

А.А.Лапин, В.М.Павлов, А.Н.Мокриевич, Л.В.Домотенко, М.В.Храмов

ПРОСТАЯ ЖИДКАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА
ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ *FRANCISELLA TULARENSIS*

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск

Предложена простая жидкая питательная среда для наработки биомассы туляремийного микроба с целью выделения ДНК и антигенов из бактериальных клеток, а также для культивирования трансформантов *F. tularensis*. Показано, что за исключением цистеина дрожжевой экстракт содержит полный набор аминокислот и рост-стимулирующих факторов, необходимый для роста *F. tularensis*.

Ключевые слова: *Francisella tularensis*, питательная среда, дрожжевой экстракт.

Возбудитель туляремии, *Francisella tularensis*, является ауксотрофом [1], что характерно для внутриклеточных паразитов. Большую часть современных знаний о свойствах туляремийного микроба и реакции организма на *F. tularensis* были получены на модели вакцинного штамма *F. tularensis* 15/10, созданного аттенуацией природного изолята *F. tularensis* subsp. *holarctica*. В последнее десятилетие интерес к молекулярно-генетическим исследованиям туляремийного микроба возрос из-за необходимости разработки современных препаратов для диагностики и профилактики туляремии. Используемые жидкие питательные среды либо сложны в приготовлении (многокомпонентная синтетическая среда Чемберлена [3]), либо содержат гидролизаты белков животного происхождения (бульон Мюллера-Хинтона, сердечномозговая вытяжка и триптиказо-соевый бульон [6, 8]), а также Т-бульон, включающий в себя сердечномозговую экстракт, триптон и кислотный гидролизат казеина [2]. Наличие пептидов в гидролизатах белков животного происхождения может представлять определенную проблему при выделении и очистки антигенов и ДНК из биомассы туляремийного микроба, выращенной на таких богатых средах [5].

Цель настоящего исследования – оптимизация состава жидкой питательной среды для проведения молекулярно-генетических работ с вакцинным штаммом туляремийного микроба (выделение ДНК, криотрансформация, электропорация и аллельный обмен).

В настоящей работе использован штамм *F. tularensis* 15/10, полученный из музейной коллекции живых культур (ФГУН ГНЦ ПМБ, Московская обл.). *F. tularensis* культивировали на твердой (FT-агар, ФГУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и жидкой питательной средах при 37 °С.

Базовый состав жидкой питательной среды (на 1 л): кислотный гидролизат казеина – 5 г («Roth»); дрожжевой экстракт – 5 г («Roth»); цистеина гидрохлорида моногидрат – 0,1 г («Sigma»); фосфат калия однозамещенный – 12 г; калий гидроксид – 3,9 г; натрий хлористый – 5 г («Реахим», Россия); сульфат железа (II) семиводный – 6 мг («ЗАО Мосреактив»,

Россия); глюкозы – 10 г; pH среды – 7,2. Для оптимизации состава среды концентрации компонентов меняли в диапазоне: кислотный гидролизат казеина от 0 до 10 г, натрий хлористый от 5 до 20 г, цистеин от 0 до 0,4 г, глюкоза от 0 до 10 г.

Культуру выращивали в пробирках с 3 мл жидкой питательной среды на термостатируемой качалке (200 об/мин, 37 °С) в течение 5–18 ч. Отбор проб проводили на 2,5; 5 и 18 ч роста. Оптическую плотность клеточной суспензии измеряли при длине волны 590 нм с помощью фотокolorиметра КФК-2. В качестве посевного материала использовали 24-часовую агаровую культуру, начальная концентрация клеток была около $8 \cdot 10^8$ КОЕ /мл ($OD_{590} \sim 0,05$).

Кислотный или ферментативный гидролизат казеина входит в состав ряда питательных сред для выращивания *F. tularensis*. Для выяснения влияния гидролизата казеина на рост туляремийного микроба культуру *F. tularensis* 15/10 выращивали в течение 5 ч, измеряя оптическую плотность клеточной суспензии через 2,5 и 5 ч роста (табл. 1).

Из табл. 1 следует, что кислотный гидролизат казеина практически не улучшает качество среды, а при высоких концентрациях даже подавляет рост культуры туляремийного микроба.

Цистеин является ключевым стимулятором роста для *F. tularensis* [4, 7]. Для определения оптимальной концентрации этой аминокислоты в жидкой питательной среде туляремийную культуру выращивали в течение 5 ч и измеряли оптическую плотность

Таблица 1

Влияние кислотного гидролизата казеина на эффективность размножения *F. tularensis*

Концентрация гидролизата казеина, г/л	0		1,25		2,5		5		10	
Время, ч	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5	2,5	5
Оптическая плотность культуры в относительных единицах	2,6	6,5	2,6	6,7	2,7	6,4	2,6	6,7	2,2	4,0

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 за 1 взята оптическая плотность исходной культуры, точность измерений – 5 %.

Таблица 2

Влияние цистеина на эффективность размножения *F. tularensis*

Концентрация цистеина, г/л	0	0,004	0,01	0,03	0,1
Оптическая плотность культуры в относительных единицах	2,8	5,8	6,0	7,0	6,4

клеточной суспензии (табл. 2).

Оптимальная концентрация цистеина в среде находится в пределах 0,03–0,1 г/л для начального этапа роста культуры, в случае же 18-часового выращивания оптическая плотность культуры достигала OD₅₉₀ – 1,40 для среды с 0,1 г/л цистеина и OD₅₉₀ – 0,70 для среды с 0,03 г/л цистеина.

При выращивании культуры *F. tularensis* в жидкой питательной среде в течение 5 ч с различным содержанием глюкозы не выявлено существенной разницы в оптической плотности клеточных суспензий (табл. 3), хотя наиболее эффективный рост бактерий наблюдали в среде с 2 г/л глюкозы.

Изменение концентрации хлористого натрия в среде в пределах 5–20 г/л существенно не влияло на скорость роста культуры. Наибольший прирост оптической плотности за 5 ч роста (OD₅₉₀ – 0,64) наблюдали при концентрации хлористого натрия 10 г/л.

Добавление соли железа незначительно влияло на размножение туляремийного микроба в исследуемой жидкой питательной среде. Так, при добавлении железа до концентрации 6 мг/л оптическая плотность культуры за 5 ч роста увеличивалась в 6,7 раз, а без железа – в 4,8 раза.

Полученные данные показывают, что в жидкой питательной среде для туляремийного микроба дрожжевой экстракт может служить единственным источником аминокислот и рост-стимулирующих факторов, за исключением цистеина. Этот вывод справедлив при культивировании культуры *F. tularensis* с посевной дозой более 1·10⁸ КОЕ /мл, при меньших посевных дозах наблюдали торможение скорости роста на начальном этапе культивирования (результаты не приведены).

В результате анализа экспериментальных данных нами был выбран оптимальный состав жидкой питательной среды (на 1 л): дрожжевой экстракт – 5 г; калия фосфат однозамещенный – 12 г; калия гидроксид – 3,9 г; натрий хлористый – 10 г; цистеина гидрохлорида моногидрат – 0,1 г; сульфат железа (II), 7-водного – 6 мг; глюкоза – 2 г; pH среды 7,2).

Данная среда оптимальна для наработки биомассы туляремийного микроба с целью выделения ДНК и антигенов из клеток, а также может использоваться в генетических работах по трансформации плазмидных ДНК в *F. tularensis* и аллельному обмену в геноме туляремийного микроба (результаты будут опубликованы в последующих работах).

Таблица 3

Влияние глюкозы на эффективность размножения *F. tularensis*

Концентрация глюкозы, г/л	0	1	2	5	10
Оптическая плотность культуры в относительных единицах	6,0	6,8	7,7	6,8	5,7

Работа выполнена по Государственному контракту № 128-Д от 11.06.09 г. в рамках Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Олсуфьев Н.Г. Таксономия, микробиология и лабораторная диагностика возбудителя туляремии. М.: Медицина; 1975. 192 с.
2. Павлович Н.В., Мишанькин Б.Н. Прозрачная питательная среда для культивирования *Francisella tularensis*. Антибиотики и мед. биотехнол. 1987; 32:133–7.
3. Francis E. The amino-acid cistine in the cultivation of tularemia. Public Health Reports. 1923; 38(3):324–7.
4. Chamberlain R.E. Evaluation of live tularemia vaccine prepared in a chemical defined medium. Appl. Microbiol. 1965; 13:232–5.
5. Hazlett K.R.O., Caldon S.D., McArthur D.G., Cirillo K.A., Kirimanjeswara G.S., Magguilli M.L. et al. Adaptation of *Francisella tularensis* to the mammalian environment is governed by cues which can be mimicked in vitro. Infect. Immun. 2008; 76:4479–88.
6. Lee B.Y., Horwitz M.A., Clemens D.L. Identification, recombinant expression, immunolocalization in macrophages, and T-cell responsiveness of the major extracellular proteins of *Francisella tularensis*. Infect. Immun. 2006; 74:4002–13.
7. Traub A., Mager J. Studies on the nutrition of *Pasteurella tularensis*. J. Bact. 1960; 79:566–71.
8. Twine S.M., Mykytchuk N.C., Petit M.D., Shen H., Sjostedt A., Wayne C.J. et al. In vivo proteomic analysis of the intracellular bacterial pathogen, *Francisella tularensis*, isolated from mouse spleen. Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006; 345:1621–33.

Об авторах:

Лапин А.А., Павлов В.М., Домотенко Л.В., Храмов М.В., Мокриевич А.Н. Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии. 142279, Московская обл., Серпуховский р-он, п. Оболенск. E-mail: vitpav@obolensk.org

A.A.Lapin, V.M.Pavlov, A.N.Mokrievich, L.V.Domotenko, M.V.Khranov

Simple Liquid Nutrient Medium for Molecular Genetic Investigations of *Francisella tularensis*

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow region

Proposed was the simple liquid nutrient medium for tularemia agent biomass growth with the aim to isolate DNA and antigens out of bacterial cells and to culture the transformants of *F.tularensis*. Shown was that yeastrel contained complete set of amino acids and growth stimulating agents required for *F.tularensis* growth, except for cysteine.

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

Authors:

Lapin A.A., Pavlov V.M., Mokrievich A.N., Domotenko L.V., Khranov M.V. State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology. Obolensk. E-mail: vitpav@obolensk.org

Поступила 14.09.09.