых продуктов растительного и животного происхождения в отношении тест-штаммов бруцелл, конструирование на основе проведенной оценки модели питательной среды для культивирования бруцелл и изучение ее биологических показателей. **Материалы и методы.** Объектами исследования являлись панкреатические гидролизаты желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, кильки каспийской, крови КРС, приготовленные по традиционной технологии. Определение биологических показателей питательных сред, содержащих изучаемые гидролизаты, проводили с помощью тест-штаммов *Brucella abortus* 19 BA, *B. melitensis* Rev I. **Результаты и обсуждение.** Лучшими биологическими показателями в отношении указанных штаммов бруцелл обладал гидролизат желатина. Изучены биологические показатели питательных сред, содержащих сочетания гидролизата желатина с другими взятыми в работу гидролизатами. Разработана экспериментальная питательная среда для культивирования бруцелл. Проведена ее сравнительная оценка с двумя коммерческими средами, применяемыми для культивирования бруцелл.

Ключевые слова: гидролизат, питательная среда, биологические показатели, бруцеллы.

Корреспондирующий автор: Юрий Сергеевич Ковтун, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Yu.S.Kovtun, A.A.Kurilova, L.S.Katunina, E.I.Vasilenko

Comparative Evaluation of Protein Hydrolysates in the Process of Constructing Based on Them Nutrient Medium for *Brucella* Cultivating

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation

Objective of the study is to conduct comparative assessment of specific activity of pancreatic hydrolysates of protein-containing products, both phylogenous and zoogenous, as regards *Brucella* test strains; and consequently, to develop nutrient medium for *Brucella* cultivation, to study its biological parameters. **Materials and methods.** Gelatin, soy, soy concentrate, corn gluten, fish meal, freshly frozen Caspian sprat, and bovine blood pancreatic hydrolysates, obtained using conventional methodology, served as the test objects. Determination of biological parameters of nutrient media, containing the studied hydrolysates was carried out using the test-strains of *Brucella abortus* 19 BA and *B. melitensis* Rev I. **Results and discussion.** Gelatin hydrolysate has the best biological parameters as regards the *Brucella* strains. Studied have been biological parameters of nutrient media, containing combination of gelatin hydrolysate and other selected hydrolysates. Experimental nutrient medium for *Brucella* cultivation has been developed. Comparative assessment of the experimental nutrient medium and two other commercial media used for cultivating *Brucella* has been performed.

Key words: hydrolysate, nutrient medium, biological parameters, *Brucella*.

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

Corresponding author: Yury S. Kovtun, e-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Citation: Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Comparative Evaluation of Protein Hydrolysates in the Process of Constructing Based on Them Nutrient Medium for *Brucella* Cultivating. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; 4:93–97. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-93-97

При разработке и производстве микробиологических питательных сред актуальной задачей остается поиск сырья для белковых основ, не уступающих мясным по питательной ценности и удовлетворяющих требованиям стандартности и безопасности [1, 3]. Основными аргументами использования альтернативных источников сырья являются экономические факторы, экологические соображения, а также то обстоятельство, что в ряде случаев получаемые основы по отдельным качественным показателям превосходят традиционно применяемые пептоны. В нашей стране было выполнено большое количество исследований по использованию различных

видов белкового сырья для изготовления гидролизатов, применяемых в производстве питательных сред. Показана целесообразность их использования для решения конкретных задач. Однако, по нашему мнению, в доступной литературе недостаточно сравнительных данных о специфической активности пептонов, полученных из различных видов белкового сырья, в отношении микроорганизмов разных таксономических групп.

Для увеличения номенклатуры пептонов, применяемых при изготовлении микробиологических питательных сред, и определения путей их оптимального использования нами ранее была проведена

сравнительная оценка физико-химических свойств панкреатических гидролизатов желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, свежемороженой каспийской кильки, крови крупного рогатого скота (КРС), а также изучена специфическая активность питательных сред, включающих данные пептоны на модели питательного агара с использованием тест-штаммов бактерий *Shigella flexneri* 1a 8516, *S. sonnei* «S form», *Pseudomonas aeruginosa* 27/99, *Serratia plymuthica* 1 [2]. Для более детальной характеристики вышеперечисленных гидролизатов предполагалось также изучение их биологических показателей в отношении микроорганизмов других таксономических групп. В настоящей работе представлены результаты изучения гидролизатов с помощью тест-штаммов бруцелл.

Цель работы – сравнительная оценка специфической активности панкреатических гидролизатов желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, свежемороженой каспийской кильки, крови (КРС) в отношении тест-штаммов *Brucella abortus* 19 VA, *B. melitensis* Rev I, конструирование на основе проведенной оценки модели питательной среды для культивирования бруцелл и изучение ее биологических показателей с целью конкретизации потенциальной области применения.

Материалы и методы

Объектами исследования являлись панкреатические гидролизаты желатина, сои, соевого концентрата, глютена кукурузного, рыбной кормовой муки, кильки каспийской, крови КРС, приготовленные по традиционной технологии.

Для определения биологических показателей питательных сред, содержащих изучаемые гидролизаты, использовали тест-штаммы *B. abortus* 19 VA, *B. melitensis* Rev I, полученные из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России и из ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи МЗ РФ.

Определение биологических показателей моделей питательных 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».

Для изготовления моделей питательных сред использовали: агар микробиологический (ГОСТ 17206-96), натрия хлорид (ГОСТ 4233-77), D-глюкозу (ГОСТ 6038-79), натрий сернистокислый пиро (ГОСТ 11683-76), дрожжевой экстракт (марка «Springer» тип Д), воду дистиллированную (ГОСТ 6709-72).

В качестве сред сравнения использовали питательную среду для выделения и культивирования бруцелл сухую (эритрит агар) производства ФГУП

«НПО «Микроген» МЗ РФ, питательный агар для культивирования и выделения возбудителя бруцеллеза сухой (бруцеллагар) производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» и основу агара для бруцелл (*Brucella Agar Base* код M074) производства HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия).

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

Результаты и обсуждение

Биологические показатели изготовленных гидролизатов в отношении вакцинных штаммов бруцелл *B. abortus* 19 VA, *B. melitensis* Rev I были изучены на агаровых питательных средах, включающих: гидролизат из расчета содержания в 1 л среды 12 г сухих веществ; глюкозу – 1 г/л; натрия хлорид с учетом вещества, содержащегося в гидролизате, вводили до содержания его в среде 5 г/л; агар микробиологический добавляли в количестве, обеспечивающем прочность готовой среды (340±40) г. pH агара устанавливали в пределах (7,1±0,1). В качестве контроля использовали эритрит агар.

О специфической активности питательных сред в отношении возбудителя бруцеллеза судили по количеству и морфологии колоний тест-штаммов *B. abortus* 19 VA и *B. melitensis* Rev I, выросших через 72 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Результаты изучения биологических показателей питательных сред, содержащих гидролизаты изучаемого белкового сырья, представлены в табл. 1.

Полученные данные свидетельствуют, что лучшие биологические показатели в отношении обоих штаммов бруцелл были у сред, содержащих гидролизат желатина. Питательные среды, включающие данный гидролизат, по показателю прорастания не уступали, а по размеру выросших колоний превосходили эритрит агар, используемый в качестве контрольной среды. Средам на основе гидролизата желатина несколько уступали среды на основе гидролизатов глютена и соевого концентрата, более существенно – среды на основе гидролизатов сои и кильки (p<0,05). На средах из гидролизата крови отсутствовал рост тест-штамма *B. melitensis* Rev I, а на средах из гидролизата рыбной муки отмечались только единичные колонии этого тест-штамма, рост тест-штамма *B. abortus* 19 VA отсутствовал.

Исходя из полученных данных, а также принимая во внимание то обстоятельство, что качество питательной среды можно улучшить, сочетая несколько гидролизатов, мы провели изучение специфической активности агаризованных сред, содержащих в качестве питательной основы смеси гидролизатов желатина с другими гидролизатами в соотношении 2:1 по содержанию сухих веществ. Содержание сухих веществ такой комплексной питательной основы так же, как и в предыдущей се-

Биологические показатели питательных сред, содержащих гидролизаты различного белкового сырья

Тест-штаммы	Наименование показателей	Питательные агары, содержащие гидролизаты:							Эритрит агар (контроль)
		рыбной муки	кильки	желатина	крови КРС	глутена	сои	соевого концентрата	
<i>B. abortus</i> 19 BA	Чувствительность	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷						
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % М±m	Роста нет	48,06±6,67	86,52±8,89	17,59±6,42	67,00±9,55	24,06±6,20	92,13±9,54	82,73±2,07
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний, мм; морфология; % диссоциации)	-	0,6–1,4; S-колонию; 0	1,2–1,9; S-колонию; 0	0,4–1,0; S-колонию; 0	0,8–1,6; S-колонию; 0	0,4–0,8; S-колонию; 0	1,0–1,8; S-колонию; 0	0,7–1,5; S-колонию; 0
<i>B. melitensis</i> Rev I	Чувствительность	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % М±m	Единичные колонии	5,76±1,95	70,78±6,02	Роста нет	41,08±6,61	11,41±2,35	31,13±2,50	66,82±2,57
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний, мм; морфология; % диссоциации)	0,4–1,2; S-колонию; 0	0,7–1,5; S-колонию; 0	1,2–1,8; S-колонию; 0	-	0,8–1; S-колонию; 0	0,3–0,6; S-колонию; 0	1,0–1,9; S-колонию; 0	0,6–1,5; S-колонию; 0

рии опытов, составляло 12 г/л.

Примененный подход, в сравнении с использованием в качестве питательной основы отдельных гидролизатов, как правило, приводил к увеличению количества и размера вырастающих колоний бруцелл. Так, при посеве из разведения 10⁻⁶ через 72 ч инкубации при температуре (37±1) °С на изучаемых средах наблюдалось варьирование показателя прорастания *B. abortus* 19 BA от (82,06±1,88) до (96,58±2,59) %, диаметра колоний – от 0,9–1,6 до 1,2–1,9 мм. Показатель прорастания *B. melitensis* Rev I находился в пределах от (72,26±4,00) до (82,76±3,71) %, диаметр колоний – от 0,8–1,6 до 1,2–1,8 мм.

Исключение составляли среды, содержащие гидролизаты желатина и крови, показатель прорастания *B. melitensis* Rev I которых – (42,00±7,16) %, значительно уступал аналогичному показателю других сред (p<0,05). Ниже на средах с вышеупомянутой комбинацией гидролизатов был и показатель прорастания *B. abortus* 19 BA – (72,40±9,98) %, а выросшие на них колонии бруцелл отличались и меньшим диаметром: 0,5–0,8 и 0,5–1,0 мм соответственно. Показатели прорастания и размер колоний *B. abortus* 19 BA и *B. melitensis* Rev I, выросших на эритрит агаре, взятом в качестве среды сравнения, составили, соответственно, (84,19±4,03), (74,78±4,42) % и 0,8–1,6 мм, 0,6–1,5 мм.

С целью повышения специфической активности питательных сред, включающих сочетания гидролизата желатина с гидролизатами кильки, рыбной муки, сои и глутена, в них были добавлены дрожжевой экстракт в концентрации 2 г/л и натрий сернистокислый пиро в концентрации 0,1 г/л. Выбор концентраций этих веществ обусловлен тем, что они приводятся в большинстве известных рецептов питательных сред для культивирования бруцелл [4, 5]. Результаты изучения биологических показателей приготовленных таким образом питательных сред представлены в табл. 2.

Добавление дрожжевого экстракта и натрия

сернисто-кислого пиро способствовало увеличению размера колоний бруцелл на 0,1–0,3 мм на всех изучаемых вариантах питательных сред через 72 ч инкубации при температуре (37±1) °С. Количество выросших колоний на средах, включающих гидролизат желатина и гидролизаты кильки или рыбной муки, также увеличивалось. Внесение дрожжевого экстракта и натрия сернисто-кислого пиро в агар, содержащий гидролизаты желатина и глутена, приводило к увеличению числа колоний *B. melitensis* Rev I и уменьшению количества колоний *B. abortus* 19 BA, а введение вышеуказанных компонентов в агар, включающий гидролизаты желатина и сои, приводило к сокращению количества колоний обоих тест-штаммов.

Исходя из полученных результатов, а также учитывая технологичность изготовления гидролизатов, в качестве перспективного для дальнейших исследований был выбран вариант питательной среды, включающей комбинацию гидролизата желатина и гидролизата рыбной муки, дрожжевой экстракт, натрий сернисто-кислый пиро, натрий хлористый, глюкозу, агар микробиологический. Проведено сравнительное изучение выбранного варианта среды с бруцеллагаром и основой агара для бруцелл (*Brucella Agar Base*) по физико-химическим и биологическим показателям. При сравнении физико-химических показателей следует отметить высокую прозрачность и низкую цветность разработанной среды, что выгодно отличает ее от бруцеллагара. Результаты изучения биологических показателей сравниваемых сред, а также требования к биологическим показателям питательных сред для выделения и культивирования возбудителя бруцеллеза в соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» представлены в табл. 3.

Из табл. 3 видно, что по количеству выросших колоний бруцелл экспериментальные среды и бру-

Влияние дрожжевого экстракта и натрия сернисто-кислого пиро на специфическую активность изучаемых питательных сред

Тест-штаммы	Наименование показателей	Питательные агары, содержащие гидролизат желатина в смеси с гидролизатом:								Бруцеллагар
		кильки		рыбной муки		сои		глутена		
		1	2	1	2	1	2	1	2	
<i>B. abortus</i> 19 VA	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % M±m	72,04±7,86	87,30±3,05	89,14±2,61	97,53±3,33	98,67±4,38	87,20±4,82	98,90±3,35	89,91±3,25	95,67±5,05
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний, мм; морфология; % диссоциации)	1,0–1,7; S-колони; 0	1,3–1,9; S-колони; 0	1,4–2,0; S-колони; 0	1,5–2,2; S-колони; 0	0,9–1,6; S-колони; 0	1,1–1,7; S-колони; 0	1,2–1,8; S-колони; 0	1,5–2,1; S-колони; 0	1,0–1,5; S-колони; 0
<i>B. melitensis</i> Rev I	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % M±m	75,33±4,58	88,37±4,37	83,25±2,63	88,63±2,17	89,33±3,50	80,53±3,35	79,64±2,82	85,33±2,60	87,72±4,67
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний, мм; морфология; % диссоциации)	1,2–1,7; S-колони; 0	1,4–1,9; S-колони; 0	1,4–2,0; S-колони; 0	1,5–2,1; S-колони; 0	1,3–1,8; S-колони; 0	1,5–2,0; S-колони; 0	1,4–1,9; S-колони; 0	1,5–2,0; S-колони; 0	1,0–1,4; S-колони; 0

Примечание: 1 – среды, не содержащие дрожжевой экстракт и натрий сернисто-кислый пир; 2 – среды с добавлением дрожжевого экстракта и натрия сернисто-кислого пиро.

целлагар были равнозначны и существенно превосходили Brucella Agar Base (p<0,05). Колонии штаммов *B. abortus* 19 VA и *B. melitensis* Rev I, выросшие на разработанной среде, в диаметре были на 15–30 % больше колоний, выросших на бруцеллагаре. Колонии, сформировавшиеся через 72 ч инкубации на Brucella Agar Base, в диаметре были меньше колоний, выросших на разработанной среде через 48 ч инкубации. Однако выход микробных клеток с 1 мл разработанной среды, измеренный с применением отраслевого стандартного образца (ОСО) мутности 42-28-85 (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП, значительно уступал аналогичному показателю бруцеллагара и основе агара для бруцелл.

Таким образом, проведена сравнительная оценка биологических свойств панкреатических гидроли-

затов семи видов белкового сырья в отношении вакцинных штаммов бруцелл, на ее основе предложена рецептура плотной питательной среды для культивирования данных микроорганизмов. По большинству показателей разработанная среда превосходила среды сравнения, однако по показателю эффективности уступала им. Это лимитирует применение среды для накопления бактериальной массы бруцелл, но возможно ее использование для культивирования производственных штаммов на этапе исследования их свойств и подготовки посевной культуры при производстве медицинских иммунобиологических препаратов. Низкая цветность разработанной среды в сочетании с высокими прозрачностью, чувствительностью и скоростью роста микроорганизмов не исключают перспективы ее применения в диагностической

Таблица 3

Сравнительная характеристика биологических показателей изучаемых питательных сред для культивирования бруцелл

Тест-штаммы	Наименование показателей	Требования по МУ 3.3.2.2124-06	Экспериментальная питательная среда	Среды сравнения	
				бруцеллагар	Brucella Agar Base
<i>B. abortus</i> 19 VA	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % M±m	Не менее 60	97,88±4,87	91,42±6,21	50,98±8,72
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 48/72 ч инкубации, мм; морфология; % диссоциации)	н.н.; S-колони; 0	0,4–1,0/1,6–2,3; S-колони; 0	0,3–0,7/1,2–1,7; S-колони; 0	Точечные/0,3–0,8; S-колони; 0
	Эффективность, м.к./мл	н.н.	6,12·10 ⁹	9,95·10 ⁹	9,01·10 ⁹
<i>B. melitensis</i> Rev I	Чувствительность	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
	Прорастание (из разведения 10 ⁻⁶), % M±m	Не менее 60	90,04±2,68	90,06±4,42	67,22±9,48
	Стабильность основных свойств по морфологии колоний (диаметр колоний через 48/72 ч инкубации, мм; морфология; % диссоциации)	н.н.; S-колони; 0	0,4–1,0/1,5–2,0; S-колони; 0	0,3–0,6/1,0–1,6; S-колони; 0	Точечные/0,3–0,8; S-колони; 0
	Эффективность, м.к./мл	н.н.	6,21·10 ⁹	12,4·10 ⁹	13,43·10 ⁹

Примечание: н.н. – не нормируется.

практике. Для этого требуется дальнейшее изучение биологических показателей среды с помощью расширенного набора тест-штаммов бруцелл.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Калягина С.Ю. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка ее свойств. *Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 3:91–4.
2. Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Чурикова Н.В. Сравнительная оценка потенциальных белковых основ микробиологических сред. *Пробл. особо опасных инф.* 2014; 3:92–5.
3. 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. *Пробл. особо опасных инф.* 2015; 1:85–8.
4. Диагностика особо опасных инфекций (ООИ). HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия). [Электронный ресурс]. URL: <http://www.himedialabs.ru/m074-m348/> (дата обращения 15.01.2016 г.).
5. Difco and BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media, 2nd edition. Becton Dickinson and Company; 2009. P 104.

References

1. Kalyagina S.Yu. [Construction of nutrient medium from meat by-products and wastes and evaluation of its properties]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 3:91–4.
2. Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Churikova N.V. [Comparative assessment of prospective protein bases for microbiological media]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2014; 3:92–5.
3. Nikiforov A.K., Antonycheva M.V., Volokh O.A., Eremin S.A., Kireev M.N., Zhulidov I.M., Afeshina Yu.A., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Kholmatov K.I. [Development of food-raw-material-based nutrient media for submerged cultivation of cholera vibrio strains]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2015; 1:85–8.
4. [Diagnostics of particularly dangerous infections (PDI)]. HiMedia Laboratories Pvt. Limited (India) [cited 15 Jan 2016]. Available from: <http://www.himedialabs.ru/m074-m348/>
5. Difco and BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media, 2nd edition. Becton Dickinson and Company; 2009. P 104.

Authors:

Kovtun Yu.S., Kurilova A.A., Katunina L.S., Vasilenko E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Об авторах:

Ковтун Ю.С., Курилова А.А., Катунина Л.С., Василенко Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru.

Поступила 09.02.16.