

О.А.Волох, М.В.Антонычева, Н.Г.Авдеева, Е.М.Кузнецова, К.И.Холматов, Д.Н.Бибиков,
А.К.Никифоров

ЖИДКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ТУЛЯРЕМИЙНОГО МИКРОБА

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

В работе представлена эффективная жидкая питательная среда, использование которой позволяет при глубинном культивировании вакцинного штамма туляремиального микроба получать высокие концентрации жизнеспособной биомассы с низкой степенью диссоциации, что актуально при производстве живых вакцин. В качестве питательной основы новой питательной среды использовали сухой ферментативный гидролизат фибрина, приготовленный из отхода производства антирабического иммуноглобулина.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, питательная среда, культивирование.

Корреспондирующий автор: Волох Оксана Александровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

O.A.Volokh, M.V.Antonycheva, N.G.Avdeeva, E.M.Kuznetsova, K.I.Kholmato, D.N.Bibikov, A.K.Nikiforov

Liquid Nutrient Medium for Submerged Cultivation of Tularemia Microbe

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

The paper describes an effective liquid nutrient medium, utilization of which in the process of submerged cultivation of the vaccine tularemia microbe strain allows for the production of high concentrations of viable biomass with low rates of dissociation, which is essential in manufacturing of live vaccines. Dry enzymatic hydrolysate of fibrin, by-product of anti-rabies immunoglobulin production is used as a nutrient-rich base of the new nutrient medium.

Key words: *Francisella tularensis*, nutrient medium, cultivation.

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

Corresponding author: Oksana A. Volokh, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M., Kholmato K.I., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Liquid Nutrient Medium for Submerged Cultivation of Tularemia Microbe. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2017; 2:81–83. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-2-81-83

Живая туляремиальная вакцина (ЖТВ) является основным профилактическим средством против туляремии – опасной природно-очаговой болезни. Штаммом-продуцентом ЖТВ является штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ. Он же используется для изготовления диагностических препаратов. Для производства данных иммунобиологических препаратов необходимо получение большого количества биомассы, обладающей характерными свойствами. В связи с этим актуальной задачей остается конструирование новых эффективных питательных сред для глубинного культивирования, позволяющего масштабировать процесс производства.

Для выращивания туляремиальных бактерий в условиях глубинного культивирования с аэрацией в практике изготовления живой вакцины применяют полужидкие среды. Но эффективность полужидких сред невелика: после 18 ч выращивания густота взвеси увеличивается в 5–6 раз [6]. Последними исследованиями зарубежных авторов подтверждена эффективность жидкой питательной среды Т [4] для анализа образцов окружающей среды и клинических изолятов на присутствие возбудителя туляремии [7], но ее применение в качестве производственной среды экономически нецелесообразно.

Экспериментальные жидкие питательные среды для глубинного культивирования вакцинного штамма туляремиального микроба в условиях биореактора основаны на гидролизатах рыбокостной муки с добавлением солей, витаминов, глюкозы [5] и экстракта пекарских дрожжей [3].

Цель работы – разработка питательной среды для накопления биомассы, пригодной для получения иммунобиологических препаратов (в т.ч. живой туляремиальной вакцины).

В качестве основы питательной среды в нашей работе использовали панкреатический гидролизат рыбокостной муки (ПГРМ) (ГНЦ ПМБ, Оболенск), экстракт пекарских дрожжей (ЭПД) (Serva), экспериментальный ферментативный гидролизат фибрина (ФГФ), приготовленный из отхода производства антирабического иммуноглобулина. В качестве дополнительных компонентов – глюкозу, глюкозo-витаминовую добавку (ГВД) (ГНЦ ПМБ, Оболенск), соли кальция (глюконат и пантотенат), цистеин, хлорид натрия.

Технология приготовления жидкого ферментативного гидролизата фибрина приведена в патенте RU 2425866 [1]. Жидкую форму ферментативного гидролизата фибрина концентрировали в 6–7 раз ме-

тодом выпаривания на установке вакуум-выпарной УВВ-50 и высушивали конвекционным способом на сушильной установке распылительного типа КЯУЛ 101325.002 в «псевдокипящем слое». По агрегатному состоянию высушенный ферментативный гидролизат фибрина представлял собой мелкодисперсный порошок с нежно-желтым оттенком. При анализе физико-химических показателей определено: содержание общего азота – $(4,76 \pm 0,03)$ %; аминного азота – $(1,39 \pm 0,03)$ %; процент расщепления белка – $(50,7 \pm 1,7)$ %; содержание пептона (по шкале Дифко) – $(53,7 \pm 1,5)$ %; следы непереваренного белка отсутствовали; сухой остаток – $(8,78 \pm 0,2)$ %; хлориды – $(0,22 \pm 0,01)$ %; влажность – $(2,4 \pm 0,2)$ %; рН – $6,9 \pm 0,2$, что соответствует требованиям, предъявляемым к сухим основам питательных сред (МУК 4.2.2316-08).

В качестве модельного штамма использовали *F. tularensis* 15 НИИЭГ, полученный из Государственной коллекции патогенных бактерий. Концентрацию биомассы определяли по отраслевому стандартному образцу мутности ОСО-42-28-85-П (10 МЕ) ФГБУ НЦЭСМП Минздравсоцразвития (эквивалентной концентрации 5 млрд м.к./мл) и турбидиметрическим методом при OD 600 нм. Стабильность биологических свойств туляремийного микроба, в том числе коэффициент жизнеспособности (К %) и степень диссоциации, оценивали по стандартной методике (МУ 3.3.2.2124-06).

Эффективность жидких экспериментальных питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе и в биореакторе с автоматическим поддержанием параметров культивирования. Объем питательной среды при культивировании в колбах составлял 25 мл, температура культивирования 37 °С, скорость вращения платформы – 200 об./мин, время культивирования (24 ± 1) ч. Параметры культивирования в биореакторе с рабочим объемом 14 л – аэрация 0,5–0,7 л воздуха на 1 л питательной среды, скорость перемешивания 500 об./мин в течение (20 ± 2) ч при температуре 37 °С.

На первом этапе установлено, что лимитирующим фактором ростовых свойств экспериментальных сред является содержание аминного азота. Оптимальное значение этого показателя должно быть в пределах 0,320–0,430 %. При более высоком или низком содержании аминного азота рост туляремийного микроба резко ограничивается, что согласуется с литературными данными [3]. Питательная среда на основе панкреатического гидролизата рыбкопостной муки оказалась менее эффективной по показателям жизнеспособности культуры и прироста биомассы.

На следующем этапе оценивали влияние питательной основы экспериментальной среды на рост вакцинного штамма и жизнеспособность субпопуляций. Использовали среду 1 (на основе экстракта пекарских дрожжей) и среду 2 (на основе фермен-

тативного гидролизата фибрина). В качестве источника углеводов в обоих случаях применяли глюкозу. При культивировании на экспериментальной среде 1 отмечено значительное удлинение лаг-фазы до 18 ч, уменьшение урожайности с сохранением высокой жизнеспособности культуры. Для среды 2 была отмечена высокая скорость накопления биомассы в экспоненциальную фазу в сочетании с высоким $(72 \pm 3,5)$ % коэффициентом жизнеспособности. Два пика в стационарной фазе роста (20 и 24 ч культивирования) на этой среде могут быть связаны с исчерпанием одного лимитирующего субстрата и адаптацией ферментных систем клеток к другому субстрату.

На следующем этапе использовали экспериментальную среду на основе сухого ферментативного гидролизата фибрина (среда 2), которую готовили согласно патенту RU № 2518282 [2]. Основные компоненты среды: гидролизат фибрина 5 %, глюкоза 1 %, рН 7,2. Бульон фильтровали через каскад последовательно соединенных фильтров ЭПВг.П-050-Д-250 и ЭПМ.К-080/045-Д-250М при температуре фильтруемой среды (60 ± 5) °С и рабочем давлении 0,15 МПа, затем стерилизовали при (110 ± 2) °С в течение 30 мин.

Согласно литературным данным, для туляремийного микроба в качестве стимуляторов роста широко используют соли кальция, натрия, аминокислоты [3, 4]. Перед внесением инокулята посевной культуры в стерильную среду мы добавляли стерильные растворы солей и аминокислот. При добавлении солей кальция более эффективным оказался пантотенат кальция (витамин В5). В частности, показатель прироста биомассы при введении 0,005 % раствора пантотената кальция составил 291,2 %, а при добавлении глюконата кальция – 86,7 %, жизнеспособность выращенной культуры была выше в первом случае на 25 %. Влияние хлорида натрия и цистеина на эффективность экспериментальной питательной среды оценивали на варианте среды, содержащей 0,005 % пантотената кальция. Добавление цистеина (0,05–0,1 %) резко увеличивало прирост биомассы и урожайность (до $133,5 \pm 3$ млрд м.к./мл), но значительно снижало жизнеспособность (до 44 %). При добавлении хлорида натрия (0,5 %) жизнеспособность культуры увеличивалась до 96,8 %, хотя прирост биомассы был меньше (163,5 %), что может в дальнейшем использоваться для синхронизации культуры. При добавлении и цистеина и хлорида натрия прирост биомассы снижался (до 100 %), жизнеспособность оставалась высокой (94,6 %), показатель степени диссоциации оставался на низком уровне: количество иммуногенных (белых) колоний составляло (96 ± 2) %.

Сконструированная жидкая питательная среда на основе сухого гидролизата фибрина с добавлением глюкозы и цистеина, солей кальция и натрия, рН $(7,2 \pm 0,1)$, была апробирована при аппаратном культивировании штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ. В каче-

стве посевного материала использовали 48-часовую агаровую культуру, начальная концентрация клеток была $(0,5 \pm 0,1)$ млрд м.к. в 1 мл среды. Время культивирования составило (20 ± 2) ч, в качестве подкормки использовали раствор глюкозы. После окончания процесса культивирования в биореакторе нативная культура *F. tularensis* вакцинного штамма 15 НИИЭГ имела следующие характеристики: pH $(7,0 \pm 0,1)$, концентрация микробных клеток $(37 \pm 0,5)$ млрд м.к. в 1 мл среды, коэффициент жизнеспособности составил $(68 \pm 0,5)$ %. Отмечена низкая степень диссоциации – (97 ± 1) % SR (белых) иммуногенных колоний от общего количества выросших.

Таким образом, разработанная нами жидкая питательная среда позволяет получать жизнеспособную биомассу туляремийного микроба с высокой концентрацией и низкой степенью диссоциации, что эффективно при выращивании штамма-продуцента живой туляремийной вакцины.

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

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 RU № 2425866 РФ, опубл. 10.08.11 г. Бюл. № 22.
2. Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Вахрушина Н.И., Никифоров А.К. Питательная среда для глубинного культивирования туляремийного микроба. Патент RU № 2518282, опубл. 10.06.14. Бюлл. № 16.
3. Лапин А.А., Павлов В.М., Домотенко Л.В., Храмов М.В., Мокриевич А.Н. Простая жидкая питательная среда для молекулярно-генетических исследований *Francisella tularensis*. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 102:66–7.

4. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. *Антибиотики и мед. биотехнология*. 1987; 32:133–7.

5. Шепелёв И.А., Волох О.А., Еремин С.А., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М. Способ получения биомассы туляремийного микроба. Патент RU № 2451743, опубл. 27.05.12. Бюл. № 15.

6. Becker S., Lochau P., Jacob D., Heuner K., Grunow R. Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 2016; 121:5–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.11.018.

References

1. Antonycheva M.V., Nizhegorodtsev S.A., Eremin S.A., Alenkina T.A., Shul'gina I.V., Belousov A.D., Zhulidov I.M., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of cholera vibrio]. RF Patent No 2425866, 10.08.2011.
2. Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Vakhrushina N.I., Nikiforov A.K. [Nutrient medium for submerged cultivation of tularemia microbe]. RF Patent No 2518282, 10.06.2014.
3. Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khramov M.V. [Simple liquid nutrient medium for molecular-genetic investigations of *Francisella tularensis*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 102:66–7.
4. Pavlovich N.V., Mishan'kin B.N. [Transparent nutrient medium for *Francisella tularensis* cultivation]. *Antibiotiki i Med. Biotechnol.* 1987; 32:133–7.
5. Shepelev I.A., Volokh O.A., Eremin S.A., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M. [Method for the production of biomass of tularemia microbe]. RF Patent No 2451743, 27.05.2012.
6. Becker S., Lochau P., Jacob D., Heuner K., Grunow R. Successful re-evaluation of broth medium T for growth of *Francisella tularensis* ssp. and other highly pathogenic bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 2016; 121:5–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.11.018.

Authors:

Volokh O.A., Antonycheva M.V., Avdeeva N.G., Kuznetsova E.M., Kholmatov K.I., Bibikov D.N., Nikiforov A.K. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Волох О.А., Антонычева М.В., Авдеева Н.Г., Кузнецова Е.М., Холматов К.И., Бибиков Д.Н., Никифоров А.К. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 19.12.16.