

А.А.Курилова, Т.В.Таран, Л.С.Катунина, С.И.Головнева

РАЗРАБОТКА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

ФГУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт»

Из растительного сырья (соевых бобов, соевого молока, мелассы свекловичной (патоки рафинадной) приготовлено 5 экспериментальных питательных основ и изучены их физико-химические показатели и аминокислотный состав. Сконструированные на экспериментальных основах питательные среды удовлетворяли питательные потребности изученных штаммов чумного, холерного, сибирезвенного микробов и спорообразующих сапрофитов.

Ключевые слова: питательные основы, питательные среды, гидролизаты, соевое сырье, меласса свекловичная (патока рафинадная), аминокислотный состав, химический состав, ростовые свойства.

В производстве питательных основ и сред для культивирования микробов актуальна проблема замены дорогостоящего мясного сырья на альтернативное, экономически выгодное, стандартное и доступное растительное сырье. Характеристика физико-химических свойств питательных основ для приготовления микробиологических сред имеет существенное значение для оценки их качества и стандартизации.

Цель работы – разработка питательных сред на основах растительного сырья для культивирования чумного, холерного, сибирезвенного микробов и почвенных спорообразующих бацилл. Задачами исследования являлось приготовление экспериментальных основ, изучение их физико-химических свойств и аминокислотного состава; конструирование питательных сред, соответствующих требованиям действующей нормативной документации [7], и изучение их ростовых качеств.

Материалы и методы

Ростовые свойства питательных сред изучали при помощи полученных из коллекционного центра ФГУЗ «Ставропольского научно-исследовательского противочумного института» Роспотребнадзора вирулентного штамма *Bacillus anthracis* 81/1; вакцинных штаммов *Yersinia pestis* EV, *Bacillus anthracis* СТИ-1; авирулентного штамма *Vibrio cholerae non* O1 P 9741 и почвенного спорообразующего сапрофита *Bacillus subtilis* 3, типичных по морфологическим и биохимическим свойствам.

В качестве контрольных питательных сред использовали традиционно применяемые агар и бульон Хоттингера, рН 7,3±0,1 и 7,8±0,1.

В экспериментальных основах (по 3 серии каждой) определяли рН, количественное содержание аминокислот, аминного азота, белка, хлоридов, калия, натрия, кальция, железа и глюкозы. Три основы готовили из соевого сырья (бобы, ГОСТ 17109-88; соевое молоко, ТУ 9146-025-10126558-98) путем гидролиза ферментами поджелудочной железы крупного рогатого скота по методике О.Л.Старцевой [8]: ферментативный гидролизат соевых бобов

(ФГС); ферментативный гидролизат соевого молока (ФГСМ); ферментативный гидролизат соевых бобов на соевом молоке (ФГСБМ). По разработанной нами технологии [4] из мелассы свекловичной, ГОСТ Р 52304-2005, готовили основу мелассу свекловичную (ОМС), представляющую собой 2 % раствор на питьевой воде с добавлением 0,5 % натрия хлористого, и ОМСдэ – такую же основу, состав которой дополняли 1 % дрожжевого экстракта.

Аминный азот, содержание хлоридов и рН измеряли в соответствии с ФС 42-3874-99 [9]. Анализ микроэлементов, белка и глюкозы проводили на биохимическом анализаторе «Stat-fax» (США) с применением наборов реагентов «Ольвекс Диагностикум» (Россия, Санкт-Петербург). Содержание свободных аминокислот определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе 2 ААА-3 (Чехия). Все замеры производили в трехкратном повторе в каждой серии основ. Группировку первичных данных, вычисление средних арифметических и средней ошибки полученных результатов проводили на персональном компьютере IBM PC 550 с использованием пакета программ корпорации Microsoft Excel 7.0 для Windows по методам биометрии [6].

Результаты и обсуждение

Приготовленные питательные основы были прозрачными, соевые – светло-желтого, мелассовые – светло-коричневого цвета. Концентрация водородных ионов в соевых основах на начальном этапе гидролиза составляла 8,5±0,1. Смещаясь в процессе ферментации, к концу гидролиза рН достигал 7,2±0,2 в ФГС и ФГСМ и 7,3±0,1 в ФГСБМ. Технология приготовления мелассовых основ предусматривает подъем рН до 8,0±0,1 при температуре нагреваемого раствора (60±5,0) °С и доведение его до нужного значения после фильтрации. Для культивирования возбудителей чумы, сибирской язвы и сапрофитов в ОМС и ОМСдэ устанавливали рН 7,3±0,1, для выращивания холерного вибриона – рН 7,8±0,1.

В зависимости от вида сырья аминокислотный и химический состав растительных основ (таблица)

Показатели аминокислотного и химического состава экспериментальных питательных основ (M±m)

Показатель, ед измерения.	Образец питательной основы				
	ФГС	ФГСМ	ФГСБМ	ОМС	ОМСдэ
Аминный азот, %	0,880±0,030	0,740±0,040	0,860±0,030	0,030±0,001	0,090±0,001
Асп, г/л	4,600±0,920	6,430±0,850	6,620±1,910	0,640±0,240	1,720±0,220
Тре, г/л	1,730±0,150	3,140±0,700	4,660±0,560	0,004±0,001	0,330±0,015
Сер, г/л	1,630±0,110	3,470±1,370	3,310±0,950	1,530±0,470	2,380±0,740
Глу, г/л	6,460±1,160	6,560±0,930	9,610±1,130	1,860±0,090	3,250±0,970
Гли, г/л	1,780±0,880	2,180±0,180	3,060±0,980	0,340±0,016	0,910±0,019
Ала, г/л	1,690±0,470	2,570±0,560	4,120±1,720	0,420±0,018	0,830±0,012
Вал, г/л	2,410±0,980	3,690±0,470	4,970±1,230	0,290±0,007	1,150±0,054
Мет, г/л	0,150±0,030	0,250±0,080	3,680±0,130	0,002±0,001	0,012±0,003
Изо, г/л	3,920±0,540	5,480±0,770	7,800±1,440	0,230±0,005	0,560±0,008
Лей, г/л	3,170±0,320	5,360±0,690	5,940±1,860	0,310±0,003	1,130±0,025
Тир, г/л	0,630±0,240	1,120±0,140	1,410±0,090	0,190±0,006	0,550±0,009
Фала, г/л	1,150±0,110	1,680±0,250	2,490±0,670	0,001±0,001	0,430±0,004
Гис, г/л	0,920±0,030	1,300±0,150	2,080±0,120	0,001±0,001	0,390±0,022
Лиз, г/л	2,670±0,750	3,970±0,920	6,300±0,820	0,002±0,001	0,610±0,067
Арг, г/л	0,490±0,060	1,700±0,080	1,620±0,070	-	0,470±0,030
Белок, г/л	7,600±0,200	12,300±0,100	22,500±0,500	*	4,000±0,300
К, г/л	0,750±0,010	0,750±0,020	0,700±0,010	0,660±0,020	0,430±0,010
Na, г/л	5,400±0,250	5,500±0,190	5,380±0,220	2,620±0,080	2,190±0,060
Са, г/л	0,270±0,020	0,010±0,001	0,020±0,001	0,010±0,001	0,020±0,001
Fe, мг/л	1,610±0,150	1,160±0,120	1,690±0,090	-	-
СГ, г/л	0,530±0,200	1,010±0,040	0,880±0,060	4,540±0,500	3,510±0,300
Глюкоза, г/л	0,840±0,020	0,920±0,030	1,200±0,400	0,040±0,002	0,320±0,010

Примечания: «*» – не определяли; «-» – не обнаружено.

были различными.

Соевые основы на порядок превосходили мелассовые по процентному содержанию аминного азота при наличии остаточного белка в количестве от (7,600±0,200) г/л в ФГС до (22,500±0,500) г/л в ФГСБМ, который, при учете содержания аминного азота (0,860±0,030) %, можно охарактеризовать как наиболее насыщенную по органическому азоту экспериментальную основу. Минимальное содержание аминного азота среди соевых основ зафиксировано в результате гидролиза соевого молока. Обогащенная дрожжевым экстрактом мелассовая основа по данному показателю в 3 раза превзошла базовую и, кроме этого, содержала (4,000±0,300) г/л белка.

Суммарное содержание анализируемых аминокислот и индивидуальные показатели их концентраций в соевых основах были существенно выше, чем в мелассовых. Лишь количество серина в ОМСдэ (2,380±0,740) г/л, превысившее таковое в ФГС (1,630±0,110) г/л, $p < 0,05$, составило исключение. Во всех основах отмечено преобладание глутаминовой кислоты, играющей существенную роль в аминокислотном метаболизме бактерий. Содержание практически всех аминокислот было наибольшим в ФГСБМ, кроме серина и аргинина, концентрации которых были выше в ФГСМ. Статистически достоверно сумма аминокислот в ОМСдэ (14,720±1,150) г/л преобладала над таковой в ОМС (5,820±2,440) г/л, $p < 0,05$. За счет добавления дрожжевого экстракта в

полтора раза увеличилось содержание серина и глутаминовой кислоты, почти вдвое – аланина, почти втрое и более раз – изолейцина, глицина, аспарагиновой кислоты, тирозина, лейцина, валина, метионина, треонина, лизина, гистидина и фенилаланина. В ОМСдэ было выявлено (0,470±0,030) г/л аргинина, совсем не обнаруженного в ОМС.

При изучении химического состава экспериментальных основ было выявлено максимальное количество калия в ФГС и ФГСМ, натрия – в ФГСМ, минимально оба эти элемента были представлены в ОМСдэ. На порядок превосходил все остальные показатели содержания кальция в ФГС (0,270±0,020) г/л. В ОМСдэ кальция было обнаружено вдвое больше, чем в ОМС. Наименьший показатель содержания железа среди соевых гидролизатов отмечен в ФГСМ, а наибольший – в ФГСБМ. В обеих основах на мелассе свекловичной не было обнаружено железа, однако они преобладали над соевыми по количеству хлорид-ионов. Содержание глюкозы в ОМСдэ в 8 раз превышало таковое в ОМС, оставаясь, тем не менее, ниже чем в соевых гидролизатах.

В результате исследований показано преимущество соевых основ над мелассовыми по большинству изученных показателей химического и аминокислотного состава. На основе ФГС были сконструированы питательные среды для культивирования чумного и холерного микробов [1, 2, 3].

Биологическая ценность мелассы свекловичной

(патоки рафинадной), отхода свеклосахарного производства, состоит в наличии углеводов, биологически активных веществ, аминокислот, витаминов, микроэлементов. Практически ОМС и без добавления стимуляторов является жидкой питательной средой с минимальными ростовыми свойствами, достаточными, например, для удовлетворения необходимых питательных потребностей холерного вибриона. В то же время питательные потребности сибирезвенного микроба ОМС обеспечивала не в полной мере [5]. Недостаточный рост бактерий на ОМС мог быть обусловлен дефицитом существенных для их роста гистидина, лизина, треонина, метионина и отсутствием тиамина. Внесение в ОМС ($10 \pm 0,50$) г/л дрожжевого экстракта, при оптимальном сочетании цвета и прозрачности питательной среды, обеспечило полноценную вегетацию на ней тестируемых нами сибирезвенных и сапрофитных штаммов. При том, что содержание аминного азота в бульоне Хоттингера (контроль) составляло ($0,140 \pm 0,052$) %, а в ОМСдэ ($0,090 \pm 0,001$) %, в испытуемой среде рост культур был более обильным и визуализировался на 2 ч раньше, что указывает на сбалансированность среды по компонентам, обеспечивающим благоприятные осмотические условия для роста данных микробов. Положительно отразилось на ростовых качествах питательных сред на основе мелассы свекловичной (патоки рафинадной) использование не дистиллированной воды, а питьевой, наличие в которой ряда элементов и солей имеет значение в микробном метаболизме и выравнивании окислительно-восстановительного потенциала. Исключение обязательных при получении традиционных питательных сред этапов гидролиза сырья и дистилляции воды при использовании патоки рафинадной – дешевого и доступного сырья, упрощает процедуру производства и еще более снижает себестоимость сред на ее основе.

Показатель прорастания ($79,6 \pm 1,5$) % на жидкой среде для культивирования чумного вакцинного штамма ЕВ [3] статистически достоверно превышал показатель прорастания ($55,2 \pm 3,7$) % на контрольной среде, $p < 0,05$. Показатели прорастания на остальных средах не имели статистически достоверных различий с контрольными показателями: ($69,4 \pm 3,2$) % на жидкой питательной среде для культивирования холерного вибриона [1] и ($67,5 \pm 2,4$) % на контрольной среде; для штаммов *B. anthracis* 81/1, СТИ-1, *B. subtilis* 3 показатели прорастания на ОМСдэ [4] были соответственно ($56,9 \pm 5,6$), ($78,5 \pm 2,2$), ($71,1 \pm 1,7$) %, и на контрольной среде соответственно ($54,3 \pm 7,5$), ($76,7 \pm 1,3$), ($68,8 \pm 0,9$) %. При посеве 0,1 мл взвеси, содержащей $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, через 12 ч выращивания на плотной питательной среде для культивирования холерного вибриона [2] формировалось ($48,2 \pm 2,5$) % колоний типичной морфологии диаметром ($2,0 \pm 0,5$) мм, на контрольной среде – ($44,7 \pm 1,9$) % колоний диаметром ($1,5 \pm 0,5$) мм. Культурально-морфологические, тинкториальные и биохимические свойства протестированных штаммов, параллельно выращенных на опытных и контрольных средах, были удовлетво-

рительными и стабильными. После 10 пересевов на опытных средах не было обнаружено каких-либо изменений в изучаемых свойствах микроорганизмов.

Полученные результаты показали, что питательные среды, сконструированные на растительных основах из соевого сырья и мелассы свекловичной (патоки рафинадной), пригодны для культивирования возбудителей особо опасных инфекций, отвечают требованиям действующей нормативной документации [7] и могут являться альтернативой дорогостоящим средам на мясных основах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Катунина Л.С., Ефременко В.И., Старцева О.Л., Малецкая О.В., Курилова А.А., Бабий А.М., изобретатели. Питательная среда жидкая для культивирования холерного вибриона. Патент РФ № 2301256, МПК С12N 1/20, С12Q 1/04. Оpubл. 20.06.07. Бюл. № 17.
2. Катунина Л.С., Ефременко В.И., Старцева О.Л., Малецкая О.В., Курилова А.А., Бабий А.М., изобретатели. Питательная среда плотная для культивирования холерного вибриона. Патент РФ № 2303630, МПК С12N 1/20, С12Q 1/04. Оpubл. 27.07.07. Бюл. № 21.
3. Катунина Л.С., Старцева О.Л., Малецкая О.В., Головнева С.И., Смирнова Е.Б., Курилова А.А., изобретатели. Питательная среда (жидкая) для культивирования чумного микроба вакцинного штамма ЕВ. Патент РФ № 2260620, МПК С12N 1/20, С12Q 1/04. Оpubл. 20.09.05. Бюл. № 26.
4. Курилова А.А., Катунина Л.С., Малецкая О.В., Старцева О.Л., Рязанова А.Г., Проскурина В.А. и др., изобретатели. Питательная среда (жидкая) для культивирования сибирезвенного микроба и близкородственных сапрофитов. Патент РФ № 2288950, МПК С12N 1/20, С12Q 1/04. Оpubл. 10.12.06. Бюл. № 34.
5. Курилова А.А., Малецкая О.В., Катунина Л.С., Старцева О.Л., Таран Т.В. О применении питательных сред на основе патоки (мелассы свекловичной) для выращивания сибирезвенных и близкородственных им бактерий. Вестник российской военной-медицинской академии. СПб; 2006; 1(15), приложение: 480–1.
6. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высшая школа; 1990. 352 с.
7. Методические указания 3.3.2.2124-06. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. М.; 2006.
8. Старцева О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения [дис. ... канд. биол. наук]. Ставрополь; 2005. 158 с.
9. Фармакопейная статья № 42-3874-99. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. М.; 1999.

Об авторах:

Курилова А.А., Таран Т.В., Катунина Л.С., Головнева С.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

A.A.Kurilova, T.V.Taran, L.S.Katunina, S.I.Golovneva

Development of Nutrient Media out of Vegetable Material for Culturing Particularly Dangerous Infections Agents

Stavropol Anti-Plague Research Institute

5 experimental nutritious bases were prepared out of plant materials (soybeans, soymilk, sugar-beet molasses – sugar syrup), and their physical and chemical parameters and amino-acid composition were studied. Nutrient media developed on experimental basis met the nutritious demands of studied strains of plague, cholera, anthrax microbes and sporogenous saprophytes.

Key words: nutritious bases, nutrient media, hydrolyzates, soybean raw materials, sugar-beet molasses, amino-acid composition, chemical composition, growth features.

Authors:

Kurilova A.A., Taran T.V., Katunina L.S., Golovneva S.I. Stavropol Anti-Plague Research Institute. 355035, Stavropol, Sovetskaya St., 13–15. E-mail: admnip@mail.stv.ru

Поступила 09.04.09.