

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На ПРАВАХ РУКОПИСИ

МАЗРУХО АЛЕКСЕЙ БОРИСОВИЧ

**ПАНКРЕАТИЧЕСКИЙ ПЕРЕВАР ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ -
ПИТАТЕЛЬНАЯ ОСНОВА СРЕД ДЛЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА
И ЧУМНОГО МИКРОБА**

03.02.03 – МИКРОБИОЛОГИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ

НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА МЕДИЦИНСКИХ НАУК

Научный консультант:
ДОКТОР МЕДИЦИНСКИХ НАУК
В.В. ЛОБАНОВ

РОСТОВ – НА – ДОНУ

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
ВВЕДЕНИЕ.....	10
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	25
1.1 Предисловие.....	25
1.2 Физиологические особенности и питательные потребности <i>Yersinia pestis</i>	26
1.3 Физиологические особенности и питательные потребности <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i>	31
1.4 Использование различных видов сырья для изготовления основ микробиологических питательных сред.....	43
1.4.1 Общие положения.....	43
1.4.2 Питательные среды на основе гидролизатов белков животного происхождения.....	45
1.4.2.1 Использование гидролизатов белков животного происхождения для выращивания чумного микроба.....	46
1.4.2.2 Использование гидролизатов белков животного происхождения для выращивания холерного вибриона.....	47
1.4.3 Питательные среды на основе гидролизатов белков растительного происхождения.....	48
1.4.3.1 Общие положения.....	48
1.4.3.2 Использование гидролизатов белков растительного происхождения для выращивания чумного микроба.....	49
1.4.3.3 Использование гидролизатов белков растительного происхождения для выращивания холерного вибриона.....	50
1.4.4 Использование различных препаратов из микроорганизмов в качестве основ для питательных сред.....	51
1.4.4.1 Общие положения.....	51
1.4.4.2 Белковые основы питательных сред из дрожжей	

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
1.4.4.3 Использование препаратов из биомассы микроорганизмов для выращивания чумного микроба.....	59
1.4.4.4 Использование препаратов из биомассы микроорганизмов для выращивания холерного вибриона.....	60
1.4.4.5 Перспективы использования дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> в качестве сырья для приготовления основ микробиологических питательных сред.....	61
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	64
2.1 Штаммы микроорганизмов.....	64
2.2 Питательные среды.....	67
2.2.1 Сконструированные питательные среды.....	67
2.2.1.1 Агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C.....	67
2.2.1.2 Агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования чумного микроба при 37°C.....	67
2.2.1.3 Щелочной агар – агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения холерного вибриона.....	68
2.2.1.4 Жидкая накопительная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения холерного вибриона.....	68
2.2.1.5 Бульон для культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей.....	68
2.2.1.6 Питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях.....	69
2.2.1.7 Питательная среда на основе панкреатического перевара	

пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот.....	69
2.2.1.8 Глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний.....	70
2.2.2 Контрольные питательные среды.....	70
2.2.2.1 Контрольные коммерческие питательные среды.....	70
2.2.2.2 Контрольные питательные среды лабораторного изготовления.....	71
2.3 Белковые гидролизаты.....	73
2.3.1 Коммерческие белковые гидролизаты.....	73
2.3.2 Белковые гидролизаты лабораторного изготовления.....	73
2.4 Дрожжи хлебопекарные прессованные.....	74
2.5 Методы исследования.....	74
2.5.1 Физико-химические методы исследования.....	74
2.5.1.1 Метод определения рН.....	74
2.5.1.2 Метод определения общего азота.....	74
2.5.1.3 Метод определения аминного азота.....	75
2.5.1.4 Метод определения содержания хлоридов.....	75
2.5.1.5 Метод определения содержания углеводов.....	75
2.5.1.6 Метод определения прочности агарового студня по Валенту.....	76
2.5.2 Микробиологические методы исследования.....	76
2.5.2.1 Подготовка тест-штаммов для определения биологических показателей питательных сред.....	76
2.5.2.2 Подготовка других штаммов микроорганизмов.....	76
2.5.2.3 Определение биологических показателей питательных сред.....	76
2.5.2.3.1 Определение показателя чувствительности.....	76

2.5.2.3.2	Определение показателя скорости роста микроорганизмов на питательных средах.....	77
2.5.2.3.3	Определение показателя прорастания питательных сред.....	77
2.5.2.3.4	Определение показателя числа колоний, выросших при посеве шестичасовых бульонных культур на агаровые пластинки.....	77
2.5.2.3.5	Определение показателя стабильности основных свойств микроорганизмов.....	78
2.5.2.3.6	Определение показателя эффективности питательных сред.....	78
2.5.2.3.7	Определение дифференцирующих свойств питательных сред.....	78
2.5.2.3.8	Определение диаметра колоний и радиальной скорости роста.....	78
2.5.2.4	Определение гемолитической активности штаммов холерного вибриона.....	79
2.5.2.5	Получение супернатантов бульонных культур холерного вибриона.....	79
2.5.3	Биологические и цитологические методы исследования.....	79
2.5.4	Серологические методы исследования.....	79
2.5.5	Методы статистической обработки полученных результатов.....	79
ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА		
ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ ОСНОВЫ – ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО		
ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ (ПППД).....		
3.1.	Исследование различных марок дрожжей хлебопекарных прессованных в аспекте их использования в качестве питательного субстрата для панкреатического гидролиза.....	81
3.2	Определение оптимальной для проведения панкреатического гидролиза плотности суспензии прессованных пекарских дрожжей в очищенной воде.....	90

3.3 Сравнительное изучение различных методов ингибирования собственных дрожжевых ферментов в гидролизуемых смесях при проведении панкреатического переваривания прессованных пекарских дрожжей.....	93
3.4 Подбор дозы панкреатина сухого, обеспечивающей оптимальный гидролиз прессованных пекарских дрожжей.....	97
3.5 Поиск оптимума рН для проведения панкреатического гидролиза прессованных пекарских дрожжей.....	101
3.6 Оптимизация температурного режима панкреатического гидролиза суспензии прессованных пекарских дрожжей.....	105
3.7 Сравнительное изучение эффективности методов осветления панкреатического перевара пекарских дрожжей.....	105
3.8 Результаты оптимизации технологического процесса изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД).....	108
3.9 Характеристика конечного продукта технологического процесса – панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД).....	111
3.9.1 Физико-химические показатели.....	111
3.9.2 Биологические свойства препарата.....	111
ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ И ДРУГИХ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД.....	114
4.1 Подбор белковых гидролизатов для сравнительной оценки панкреатическим переваром пекарских дрожжей. Метод сравнения, критерии оценки.....	114
4.2 Результаты сравнительной оценки панкреатического перевара пекарских дрожжей и других белковых гидролизатов в отношении тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба.....	116
4.3 Анализ результатов сравнительного тестирования панкреатического	

перевара пекарских дрожжей и других белковых гидролизатов в аспекте создания на их основе универсальной питательной среды для холерного вибриона и чумного микроба.....	118
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ НА ОСНОВЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЧУМНОГО МИКРОБА ПРИ 28°C И 37°C.....	
121	
5.1 Агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C.....	121
5.1.1 Состав разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C.....	121
5.1.2 Сравнительное изучение разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C и контрольных сред по основным биологическим показателям.....	121
5.2 Агаризованная питательная среда основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования чумного микроба при 37°C.....	124
5.2.1 Теоретическое и практическое обоснование необходимости и возможности создания на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C.....	124
5.2.2 Состав разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C.....	126
5.2.3 Сравнительное изучение разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для	

культивирования чумного микроба при 37°С и контрольных сред по основным биологическим показателям.....	126
5.3 Апробация разработанных на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей питательных сред для чумного микроба в ходе тактико-специального учения СПЭБ.....	132
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА НА ОСНОВЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ.....	
6.1 Теоретическое и практическое обоснование необходимости и возможности создания на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона.....	137
6.2 Щелочной агар на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей.....	140
6.3 Жидкая накопительная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей.....	143
6.4 Результаты использования разработанного комплекса сред «Щелочной агар - Жидкая накопительная среда» на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей при мониторинге объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона и исследовании материала от людей.....	146
6.5 Бульон для культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей.....	151
6.6 Питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях.....	156
6.7 Питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку	

ферментации аминокислот.....	168
6.8 Глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний.....	183
6.9 Результаты апробации разработанного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона в ходе тактико-специального учения СПЭБ.....	204
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	209
ВЫВОДЫ.....	238
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ И ТЕРМИНОВ.....	240
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	242

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что контроль инфекционной заболеваемости остается одной из актуальнейших проблем современного здравоохранения в связи с существованием в мире потенциальных и реальных рисков возникновения чрезвычайных ситуаций, угрожающих санитарно-эпидемиологическому благополучию населения.

Отмечается сохранение стойких очагов чумы и холеры во многих регионах земного шара [166, 516, 517]. Заболевания легочной и бубонной чумой отмечены в последние годы на Мадагаскаре [166] и в Китае, что создает предпосылки возможности заноса ее в другие государства, в том числе и в Российскую Федерацию.

Динамика заболеваемости холерой в мире в последние десятилетия свидетельствует о существовании потенциальной опасности расширения социально-экологической глобальной системы эпидемического процесса за счет функционирования континентальных и региональных соцэкосистем, в том числе завозного происхождения, обуславливающих продолжение седьмой пандемии [219].

Вышеизложенное требует от медицинских исследователей разных специальностей постоянного поиска новых и совершенствования известных путей борьбы с эпидемиями, направленных на реализацию организационных, профилактических и противоэпидемических мероприятий [237, 271, 343]. Очевидна необходимость совершенствования эпидемиологического надзора за чумой и холерой в целом и его важнейшей составляющей – лабораторной диагностики [252]. Успехи человечества в борьбе с инфекционными болезнями во многом зависят от развития методов выделения, культивирования и идентификации их возбудителей, для чего обязательно использование разнообразных питательных сред. Ассортимент разрабатываемых и внедряемых в микробиологическую практику питательных сред постоянно расширяется, в связи с чем ведется

интенсивный поиск универсального, стандартизованного, экономически выгодного и доступного сырья для их приготовления [14]. Искомое сырье должно в полной мере обеспечивать питательные потребности соответствующих микроорганизмов и с этой целью микробиологи детально изучают его влияние на рост, размножение, адаптационные возможности бактерий (в том числе, холерного вибриона и чумного микроба), продукцию ими антигенов и токсинов [170, 350].

Возбудители чумы и холеры имеют полноценный рост при посеве на питательные среды, содержащие мясные и казеиновые гидролизаты с широким набором аминокислот [81]. Вследствие высокой себестоимости и нестандартности подобных продуктов на протяжении многих лет существует необходимость в замене мяса, субпродуктов, казеина, рыбы на непищевое сырье. Этой цели были посвящены многочисленные труды целого ряда исследователей [162, 193, 209, 336].

Мировая практика, современная экспериментально-теоретическая база [168, 326, 496], долголетние экспериментальные разработки сотрудников противочумных институтов страны нескольких поколений свидетельствуют, что одним из значимых и перспективных направлений решения этой проблемы является изучение возможности использования биомассы микроорганизмов (в том числе и дрожжей) в качестве исходного сырья для микробиологических питательных основ и сред. Первые работы в данной области возводят свои истоки к концу XIX столетия. Еще в 1895 году Шпронком [137] была предложена пептонная дрожжевая среда, которая хотя и не получила широкого распространения наряду с пептонами Мартена и Витте, однако с успехом применялась в практике микробиологических исследований во время борьбы с грызунами. Идеи использования пивных и хлебопекарных дрожжей в средоварении получили активное развитие в 20-ых – 40-ых годах XX века. К этому периоду времени относится появление большого количества научных работ, посвященных получению дрожжевых экстрактов [85, 86, 332], аутолизатов [85, 141, 264], кислотных и щелочных

гидролизатов пивных дрожжей [264]. По мнению ряда авторов [10, 332] среды, изготовленные на дрожжевых питательных основах являлись адекватной заменой мясо-пептонному бульону и агару. Данные, полученные Б.А. Альпер-Юльчевской в 1940 году [10], свидетельствуют, что среды из пивных и хлебных дрожжей обеспечивали хороший рост бактерий коли-тифозной группы, стафилококка, сарцины, вульгарного протей, некоторых бацилл. В период с 1941 по 1947 годы неоднократно предпринимались попытки использования дрожжевых сред в производстве вакцин [23, 80, 331] и дизентерийного бактериофага [271]. Исследования, проведенные Н.Б. Александровской [8] в 1956 году, А.В. Ананичевым с соавт. [11] в 1970 году, позволили найти наиболее оптимальные способы и условия гидролиза пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для получения полноценной питательной основы из них, содержащей большой набор аминокислот и витаминов.

60-е – 80-е годы XX столетия характеризуются интенсивным ростом производства кормовых углеводородных дрожжей, направленным на решение продовольственных программ. К 1982 году в СССР промышленный выпуск кормовых дрожжей и белково-витаминных препаратов из их биомассы превысил 1 млн. тонн в год, в Японии – 160 тыс. тонн, в ГДР – 60 тыс. тонн, в Великобритании – 55 тыс. тонн, во Франции – 16 тыс. тонн. Новый источник непищевого сырья привлек к себе пристальное внимание ученых, занимающихся разработкой питательных сред и основ. Многочисленные исследования [83, 106, 143, 155, 248] показали, что кормовые дрожжи, утилизирующие как парафины нефти (БВК), так и гидролизаты древесины, торфа, целлюлозы (гидролизные дрожжи) содержат все необходимые для роста большинства микробов аминокислоты, нуклеотиды, витамины, микроэлементы. Большой вклад в создание питательных сред из биомассы и гидролизатов кормовых дрожжей внесли отечественные ученые Е.Г. Борисенко [44, 45, 46], Л.Г. Бендас [33, 34, 270, 291], А.К. Овчаров [234] и др. Целый комплекс готовых и сухих

питательных сред для микробиологической диагностики особо опасных инфекций на основе препаратов, получаемых из кормовых дрожжей, был разработан и внедрен в практику специалистами Ростовского-на-Дону противочумного института под руководством В.Н. Милютина, Н.Ф. Касаткина, В.А. Копылова [128, 210].

Резкое сокращение производства кормовых дрожжей в начале 90-ых годов существенно ограничило возможность их использования в качестве основного сырья для питательных сред. Дороговизна животных и растительных белков, а также отсутствие широкомасштабного промышленного производства других видов непищевого сырья, пригодных для использования в средоварении, явились предпосылками возвращения интереса ученых к хлебопекарным и пивным дрожжам на основе современных научных представлений и методов. В 2000-2013 годах начинают появляться публикации [13, 116, 328], посвященные применению аутолизатов и экстрактов пекарских дрожжей в качестве стимуляторов роста некоторых микроорганизмов и самостоятельных питательных основ. По сути это явилось качественно новым воплощением заложенных в 20-е – 40-е годы идей, их развитием в аспекте современных технологических приемов и адаптацией к конкретным задачам исследователей. Однако, аутолизаты и экстракты пекарских дрожжей имеют ряд недостатков, ограничивающих их широкое применение как главных ингредиентов питательных сред. Так, дрожжевые экстракты характеризуются низкими показателями общего и аминного азота, являясь фактически источником витаминов, а не аминокислот и азотсодержащих компонентов. Аутолизаты пекарских дрожжей представляют собой самостоятельные питательные основы с достаточно высоким аминным азотом и богатым аминокислотным составом, но стандартизация их затруднена в связи с неуправляемостью процесса аутолитического гидролиза за счет собственных дрожжевых ферментов – пепсиназы, триптазы и эриптазы, имеющих различную специфичность при взаимодействии с белковой молекулой. Каждый из этих ферментов имеет

строго определенную направленность в отношении связывания с субстратом и разрыва пептидных связей, свой оптимум температуры и концентрации водородных ионов [138]. В процессе аутолиза невозможно дозировать ферменты, вносить их в гидролизуемую смесь в заданных временных точках. Продукт, получаемый в результате такой ферментативной реакции, содержит пептиды с различной молекулярной массой, длиной и степенью полимерности. Скорость и степень усвоения таких пептидов бактериями достаточно вариабельна, что ведет к неравномерности развития в среде микробной популяции. Наконец, невозможность дозирования ферментов, расщепляющих углеводы и липиды у дрожжей, может приводить к накоплению в конечном продукте ди- и трисахаридов, липидов, а также веществ, образующихся в результате сахаро-аминных реакций – меланоидинов. Это вызывает дисбаланс в составе сред на основе дрожжевых аутолизатов, может ингибировать рост микроорганизмов, ограничивает применение таких сред при добавлении к ним индикаторов, затрудняет осветление питательной основы.

По нашему мнению представляется целесообразным и перспективным использовать для гидролиза пекарских дрожжей стандартные ферментные препараты панкреатина крупного рогатого скота, выпускаемые предприятиями мясоперерабатывающей и фармацевтической промышленности, с известной активностью его основных компонентов – трипсина, амилазы и липазы. Очевидные преимущества панкреатического гидролиза пекарских дрожжей – это его управляемость и прогнозируемость, возможность дозирования фермента и оптимизации соотношения фермент-субстрат, мягкость действия панкреатина на белки, что значительно снижает опасность рацемизации аминокислот и образования вторичных продуктов, узкая специфичность действия трипсина (гидролизует только пептидные связи, образованные основными аминокислотами – лизином и аргинином), достаточно глубокое расщепление им дрожжевых белков с образованием низкомолекулярных пептидов и отдельных аминокислот, хорошо

усваиваемых микробами при минимальных затратах энергии на мобилизацию клеточных депептидаз, высокая активность компонентов панкреатина – амилазы и липазы, что значительно снижает концентрацию липидов и полисахаридов в конечном продукте, создаёт условия для его хорошей осветляемости и возможности использования в составе сред с индикаторами, сохранение в гидролизате основных нуклеотидов и витаминов группы В, необходимых для стимуляции роста бактерий. Изложенные аргументы в пользу панкреатического переваривания пекарских дрожжей, их всесторонняя изученность с точки зрения производства и коммерции [154, 314] позволяют рассчитывать, что полученная таким образом питательная основа обеспечит в составе сред различного назначения возможность культивирования, выделения и идентификации штаммов холерного вибриона и чумного микроба и станет достойной альтернативой традиционным мясным и казеиновым гидролизатам. Низкая себестоимость и стандартность (соответствие ГОСТ 171-81 и некоторым ТУ) исходного сырья – дрожжей хлебопекарных прессованных и панкреатина крупного рогатого скота сухого, достаточное количество отечественных предприятий, выпускающих указанную продукцию, простая технология изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей и сред из него, в перспективе создают предпосылки конкурентоспособности и востребованности данного белкового гидролизата на современном рынке отечественных и импортных микробиологических питательных сред, что особо актуально и в аспекте импортозамещения.

Цель работы. Разработка технологии изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) и изучение возможности его использования в качестве питательной основы сред для холерного вибриона и чумного микроба.

Задачи исследования

1. Изучение возможности и эффективности использования различных марок дрожжей хлебопекарных прессованных в качестве исходного сырья для изготовления белкового гидролизата – ПППД.

2. Определение оптимальных условий панкреатического гидролиза дрожжей хлебопекарных прессованных для получения белкового гидролизата – ПППД с заданными характеристиками (физико-химическими и биологическими показателями).

3. Характеристика и оптимизация стадий технологического процесса изготовления ПППД.

4. Сравнительное изучение ПППД и применяемых в микробиологической практике белковых гидролизатов в составе питательных сред по основным биологическим показателям в отношении холерного вибриона и чумного микроба, в том числе, и в аспекте возможности создания на его основе универсальной питательной среды для обоих указанных микроорганизмов.

5. Исследование возможности использования ПППД в качестве питательной основы сред для культивирования и выделения чумного микроба.

6. Исследование возможности использования ПППД в качестве питательной основы сред для культивирования, выделения и изучения свойств холерного вибриона.

Научная новизна

1. Впервые разработан и защищен патентом на изобретение (патент РФ № 2375441) способ изготовления новой питательной основы – ПППД: определены требования к исходному сырью (дрожжам хлебопекарным прессованным); подобраны препараты панкреатина крупного рогатого скота сухого, необходимые для гидролиза дрожжей хлебопекарных; установлены оптимальные способы предварительного ингибирования собственных дрожжевых ферментов; определены факторы, влияющие на панкреатический

гидролиз дрожжей хлебопекарных прессованных (марка дрожжей, плотность их суспензии, дозы и временные точки внесения в гидролизуемую суспензию хлебопекарных дрожжей препаратов панкреатина, значения рН, температуры и длительности гидролиза) и найдены оптимальные условия его проведения; дифференцированы основные этапы и стадии получения ПППД, обобщенные в технологическую схему.

2. Впервые показаны преимущества ПППД перед используемыми в микробиологической практике белковыми гидролизатами по биологическим показателям (в составе питательных сред) в отношении холерного вибриона и чумного микроба, в том числе, и в аспекте создания на его основе универсальной питательной среды для обоих указанных микроорганизмов.

3. Впервые показана возможность эффективного использования ПППД в качестве универсальной моноосновы питательных сред различного назначения для холерного вибриона.

4. Впервые на основе ПППД создан комплекс питательных сред для культивирования, выделения и идентификации по биохимическим признакам холерного вибриона, превосходящих по ряду биологических показателей существующие аналоги. Входящая в состав комплекса жидкая накопительная питательная среда запатентована (Патент РФ № 2392310 «Среда обогащения для холерного вибриона»).

5. Впервые продемонстрированы преимущества разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона перед используемыми в практике средами аналогичного назначения в ходе мониторинга объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона и тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ по локализации очага холеры.

6. Впервые показана возможность использования ПППД в качестве моноосновы питательных сред для культивирования чумного микроба при 28°C и 37°C.

7. Впервые на основе ПППД сконструирована агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C, являющаяся единственной монокомпонентной по питательному субстрату и самой малозатратной из предложенных ранее сред аналогичного назначения и превосходящая последние по ряду биологических показателей. Сконструированная среда запатентована как составляющая способа определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях чрезвычайных ситуаций (патент РФ № 2350656) [243].

8. Впервые на основе ПППД сконструирована экономически выгодная агаризованная питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C, не уступающая по биологическим показателям применяемым в лабораторной практике средам.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость настоящей работы заключается в том, что впервые сформулированы научно обоснованные подходы к разработке новой универсальной основы питательных сред – ПППД. Впервые дана характеристика ПППД по физико-химическим и биологическим (в составе питательных сред) показателям. Продемонстрированы преимущества ПППД перед используемыми в практике в качестве питательных основ белковыми гидролизатами отечественного и импортного производства (что особо значимо в аспекте импортозамещения в сфере обеспечения лабораторной диагностики опасных инфекционных болезней). Показана возможность конструирования на основе ПППД питательных сред различного назначения для холерного вибриона и чумного микроба. Впервые предложены критерии оценки белковых гидролизатов в аспекте возможности создания на их основе универсальной питательной среды, позволяющей культивировать и выделять оба указанных микроорганизма. Полученные экспериментальные данные о характере и особенностях роста исследованных штаммов *V.cholerae* и *Y.pestis* на средах, включающих предлагаемую основу в качестве единственного питательного субстрата, свидетельствуют о том, что ПППД

обеспечивает потребности в необходимых для жизнедеятельности указанных микроорганизмов веществах и в перспективе может служить инструментом для их всестороннего и углубленного изучения.

Практическая значимость настоящей работы состоит в следующем.

1. Впервые разработана технология изготовления новой универсальной основы питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба.

2. Разработана новая питательная основа сред для холерного вибриона и чумного микроба – ПППД. По результатам её комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная Ученым Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и утвержденная директором института.

3. Сконструирован щелочной агар на основе ПППД для культивирования и выделения холерного вибриона. По результатам его комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная Ученым Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и утвержденная директором института. Осуществляется процедура государственной регистрации указанной питательной среды.

4. Сконструирована жидкая накопительная питательная среда на основе ПППД для культивирования и выделения холерного вибриона. По результатам её комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная Ученым Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и утвержденная директором института. Осуществляется процедура государственной регистрации указанной питательной среды.

5. Разработан бульон на основе ПППД для культивирования холерного вибриона. По результатам его комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и

эксплуатационная документация, одобренная Ученым Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и утвержденная директором института.

6. Сконструирована питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. По результатам её комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная Ученым Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и утвержденная директором института.

7. Сконструирована питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот. По результатам её комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная Ученым Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и утвержденная директором института.

8. Сконструирована глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний. По результатам её комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препарат оформлена нормативная и эксплуатационная документация, одобренная Ученым Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и утвержденная директором института.

9. Разработаны агаризованные питательные среды на основе ПППД для культивирования чумного микроба при 28°C и 37°C. По результатам комиссионных испытаний получено положительное заключение. На препараты оформлены нормативная и эксплуатационная документация.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработана технология, позволяющая получать белковый гидролизат – ПППД, являющийся новой экономически выгодной и

конкурентоспособной универсальной питательной основой сред для холерного вибриона и чумного микроба.

2. Разработанный белковый гидролизат – ПППД обеспечивает питательные потребности как холерного вибриона, так и чумного микроба, может служить основой при конструировании питательных сред для их культивирования, выделения и идентификации, а по своим биологическим показателям в отношении указанных микроорганизмов превосходит используемые в практике средоварения отечественные и импортные белковые гидролизаты, в том числе и в аспекте возможности создания на его основе универсальной питательной среды для *V.cholerae* и *Y.pestis*.

3. Разработаны методические подходы к оценке возможности использования белковых гидролизатов в качестве моноосновы универсальной питательной среды для холерного вибриона и чумного микроба.

4. Созданный на основе ПППД новый комплекс питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона по ряду биологических показателей превосходит используемые в практике аналоги, что обуславливает его более высокую эффективность при решении научных и практических задач.

5. Питательные среды, сконструированные на основе ПППД позволяют осуществлять культивирование чумного микроба как при 28°C, так и при 37°C.

6. Разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C, являясь единственной монокомпонентной по питательному субстрату средой из предложенных для этой цели ранее, превосходит последние по скорости роста, накоплению биомассы и фракции I.

Апробация работы

Основные положения диссертации были доложены:

- на заседании Проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для

человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (Ростов-на-Дону, 2002 г.);

- на заседании Проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (Ростов-на-Дону, 2004 г.);

- на заседании Проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (Ростов-на-Дону, 2006 г.);

- на заседании Проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (Ростов-на-Дону, 2010 г.);

- на Совещании специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой (Ростов-на-Дону, 2011 г.);

- на расширенной коллегии Управления Роспотребнадзора по Ростовской области (Ростов-на-Дону, 2011 г.);

- на заседании Проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (Ростов-на-Дону, 2012 г.);

- на Совещании руководителей противочумных учреждений (Москва, 2013 г.);

- на Совещании специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой (Ростов-на-Дону, 2013 г.);

- на межрегиональной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология)» (Ростов-на-Дону, 2015 г.);

- на научных конференциях ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт в 2001(3 доклада), 2004, 2009, 20015 гг.

Публикации результатов исследований

Настоящая работа выполнена в рамках семи плановых государственных научных тем:

- НИР № 017-4-02 (№ государственной регистрации 02.2.00701) «Разработка питательных сред для культивирования и выделения холерных вибрионов на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей»;

- НИР № 021-2-02 (№ государственной регистрации 01.200.212994) «Разработка питательной среды на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования чумного микроба при 37°C»;

- НИР № 073-4-06 (№ государственной регистрации 02.2.00900866) «Разработка питательной среды на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот»;

- НИР № 098-4-08 (№ государственной регистрации 0120.0800412) «Изучение циркуляции холерных вибрионов в водоемах и стоках г. Ростова-на-Дону с комплексной оценкой эпидемической опасности выделенных культур»;

- НИР № 099-4-08 (№ государственной регистрации 0120.0800413) «Разработка питательной среды на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях»;

- НИР № 127-4-10 (№ государственной регистрации 0120.0907522) «Разработка глюкозо-лактозной агаризованной питательной среды на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона на этапе отбора колоний»;

- НИР № 136-4-11 (№ государственной регистрации 0120.01002622) «Разработка алгоритма обеспечения питательными средами специализированной противоэпидемической бригады при работе в очаге холеры».

По материалам диссертации опубликована 31 научная работа, из них - 26 статей, в том числе 14 – в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденного ВАК Министерства образования и науки РФ и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание искомой ученой степени, подготовлены в соавторстве два нормативно-методических документа федерального уровня, восемь комплектов нормативной и эксплуатационной документации на разработанные питательные среды. Получены три патента на изобретения.

Структура диссертации

Диссертация изложена на 302 страницах, содержит введение, обзор литературы, пять глав собственных исследований (включающих главу 2 «Материалы и методы»), заключение, выводы, иллюстрирована 39 таблицами и тремя рисунками. Библиография представлена 524 работами, в том числе 347 - отечественными, 177 - иностранными.

Личный вклад автора

Все основные разделы диссертации, раскрывающие актуальность, научную новизну, теоретическую и практическую значимость, объект, структуру исследований, получение, анализ и обобщение результатов, формулирование выводов, апробацию и внедрение в практику разработанной питательной основы и сконструированных сред выполнены лично автором. Часть разделов 6.2-6.5 Главы 6 основывается на материалах, полученных в соавторстве с Д.И. Каминским, что отражено в опубликованных совместных научных работах в изданиях из перечня ВАК и патенте Российской Федерации № 2392310.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Предисловие

Современная концепция эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, в том числе чумой и холерой, предусматривает комплекс мероприятий, направленных на обеспечение биологической безопасности и санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. Система такого надзора позволяет реализовывать противоэпидемические мероприятия, в том числе при чрезвычайных ситуациях. В конце 1990-х гг. в России остро встал вопрос о развитии производства медицинских иммунобиологических препаратов, обеспечивающих эпидемическую безопасность страны. Госсанэпиднадзору, Минздравмедпрому и РАМН Правительством РФ было предложено повысить требования контроля препаратов медицинского назначения и модернизировать производство питательных сред [253, 335]. В условиях постоянного прогресса во всех областях биологических наук и медицины появились успехи в микробиологической промышленности. Этому способствовал информационный взрыв, новые теоретические аспекты, касающиеся физиологии микроорганизмов [19, 53]. Потребности бактерий в питательных веществах, ионах, ко-факторах, зависимость ферментативных реакций от pH, температуры, наличия кислорода разнообразны, хотя имеется немало «функциональных аналогий» [362], в том числе, паразитизм. Для исследования таких микроорганизмов пытаются *in vitro* реконструировать те параметры, которые поддерживали жизнь патогенных организмов в «хозяине» [470]. Осуществляются попытки «метаболического моделирования» адаптации к условиям питания во время инфекции на молекулярном и организменном уровне [418]. Эти общие положения должны послужить предпосылкой для лучшего понимания той роли, которая отведена знаниям питательных потребностей *Yersinia pestis* и *Vibrio cholerae* при конструировании новых питательных сред.

1.2 Физиологические особенности и питательные потребности *Yersinia pestis*

Научно обоснованное учение о чуме начало создаваться в 1894 году, когда П. Китагато и А. Иерсен независимо друг от друга во время эпидемии чумы в Гонконге выделили её возбудителя в чистой культуре от людей. В 1911 г. Д.К.Заболотный, Л.М.Исаев и А.А.Чурилина получили культуру возбудителя чумы от тарбагана [123]. Современное представление о механизме энзоотии чумы включает трансмиссию микроба от блох к животному-хозяину и симбиоз с сапрофитной микрофлорой, содержащейся в субстрате нор. В межэпидемический период возбудитель чумы способен сохраняться при температуре до 8°, защищённый биоплёнкой [63, 505]. *Y.pestis* существует в природе как облигатный паразит: инфекция человека проявляется в виде бубонной, септической и лёгочной чумы, а проживание вне инфицированного животного имеет ограниченные возможности [251, 257]. Историко-географические характеристики, особенности взаимосвязи с грызунами, ферментативные свойства позволяют использовать разные схемы деления штаммов чумного микроба на биотипы и биовары [49, 265, 311, 358, 524]. При наличии отклонений по ферментативной активности [405], такие штаммы называют «атипичными» [56], «подвидом» [212], «разновидностью» [292]. Относительно недавно в нашей стране проведена систематика возбудителей чумы, в которой учтены отличия циркулирующих в Евразии штаммов от трёх ранее признанных биотипов [163, 247]. Это стало возможно благодаря использованию комбинации новых методов анализа генов чумного микроба.

Вид *Y.pestis* характеризуют [81, 238] как хемоорганотрофный микроорганизм, факультативный анаэроб, обладающий и дыхательными и бродильными типами метаболизма. Катаболизирует D-глюкозу (мальтозу, трегалозу, маннит) с образованием кислоты [122, 285]. Среди метаболитов углеводного обмена у чумного микроба выявлены пировиноградная,

щавелевоуксусная, альфа-кетоглутаровая, янтарная кислоты. Из ферментов, связанных с дыхательной цепью, обнаружена цитохромоксидаза, каталаза, пероксидаза [81, 93, 473], но нет оксидазы. *Y.pestis* не имеет глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы, реализуя, как альтернативу, глиоксалатный путь [426]. К анаэробному процессу подключается гексозомонофосфатный шунт [93], который может «служить моделью того, что медленно осуществляется в природных условиях» при недостатке кислорода [302]. Анаэробный путь обмена нередко сопровождает существование чумного микроба в условиях, при которых замедлено окисление глюкозы и увеличено содержание в среде пировиноградной кислоты. При низком парциальном давлении кислорода (в организме сурка) долгое время он «может рассчитывать» только на продукты, которые образуются в организме животного в процессе усвоения глицерина при реализации окислительного пути Эмбдена-Мейергофа [302, 469]. Метаболические пути *Y.pestis* связаны с обменными процессами окружающей среды, и питательные потребности возбудителей чумы из разных природных очагов зависимы от наличия «готовых» аминокислот, если они не синтезируются чумным микробом [14, 63, 266, 284, 288]. Он является ауксотрофом в отношении нескольких аминокислот, и при 37°C имеет дополнительные питательные потребности, включая биотин, тиамин, пантотенат, глутаминовую кислоту [108, 227]. Активируется система транспорта аминокислот в клетку, аденилатциклазная и АТФазная активность, нейраминидаза, альдолаза, пирофосфатаза [114, 177, 213]. Этот каскад биохимических превращений связан с процессом адаптации микроба к новым условиям. Синтез азотистых продуктов может происходить за счёт аммиака, солей азотистой кислоты и других соединений, образующихся в организме «хозяина» [21, 81]. Известно, что «лишь при достижении определённой для каждого вида микробов окислительно-восстановительной ёмкости (Eh) они начинают делиться» [28]. Изучено влияние этих параметров на жизнедеятельность *Y.pestis* [82, 109, 404]: повышенное напряжение кислорода в среде роста, понижение рН отрицательно сказываются на

размножении. При выращивании чумного микроба на агаровых средах оптимальное значение ρh 100-150 mV при pH 6,9-7.2 и положительное влияние оказывает пониженное напряжение кислорода.

Хотя бульонные культуры чумных бактерий В.Хавкин получал еще в 1896 г. в больших объемах при изготовлении вакцины [146], на плотных питательных средах клетки *Y.pestis* нередко лишены способности быстро размножаться и, в последующем, приживаться в организме животных [90, 98, 146, 284, 301]. Замедленный рост с образованием колоний R-формы, неспособность к росту на голодной среде, отсутствие жгутиков - вот что характерно для выращивания на плотной питательной среде. При «голодании», понижении количества углеводов кислород тормозит рост. Анаэробные условия позволяют *Y.pestis* хорошо расти при наличии акцепторов водорода (гемина, никотиновой кислоты), конечным акцептором электронов для окисления углеводов могут быть нитраты [311]. Важную роль играют носители ионов железа [363, 487]. Присутствие системы захвата железа (сидерофора) связывают с вирулентностью чумного микроба, при этом существенна роль элементов крови теплокровных животных - эритроцитов и макрофагов [58, 91, 288, 305, 429].

Физиология микробов изучает не только биохимические процессы, происходящие в этих одноклеточных организмах, но и особенности жизнедеятельности в зависимости от климато-географической и конкретной среды обитания. Чумной микроб достаточно пластичен, чтобы приспособиться к разным хозяевам, неблагоприятным условиям среды [16, 99]. Проблема вирулентности чумного микроба занимают заметное место в специальной литературе [27, 56, 62, 78, 94, 213, 380, 390]. Возбудитель чумы образует капсулу, которая, как у многих патогенных бактерий, служит для защиты от неблагоприятных воздействий [165, 378, 381, 388]. Основным компонентом капсулы чумного микроба, синтезируемым и секретиремым при 37°C, считают капсульный антиген, «фракцию I» Бейкера [174]. При 28°C синтез белка F1 уменьшается в сотни раз [358], и он, в

основном, связан с клеточной стенкой [36, 60]. «Температурная зависимость» является важной особенностью *Y.pestis* [26, 72, 190]. Повышение температуры заметно увеличивает количество полисахарида в химическом составе чумных микробов, перераспределяет белок, поскольку недостаёт ферментов, утилизирующих его «для внутренних нужд» [27, 382]. Под влиянием специфических сигналов повышения температуры «37° С» и «37° С – Са» (сигнал низкого содержания ионов кальция в среде) происходит смена метаболических процессов [64, 214]. Слабая экспрессия *cafI* объясняется низким уровнем питательных веществ для роста при 37°: источников углерода, азота, ионов металлов, и регуляторным механизмом физиологических процессов становится сигнал «37° С–низкий рН» при рН 6,0 [64, 78, 409]. Под его воздействием находятся белки поверхности клетки с функцией адгезина, которые помогают адаптации чумного микроба путём гемагглютинации, аутоагрегации, образования биоплёнки [21, 409]. На эти процессы влияет концентрация глюкозы выше физиологической [450]. Подтверждено значение биоплёнок для представителей рода *Yersinia* [409] как способа сохранности чумного микроба в воде [70] и в преджелудке блох [288]. Формированию биоплёнок у блох способствует гемоглобин эритроцитов. Функциональную мобильность и пластичность бактерий чумы также отражает их существование в виде L-форм, которые получали в эксперименте и выделяли в природных очагах [101, 149, 171].

При сниженном обмене чумные микробы постепенно переходят в «покоящееся» состояние, когда происходит использование внутренних резервов питания. Клетки принимают вид мелких кокков, в эндогенный метаболизм включаются «строительные» аминокислоты, за счёт которых энергетический уровень жизнеобеспечения поддерживается несколько месяцев [49, 448, 462]. В почве природных очагов, органах павших животных происходит репрессия синтеза факторов патогенности. Процесс формирования нового фенотипа происходит под влиянием нескольких генов,

среди которых – регулятор анаэробно-нитратного пути (гены, индуцируемые голоданием, изменением температуры и осмоса) [288]. Во внешней среде чумные бактерии могут выступать в роли паразитов, «отбирать» у сапрофитов факторы жизнеобеспечения, находясь «в скрытой форме в сложном симбиозе с новым хозяином – почвенным микроорганизмом» [172]. Эксперименты [229] демонстрируют рост чумного микроба в ассоциации с почвенными амёбами, метаболиты которых он использует. При переходе из окружающей среды внутрь теплокровного организма бактерии испытывают температурный стресс, вызванный резким повышением температуры. Концепция «перекрёстной защиты» (высокая температура - дефицит кислорода) объясняет возможность сохранения вирулентности *Y.pestis* после существования вне организма хозяина [25]. Исследования на чуму в полевых условиях включают, помимо людей, обследования многочисленных видов грызунов, блох грызунов, клещей и мест их обитания. Приготовление благоприятных для выращивания чумного микроба сред требует в какой-то степени воссоздать условия персистенции *Y.pestis* в разных экологических нишах. Все условия обитания чумного микроба в природе не реально моделировать *in vitro*, однако, на основании современных представлений об «узловых моментах» его физиологии можно не только успешно выделять культуры из разнообразных источников, но и воссоздавать отдельные фрагменты жизнедеятельности на этапах его циркуляции. На основании этих данных появилась возможность разработки новых питательных сред культивирования чумного микроба для разных целей, в том числе для выявления каталазы [87], признака пигментации [191], синтеза капсульного и основного соматического антигена [50]. Выделение и выращивание чумных микробов считается более благоприятным при 28°C на плотных средах [108, 301], но при этом снижена продукция F1 вследствие «слабой экспрессии генетического детерминанта, кодирующего синтез антигена» [110]. Эксперименты по выращиванию и содержанию чумных микробов при низких температурах [115] показали многократное

повышение абсолютного показателя живых клеток бактерий чумы и сохранность титров F1-антигена долгое время. При 10-12°C имеет место исходный (а в некоторых случаях более высокий) уровень кальций-зависимых чумных бактерий [31]. Признаки зависимости роста от ионов кальция наблюдаются при повышении температуры до 37°C [93]. У ауксотрофов аминокислоты, вводимые для роста чумного микроба при 37°C, тормозят синтез капсульного антигена F1 [222]. Источниками ограничения размножения трудно управлять, поскольку не удаётся «охватить весь возможный спектр лимитации» [340]. Изучение роста и фенотипической экспрессии антигенов вакцинного штамма EV НИИЭГ показало, что в условиях повышенной аэрации и температуре 37°C имеет место многообразное влияние на продукцию различных антигенов [146]. Глюкоза в концентрации 0,4-0,8% тормозит накопление F1, существенно не влияя на рост и размножение чумного микроба [61, 110], а содержание в среде 1% глюкозы приводит к гибели клеток [191]. Заметно увеличивает потребление кислорода и повышает количество живых клеток в бульоне Хоттингера концентрация железа в пределах 0,46-0,86 мг% [322]. При введении в агаровые среды эритроцитов человека или морской свинки рост чумных микробов лучше, чем при добавлении эритроцитов барана, кролика, лошади [305], а фибриноген крови не оказывал влияния [306]. На биологические показатели питательных сред - размножение, выработку ферментов и антигенов чумного микроба оказывает влияние степень расщепления азотистой основы питательной среды [286] и различные стимуляторы роста, в какой-то степени аналогичные действующим *in vivo* в условиях симбиоза или в кровяном русле больного [130, 491].

1.3 Физиологические особенности и питательные потребности *Vibrio cholera*

Семейство *Vibrionaceae* включает многочисленные (более 50) виды водных бактерий. Существовая в пресных и солёных водоёмах, они могут быть

прототрофами или сапрофитами [206, 262]. *Vibrio cholerae* семейства *Vibrionaceae* - один из многочисленных патогенных для человека видов рода *Vibrio* [366]. Этот факультативный патоген человека также обитает в морской воде, эстуариях и реках, и такому двухфазному состоянию способствуют специальные физиологические атрибуты [471, 488]. Популяция холерных вибрионов может образовать биогеографический профиль [442] и географическую дивергенцию патогенных клонов [164], различия генетических линий в природных резервуарах [468]. Среди двух биоваров - классического и Эль Тор из 206 серогрупп *V.cholerae* к эпидемически значимым, о чём свидетельствует наличие генов холерного токсина - *ctxA* и пилей адгезии - *tcrA*, относятся вибрионы O1 и O139 серогрупп [104, 169, 170]. Вопросам современной классификации вибрионов посвящены многочисленные работы [77, 275, 486, 494]. *V.cholerae* содержит 2 хромосомы [422], и, репликация меньшей из них зависит от гена, имеющегося только у этого семейства [401]. Холерные вибрионы принадлежат к факультативным анаэробам и гетеротрофным микроорганизмам, обладающим декарбоксилазой, коагулазой, пероксидазой, индофенолоксидазой, редуктазой; протеолитическими, сахаролитическими, липолитическими и другими ферментами [5, 147, 178, 238, 313]. Углеводный обмен холерных вибрионов осуществляется, в основном, при разложении глюкозы - универсального источника энергии и мощным индуктором колонизации [428]. В результате гликолиза по схеме Эмбдена-Мейергофа образуется кислота без газа [283]. При распаде глюкозы в среде роста может накапливаться молочная, уксусная кислота, ацетилметилкарбинол-ацетоин (в аэробных условиях), этанол, муравьиная кислота, альдегиды, диацетил (в анаэробных условиях) [5]. Среди его метаболитов найдены янтарная и щавелевоуксусная кислоты. Обнаружены ферменты, имеющие отношение к дыханию: каталаза, цитохромоксидаза [147, 521]. Перенос электронов, окислительное фосфорилирование и образование АТФ у бактерий локализованы в цитоплазматических мембранах [283]. Отношение холерных

вибрионов к сахарам довольно устойчивое, даже при длительном хранении штаммов они разлагают полисахариды: крахмал и гликоген; низкомолекулярные углеводы: фруктозу, целлобиозу, трегалозу, глицерин, маннит; дисахариды - сахарозу и мальтозу гидролизуют на моносахариды, некоторые штаммы-лактозу; не ферментируют арабинозу, дульцит, раффинозу, рамнозу, инозит, салицин, сорбит [208]. Однако, недавно в регионе Латинской Америки было зафиксировано преобладание штаммов, неспособных к ферментации сахарозы [415]. В процессе энергетического обмена почти всем организмам необходимо железо. Гем не обнаружен только у анаэробных клостридий и молочнокислых бактерий [207]. *V. cholerae* получает железо посредством секреции сидерофора-вибриобактина [454]. Три молекулы его являются донорами пяти атомов кислорода. Хемогетеротрофные микробы, к которым относится холерный вибрион, осуществляют в цикле трикарбоновых кислот обратимые реакции окисления-восстановления, используя два пиридиновых нуклеотида: никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Наличие в среде определённых источников углерода влияет на весь метаболизм холерных вибрионов - от них зависит экспрессия генов, контролирующих уровень размножения [483]. При лабораторной диагностике токсигенных холерных вибрионов представляют ценность способы выявления скорости расщепления восстановленных продуктов D-фруктозы: маннита [176] или сорбита [515]. Установлено, что продукция молочной и муравьиной кислот в среде для ферментации сорбита у нетоксигенных культур происходит раньше. НАД – зависимая маннитолдегидрогеназа становится возможным маркером для нехолерогенных штаммов [215]. Использование холерными вибрионами пути усвоения углеводов по схеме Энтнера-Дудорова [207, 481] осуществляет не только энергетическую функцию, но и ведёт к активации группы генов, повышающих уровень транскрипции *ctx*, *tcr* и регулятора *toxT*.

Метаболические процессы распада и синтеза азотосодержащих компонентов отличаются от катаболизма и анаболизма углеводов. Белки и нуклеиновые кислоты представляют собой азотсодержащие биополимеры, расщепление которых на субъединицы происходит при гидролизе. Такая протеолитическая активность холерных вибрионов имеется практически у всех штаммов. Утилизацию азота холерные вибрионы осуществляют, отщепляя аминокислоты от других соединений. Вибрионы расщепляют пептидные связи разного характера, в результате чего образуются азотистые соединения: полипептиды, аминокислоты [353]. В качестве энергетического материала аминокислоты используются редко - в условиях голодания или иного стресса. Помимо участия в анаболических процессах (особенно, синтезе ферментов), они задействованы в «проявлениях вирулентности», как например, MetR- регулятор *V.cholerae* [372]. При наличии в среде пуриновых и пиримидиновых оснований холерные вибрионы утилизируют гуанин, урацил, аденин, (слабо) цитозин. Необходимые пурины и пиримидины они могут создавать сами, используя глюкозу и аммиак, синтезируют нуклеиновые кислоты и различные по сложности нуклеопротеиды.

Липиды представляют собой химически гетерогенную группу (жиры, фосфолипиды, стероиды и прочие), разделённую не столько по химическому составу, сколько на основании растворимости в органических растворителях. Фосфолипиды являются универсальным компонентом мембран [283]. Они синтезируются из жирных кислот и продукта гликолиза – диоксиацетонфосфата. Потребность в веществах липидной природы холерные вибрионы удовлетворяют с помощью ферментов липазы и лецитиназы, однако вибрионы классического биовара (вирулентные) растут на среде с жиром, не проявляя гидролитической активности по отношению к нему. Способность гидролизовать жир (и глицерин) коррелирует с гемолитической активностью холерных вибрионов: у атоксигенных штаммов

наблюдали гидролазную активность на питательной среде с глицерином [4]. Липаза и лецитиназа, наряду с протеолитическими ферментами и нейраминидазой, участвует в прикреплении холерных вибрионов к слизистой оболочке кишечника [216, 436, 502].

В обеспечении физиологических процессов у холерных вибрионов играют роль минеральные соли, в особенности, хлористый натрий. Сохранение культуры и рост клеток возможны в морской воде [512, 520]. Холерные вибрионы размножаются в присутствии хлористого натрия (0,5–2,0)% , хорошо растут в щелочной (до pH 9,2) среде, при температурах от 10 до 40°C. На питательной среде, в основном, минеральной, культуру холерных вибрионов впервые получил Н. Ушинский в 1898 г. [140]. Холерные микробы способны синтезировать протеолитические ферменты в жидкой синтетической среде, состоящей из глюкозы, хлористого натрия и аммонийной соли [178, 353]. По мнению некоторых исследователей [40], в популяции холерных вибрионов много неприхотливых клеток, способных расти на минимальной среде Бхаскарана и Роули, но есть ауксотрофы, зависимые от азотистых компонентов. Хороший урожай холерных вибрионов можно получить на минеральной среде, содержащей тирозин, аспарагин, гликокол [147], а на минимальных средах с добавками в виде аминокислот и нуклеозидов - холерный экзотоксин [179, 411].

Ретроспективные исследования включают выявление генотипических связей между штаммами холерных вибрионов со сходными фенотипическими свойствами [250], определяют различные виды гетерогенности популяции – генетической и филогенетической [465]. Современный филогенетический анализ популяции возбудителя седьмой пандемии Эль Тор и его предшественников выявил несколько групп в эволюции холерного вибриона [294], появление гибридов со свойствами классических и Эль Тор вариантов, новых типов гена *ctx* [263, 367]. В 2010 г. на Гаити у штаммов возбудителя холеры были выделены гены, характерные

для классических вариантов шестой пандемии. Эволюционная и сравнительная физиология рассматривает структурные и функциональные особенности организмов, определяет наличие факторов, способствующих сохранению вида в разных экологических условиях [275, 295, 448]. Данные, в том числе полученные с помощью протеомного анализа, свидетельствуют о том, что в этом велика роль системных белков, осуществляющих транспорт питательных веществ из внеклеточной среды в холерные вибрионы O1 дикого типа и non O1/ non O139 [105, 109]. В этой связи особо важная функция принадлежит секреторной системе типа VI, чей регуляторный каскад, «выравнивая последствия эволюционного давления» [433, 443] двух основных экологических ниш *V.cholerae* – кишечника человека и водной среды, поддерживает жизнеспособность микробов [414, 437, 509]. У *Vibrio spp.* есть ещё один тип секреции - T2SS, который осуществляет транзит многомерных питательных субстратов из внешней среды [360, 480, 485]. Компоненты T2SS локализованы на внутренней и внешней мембране клеточной стенки. В среде, «богатой пищей», *V.cholerae* синтезирует почти исключительно наружный порин мембраны ompU, тогда как в минимальной - OmpT [387, 427, 463]. На смену профиля Omp влияет присутствие в среде жёлчи и специфических аминокислот, участвующих также в регуляции уровня ToxR [368].

Особой формой существования холерных вибрионов, как в кишечнике хозяина, так и во внешней среде, является биоплёнка, состоящая из консорциума микробов, имеющих слизистую поверхность, и матрикса [453]. Синтез экзополисахарида микробной слизи происходит под влиянием сигналов окружающей среды [444, 500, 502]. Холерные вибрионы имеют сигнальный каскад PTS- фосфоэнолпируват- фосфотрансферазную систему, которая регулирует производство экзополисахаридов и формирование биоплёнки [523]. Активацию его осуществляет манит и его специфический фермент, в зависимости от чего меняется тип углеводов биоплёнки. В воде популяцию холерных вибрионов составляют свободноживущие

планктонные клетки и неподвижные, связанные в составе биоплёнки с биотической или абиотической поверхностью [509, 520]. В эндемичных по холере очагах токсигенные вибрионы, освобождённые от матрикса биоплёнки, более вирулентны, чем планктонные формы, что доказывает её особую роль в сохранении инфекционного начала бактерий [471]. Эти клетки устойчивы к низкой кислотности, солям жёлчных кислот, более приспособлены к колонизации кишечника. Состояние биоплёнки создаёт условия для микробного носительства [180], в связи с чем можно сказать, что холерный вибрион имеет особенности, свойственные факультативному паразиту [470]. В морском окружении, где обнаруживается недостаток фосфатов, биоплёнка «обеспечивает» увеличение концентрации этого крайне необходимого для метаболизма клетки компонента. Отмечена положительная роль ионов кальция, железа и витаминов группы В, значение подвижности клеток. Для формирования биоплёнки в искусственной среде главным компонентом являлись аминокислоты в форме пептидов и протеинов; показана регулирующая роль арабинозы, отрицательное влияние сахарозы, декстрозы, фруктозы, мальтозы, цитрата, солей жёлчи, тиосульфата [355]. По мнению некоторых исследователей [474, 484], основой адаптации холерных вибрионов к условиям обитания в кишечнике и морской воде является формирование биоплёнки на хитиновой поверхности. Взаимодействие холерных вибрионов с хитином – модель для анализа роли селекции патогенетических образцов среди водных обитателей, которая может обеспечить понимание «стиля жизни» возбудителя холеры [484]. Авторы рассматривают зоопланктон как резервуар, спасающий *V.cholerae* в межэпидемический период. Испытывая трудности с питанием, холерный вибрион ассоциирует с фито- и зоопланктоном, ракообразными, паразитируя на покрытых хитином поверхностях животных. Эта активность холерных вибрионов по отношению к организмам, содержащим хитин (кутикула насекомых, ракообразные и веслоногие животные), обусловлена наличием хитинолитической системы [100, 393]. Хитиновые остатки зоопланктона

обеспечивают бактерии питанием, становясь единственным источником углерода [371]. В искусственной питательной среде, содержащей хитин, холерные вибрионы синтезируют несколько ферментов, разрушающих его [341]. Экспрессия оперонов утилизации хитина происходит в кишечнике на поздней стадии холерной инфекции, что становится важным для холерных вибрионов в преддверии выхода в новую среду обитания (стул и вода) [368, 413]. Сам по себе хитин отсутствует на эпителии кишки человека, и хитин-связывающие компоненты холерных вибрионов способны реагировать с лактосодержащим гликофинголипидом [364]. В работе было показано, что холерные вибрионы обладают несколькими хемотаксическими специфичностями, «привязанными» к различным гликофинголипидным смесям. Колонизирующий фактор GlpA *V.cholerae* способен изменять структуры, которые управляют связыванием микроба с разными поверхностями организма [519]. Структурные компоненты, необходимые для этого - пили адгезии и полноценная клеточная стенка [387, 501]. В богатой слизью среде кишечника холерному вибриону преимущество даёт способность утилизировать сиаловые кислоты. Наличие фермента нейраминидазы и доступность к источникам углерода оказывают влияние на регуляцию генов вирулентности холерных вибрионов [356]. Помимо этого у холерных вибрионов выявлено более 40 генов для хемотаксиса, обусловленного метилированными аминокислотами [475]. Предполагается [295] наличие отдела тонкого кишечника, где в силу особых связей с лектинами происходит горизонтальный обмен генами, и химически определённый участок, где аттракция холерных вибрионов является сигналом для индукции ToxR.

Патогенные холерные вибрионы нельзя рассматривать в качестве свободноживущего вида: они имеют физиологические отличия от непатогенных вибрионов [183], хотя возбудитель холеры при его заносе в среду умеренного климата продолжает в ней существовать некоторое время. Взрывной рост, повышенные возможности диссеминации в водных системах

холерные вибрионы проявляют в нарушенных экосистемах, при температуре выше 23°C в период цветения сине-зелёных водорослей. Было установлено, что продолжительность сохранения холерных вибрионов в донных отложениях зависит от жизненного цикла зелёной одноклеточной водоросли *Scenedesmus quadricauda*. Массовое развитие цианобактерий и обилие хлорококковых зелёных водорослей совпадает с периодом обнаружения вибрионов [73, 160]. В водных экосистемах наших широт могут циркулировать атоксигенные холерные вибрионы O1- и не-O1- серогрупп. В донных отложениях морского побережья важным фактором, влияющим на присутствие *Vibrio spp.*, является присутствие нематод, которые питаются бактериями [512], однако *V.cholerae non O1/ non O139* устойчивы к ним [485]. Наряду с этим, есть сведения, показывающие роль некоторых амёб в качестве хозяина холерных вибрионов окружающей среды [348]. На дефицит питательных веществ реагирует внутриклеточная бактериальная сигнальная молекула ppGpp [480]. Под её влиянием у *V.cholerae* происходит регуляция разнообразных процессов, сопряжённых с проявлениями вирулентных свойств: подвижностью, экспрессией секреторной протеазы. Полноценный «набор» факторов колонизации кишечника человека влияет на скорость размножения и обеспечивает проживание возбудителя холеры в хозяине [465, 521]. Адаптация после стресса в водной среде происходит при участии сотен генов, экспрессии десятков белков, среди которых есть принадлежащие к классу рН-регулируемых [113, 427, 360]. Внешним сигналом, вызывающим координированное переключение синтеза, является щелочная реакция среды, высокая концентрация бикарбоната в тонком кишечнике [109, 120, 350, 369, 424]. Патогенность факультативного анаэроба *V.cholerae* проявляется в кишечнике в условиях низкого содержания кислорода, и анаэробный рост способствует синтезу факторов колонизации холерного вибриона [460]. Смена фенотипа сопровождается значительными изменениями в обмене, главное из которых – повышение энергетики анаэробноза в условиях хорошего питания, реализация метаболизма глюкозы

[423]. Каждая из двух хромосом *V.cholerae* работает по индивидуальной программе, перегруппировка в суперинтегрене SI «моделирует физиологическое состояние» клеток [360], что благоприятствует взрывному росту популяции в кишечнике человека [431]. У штаммов с повышенной скоростью роста выявляется ускоренная амплификация большой хромосомы [499] и высокая экспрессия белков, связанных с биогенезом пилей адгезии, кодированных на острове патогенности [457]. Утилизируются самые разнообразные источники питания [393]. Питательные потребности вирулентных холерных вибрионов «обслуживают» 92 метаболических пути, множество ферментативных реакций [499]. Экспрессия примерно 24 генов вовлечена в транспорт железа и 13 генов - в энергетику анаэробного катаболизма. Когда наиболее доступные субстраты кончаются, используются аминокислоты, резервные соединения. Недостаток питания отражается на специфических функциях малой хромосомы, продукции холерного экзотоксина – вторичного метаболита, синтез которого определяет координированная экспрессия нескольких структурных и регуляторных генов [401]. Диарея, которая начинается при отсутствии выраженного воспалительного ответа, сопровождается диссеминацией возбудителя холеры [414].

При заносе в среду умеренного климата возбудитель холеры продолжает существовать в ней некоторое время, однако в этих условиях патогенные холерные вибрионы нельзя рассматривать в качестве аутохтонных обитателей [183]. Повышение устойчивости вибрионов Эль Тор к стрессовым воздействиям сопровождается утратой профага СТХφ, изменением уровня экспрессии ряда белков [325]. Гетерогенность выделяемых из воды холерных вибрионов признаётся многими авторами [74, 105, 275, 505]. Их популяция делится на свободноживущие планктонные клетки и неподвижные, связанные с биотической или абиотической поверхностью [509, 520]. Диссоциация сопровождается глубокими изменениями биохимических свойств, переходом в R-форму, появлением

«ругозных», «слизистых» форм [482, 522], которые способствуют образованию биоплёнок [437, 444]. Осуществление этого процесса происходит под контролем плотности популяции («чувство кворума»), при поддержке нескольких регуляторных путей с разнообразными физиологическими функциями [180, 439]. По данным на 2012 г. [117], из поверхностных водоёмов территории РФ изолировано 73 неэпидемических штамма *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор, среди которых 66,7% были атипичными по комплексу признаков. Здесь уместно сказать, что даже в эндемичных по холере регионах в межэпидемический период до 99,2% культур вибрионов из воды лишены главных факторов вирулентности – холерного токсина и пилей адгезии [407, 408]. В неблагоприятной среде изменения обмена иногда сопряжены с переходом в L- форму и «некультивируемое» состояние [184, 456, 198]. Исчерпание источников питания и энергии, неоптимальный уровень температуры, оксигенации, влияние химических веществ и токсинов вызывает стресс, результатом которого является образование покоящихся форм. Чтобы выжить в таких условиях, микроорганизмы избирают стратегию «энергетического сдерживания» со значительным замедлением обменных процессов [440, 448]. Предпочтительной становится долго сохраняющаяся стационарная фаза развития и катаболизм аминокислот ради сохранения фенотипа. Утрачивается активность ферментов патогенности, протеаз, лецитиназы, твиназы, нейраминидазы; увеличивается активность флавиновых дегидрогеназ. Выводится избыток метаболитов и меняется профиль активности АТФ-азы: увеличивается активность ключевого фермента сапрофитов – рибулёзодифосфат карбоксилазы [276]. Вместе с тем, часть популяции «покоящихся клеток» сохраняет вирулентные свойства.

Сравнение метаболизма холерных вибрионов, культивируемых *in vivo* и *in vitro*, показало, что в этих случаях бактерии находятся в разных физиологических состояниях. В организме животных большей жизнеспособностью обладали вирулентные штаммы, в то время как авирулентные вибрионы Эль Тор лучше выживали при культивировании в

речной воде [325]. Успешное выращивание *in vitro* должно следовать принципу: клетки хорошо размножаются, если искусственная питательная среда поддерживает обменные процессы, свойственные условиям естественного существования. Для продуцирования холерными вибрионами факторов вирулентности на питательных средах оптимизация предполагает двухэтапный процесс выращивания. На первом этапе генный аппарат активируют с помощью относительного анаэробноза, поскольку в кишечнике функции бактерий находятся, прежде всего, под влиянием нехватки железа и кислорода [368]. На втором – «усиленное питание» в аэробных условиях для улучшения роста [179, 434] и синтеза белка [521]. Помимо состава среды, конечный результат зависит от условий культивирования [495]. Иллюстрацией правильности общего положения служит тот факт, что оживление «покоящихся» форм холерных вибрионов можно вызвать длительным культивированием их на голодной среде при пониженной температуре [198]. Бактерии, не растущие на коммерческих средах, в экспериментальных условиях селекционируют вследствие появления в пресной воде нового фенотипа, способного выделять белки, необходимые для перехода из состояния покоя к активному метаболизму. Восстановление возможно при повышенной температуре культивирования [466]. В другой работе [438] среди покоящихся форм холерных вибрионов, испытывающих стресс от голода в водоёме, показано появление нового фенотипа, персистирующего в придонных осадках и среде с добавками хитина и фосфатов. Штамм этого фенотипа обладал факторами патогенности, позволяющими расценивать его как эпидемически опасный.

Учение об условиях существования, экологических нишах и изменчивости микроорганизмов даёт практические результаты. Знание механизмов, обеспечивающих бактерии энергией и пластическими веществами, помогает созданию искусственных систем для культивирования микробов, имеющих в природных условиях самые разнообразные формы, включая «покоящиеся» [38]. В этой связи микробиологами изыскиваются всё

новые способы лабораторной диагностики, среди которых подвергается модификации классический метод культуры - выделение и определение бактерий.

1.4 Использование различных видов сырья для изготовления основ микробиологических питательных сред

1.4.1 Общие положения

Впервые питательные основы в виде отваров и мясного бульона применили для выращивания микроорганизмов с научными целями. Широкое использование сред началось лишь после того, как Роберт Кох доказал, что микробов можно выращивать на твёрдых средах, содержащих агар-агар, и ученик Пастера Ролен, опубликовал в 1870 г. работу на эту тему [123]. Богатые питательными веществами жидкие среды (в особенности, мясной бульон) позволяли накапливать бактериальную массу, но она была неоднородна, и Р. Кох ввёл принцип работы с «чистой культурой» на плотных питательных средах. В 1930 г. Левин и Шёнлейн классифицировали более двух тысяч наименований питательных сред для культивирования микроорганизмов [197], а в 50-70 годы сформировалось мнение, что приготовить универсальную питательную среду, на которой могли бы развиваться любые микробы, невозможно [140, 283].

Культивирование микроорганизмов преследует несколько целей: выделение чистой культуры и её идентификацию, накопление бактериальной массы, продукцию ферментов, антигенов, токсинов. В соответствии с поставленной задачей используют разные среды, но в основе каждой из них должны быть жизненно необходимые питательные вещества, состав которых определяет эволюционный путь формирования вида [249]. Считается, что главным строительным материалом в микробной клетке являются аминокислоты, поэтому при изготовлении микробиологических сред на белки обращают внимание, как на основу. Сырьём питательной основы могут быть пищевые продукты, содержащие разное количество белка: рыба-18-

19%, молоко цельное – 3,3%, бобовые – 23-24%, кукуруза- 9-16%, картофель- 2%, капуста – 1,4%, морковь -1,2% [315]. Белки животного и растительного происхождения, хотя во многом и близки, но отличаются. При их гидролизе получают смеси аминокислот и пептидов разного состава. Например, сравнительный анализ содержания свободных аминокислот в разных белковых основах показал, что гидролизат отрубей имеет в два раза больше гистидина, в три – аргинина, в шесть – фенилаланина, в 14–тирозина, чем мясной перевар по Хоттингеру (ОРХ) [131]. Типичные анализы химического состава пептонов коммерческого изготовления фирмы Merk [464] таковы: pepton from soya (papainic), который имеет аминного азота 2,5% и углеводов 24%; peptone from gelatin (pancreatic), соответственно, 3% и 0,30%; peptone from meat(pancreatic) –5-6% и 3,6%. При использовании коллагена - главного белкового компонента соединительной ткани можно получить препарат, аминокислотный состав которого примерно на 30% представлен глицином [207]. Некоторые виды микробов весьма требовательны к подбору компонентов для выращивания, что значительно усложняет состав питательных сред [121]. И всё же при удовлетворении определённых общих требований к необходимым питательным веществам большие группы гетеротрофных микробов размножаются на близких по составу средах. Неотъемлемой частью многих из них являются пептоны. В руководстве [205] в списке бактерий, для культивирования которых основу среды должны составлять пептоны, перечислены представители следующих родов: *Actinobacillus*, *Ancalomicrobium*, *Asticcacaulis*, *Aquaspirillum*, *Bdellovibrio*, *Dermatophilus*, *Desulfatamaculum*, *Desulfovibrio*, *Listeria*, *Leptothrix*, *Rhodopseudomonas*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Shigella*, *Spirillum*, *Spirochaeta*, *Sporolactobacillus*, *Vibrio*, *Yersinia*.

1.4.2 Питательные среды на основе гидролизатов белков животного происхождения

Для большинства бактериологических целей наиболее пригодны: мясная вода, мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар, к неотъемлемым компонентам которых относятся пептоны, приготовленные из частично гидролизованного белка - триптического и пептического перевара [140, 278]. Приводятся [205] рецепты сред, где в качестве основы упомянуты: пептон, триптон, триптиказа, пептический гидролизат животной ткани, пептон Ортана, тиотон (пептический гидролизат животной ткани), панкреатический гидролизат казеина UPS. Чтобы понять, почему питательные среды на основе гидролизатов белков животного происхождения остаются востребованными в медицинской микробиологии, к месту напомнить особенности такого сырья как мясо. Из плотной части мышц 90% составляют белки, представленные всеми аминокислотами. Большую питательную ценность имеют экстрактивные вещества (в количестве 1,4% состава мяса), среди которых - пуриновые основания, инозиновая кислота, креатин, метилгуанидин, а также сахара, кислоты; микроэлементы представлены калием, натрием, кальцием, магнием, железом, фосфором, хлором [111, 315]. Этот уникальный состав самых разнообразных молекул при варке сред научились сохранять и использовать. Для некоторых патогенных бактерий (чумной микроб, менингококки, гонококки) продукты животного происхождения являются востребованными в силу эволюционного пути этих микроорганизмов. Преимущество «мясных» сред - это содержание в них самых разнообразных соединений, молекул и элементов, которые могут быть необходимы для любого прихотливого штамма. Недостатком, о котором всё чаще заявляют, остаётся постоянное удорожание сырья, и частичным выходом из этого можно считать использование промышленных отходов [124]. Освоение в нашей стране сухих гидролизатов из казеина, лактальбумина плаценты крупного рогатого скота, крови и сыворотки лошадей, «эмбрионального

белка», отходов сывороточного (гамма-глобулинового, фибринового) производства потребовало решения вопроса об изготовлении, стандартизации и контроле качества подобных сред [22, 51, 225, 258, 259, 319, 324]. В 1989 г. в производстве питательных сред в качестве белкового сырья использовали мясо, казеин, рыбу, рыбкостную муку, печень, сердце, плаценту, фибрин, кровь [305, 306]. Среди отечественных разработок питательных основ следует отметить гидролизаты рыбкостной муки [189, 228, 318, 334], аутолизаты рыбы [316], хотя имеются сведения, что «рыбные гидролизаты уступают мясным по накоплению биомассы», есть также различия по физико-химическим характеристикам, аминокислотному составу [3]. По мнению других исследователей [334], среды из гидролизатов рыбного сырья не уступают традиционным. Питательные среды, основы которых составляли гидролизаты из молок лососевых рыб [304], поддерживают рост различных тест-культур: *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, *Streptococcus faecalis*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Lactobacterium spp.* По некоторым данным [506], отходы рыбной промышленности составляют 78-85% живого веса, что соответствует 22-43% белка. Авторы изучили возможности применения пептонов, полученных из отходов предприятия по переработке креветок. Полученные экстракты после высушивания содержали 43-44% белка (по сухому весу). Авторы считают перспективным использование такого сырья. Сравнение данных 1989 г. и 2003 г. [135, 279] подтверждает мнение, что уже достаточно долгое время среди питательных основ микробиологических питательных сред на первых местах остаются: панкреатический гидролизат казеина и кислотный гидролизат казеина средней степени расщепления.

1.4.2.1 Использование гидролизатов белков животного происхождения для выращивания чумного микроба

При лабораторной диагностике чумы традиционной основой являлся перевар Хоттингера – ферментативный гидролизат мяса со степенью

расщепления белка 55-65%, получаемый с помощью ферментов поджелудочной железы [81, 226]. Наряду с этим, среды разнообразных рецептов изготавливали на основе казеина [126, 167, 347, 361, 497]. Проводили гидролиз различной глубины расщепления и разными методами: ферментативный [503]; солянокислотный [126, 142, 300]; сернокислотный [18, 425]. Стандартной средой для чумного микроба, рекомендуемой ВОЗ, является кровяной агар (sheep blood agar, SBA) [398], а «средой выбора» может быть питательный агар из сердечно-мозговой вытяжки [365, 507]. В Российской Федерации, в соответствии с МУ 3.1.1098-02 [202], при исследовании на чуму рекомендован питательный агар с содержанием аминного азота 60-120 мг%. Такие среды требуют стимуляторов, без которых удовлетворительный рост отмечается только при аминном азоте 150 мг% [344]. В качестве основ сред для чумного микроба, отечественные микробиологи считают приемлемыми препараты из печени [299], кровяных сгустков [306], аутолизата селезёнки [320], мясо-костного фарша тушек пушных зверей и молочной сыворотки [220]. Перспективны гидролизаты рыбы и отходов рыбной промышленности [95].

1.4.2.2 Использование гидролизатов белков животного происхождения для выращивания холерного вибриона

Способность холерных вибрионов разлагать желатину, белок свёрнутой лошадиной сыворотки, молока, мяса издавна использовали в лабораторных работах по выращиванию холерных вибрионов [88, 313, 376]. Мясо-пептонные агаровые среды для диагностики холеры обычно содержат 50-60 мг% аминного азота [208]. В методических указаниях по лабораторной диагностике холеры [169] рецепты (прописи) питательных сред содержат информацию, что в качестве основы используют «пептоны», без конкретного указания, из чего они приготовлены. Общепринято считать, что требования к питательной среде должны быть дифференцированы в отношении количества аминного азота ее основы в зависимости от целей использования среды [127,

179, 267, 434]. Создаётся впечатление, что для удовлетворения питательных потребностей холерных вибрионов происхождение белковой основы не столь важно.

1.4.3 Питательные среды на основе гидролизатов белков растительного происхождения

1.4.3.1 Общие положения

Растительные питательные основы среди прочих сохраняют своё место в медицинской микробиологии на протяжении столетия [68]. Специалисты [140], считают, что белки самых разнообразных растений и водорослей [57, 73] могут найти применение в качестве источника ценных пищевых добавок и быть использованы в качестве основ питательных сред [37, 79, 232]. Применяют «картофельный агар», картофельную муку [193], картофельный гидролизат [161]. В последние годы для культивирования возбудителей особо опасных инфекций активно внедряются ферментативные гидролизаты моркови, свёклы, капусты [71, 162]. Были попытки применения в качестве питательных основ ржаной муки, грибов [37], солода ячменя [71], кукурузного экстракта [125]. Позже [208] в качестве заменителя пептонной воды был предложен кукурузный бульон. Однако исследователи пришли к выводу, что препараты из кукурузы следует использовать лишь в качестве добавок, в частности, к средам из белково-витаминного концентрата и казеинового гидролизата [133, 134]. Изучали среды на основе гидролизата пшеничных отрубей [131]. Шрот содержал 12-14% белка, 57% которого в результате обработки серной кислотой превращали в аминокислоты (18,9%) и пептиды (38%). Была показана роль пептидов разной молекулярной массы в жизнедеятельности микробов. Ещё одна из предлагаемых основ – фосфорнокислотный гидролизат шрота подсолнечника [230]. Белок подсолнечника (мировое производство его шрота превышает 10 млн. тонн в год) по питательной ценности не уступает белку сои. Перспективными являются семена сои, гороха, чечевицы, боба, фасоли, земляного ореха, нута

[42, 92, 145, 273, 274, 281, 289]. Введение в питательную среду экстракта семян льна [79] или панкреатического гидролизата шрота хлопка [245] повышает ростовые свойства бактерий. Есть ещё одна причина, заставляющая использовать основы из растительных белков в производстве вакцинных препаратов. Поиск растительных заменителей диктует реальная опасность инфицирования прионами препаратов, полученных из продуктов животного происхождения. В нашей стране имеются триптические гидролизаты рисовой и соевой муки, исключая подобный риск [309].

1.4.3.2 Использование гидролизатов белков растительного происхождения для выращивания чумного микроба

Питательные среды для возбудителя чумы с растительными основами давно привлекают внимание исследователей [307]. Испытание ферментативных переваров бобов показало, что гидролизаты, содержащие 100-150 мг% аминного азота, могут быть использованы в качестве основ сред для чумного микроба. Позже для выращивания чумного микроба препараты из сои предлагали вместо мясной и казеиновой питательных основ [136], однако пришли к выводу, что такие среды необходимо «обогащать». Отмечено, что частичная замена в среде мясного компонента на соевый или дрожжевой экстракт улучшает биологические показатели бактериальной массы, и, вместе с тем, удешевляет производство [282]. Питательные среды для чумного микроба, содержащие ферментативные гидролизаты соевых бобов, имели преимущества перед кислотным и щелочным гидролизатом сои и ферментативным гидролизатом соевого молока. Максимальный выход бактериальной массы с 3%-ной агаровой среды составлял 60-64 млрд. микробных клеток чумного микроба с 1 мл. Для выращивания чумного микроба были предприняты попытки применения кукурузного экстракта [125, 133]. Интенсивность размножения чумного микроба в жидкой «кукурузной» среде, по мнению авторов, не уступала росту в бульоне Хоттингера, что подтвердила независимая группа учёных [188]. Однако,

«кукурузные» среды не нашли широкого распространения в производстве противочумных препаратов из-за низкого показателя аминного азота, в связи с чем в процессе производства чумной вакцины ЕВ предлагается использовать кукурузно-казеиновую среду [82]. Имеется экспериментальный материал [336, 337], в котором для выращивания чумного микроба в качестве питательного сырья использовали гидролизаты белков пшеничных отрубей и шрота подсолнечника из отрубей.

1.4.3.3 Использование гидролизатов белков растительного происхождения для выращивания холерного вибриона

При исследованиях на наличие холерного вибриона в качестве заменителя пептонной воды был предложен кукурузный бульон [132, 208]. В последнее время [162] разработана методика приготовления питательных сред для вибрионов с основами из ферментативных гидролизатов соевых бобов, картофеля, мелассы свекловичной. Штаммы возбудителя холеры при длительном хранении на соевых питательных средах стабильно сохраняют свои культурально-морфологические свойства в течение 12 месяцев (срок наблюдения). Фосфорнокислотный гидролизат шрота подсолнечника предлагается в качестве основы среды для изучения антигенов холерного вибриона [259]. АПК – аминокислотно-пептидный концентрат имеет особенность: он стимулирует накопление в среде продуктов экскреции холерного вибриона [182, 259, 260]. Судя по литературным источникам, ещё не решены многие вопросы о способах получения растительных белковых основ, пригодных для изготовления питательных сред. В связи с этим их, как правило, используют в комбинации с препаратами животного происхождения.

1.4.4 Использование различных препаратов из микроорганизмов в качестве основ для питательных сред

1.4.4.1 Общие положения

Можно утверждать, что клетки микроорганизмов содержат те же химические вещества, которые имеются в остальном органическом мире. Научная литература содержит многочисленные сведения об использовании их в качестве пищевого сырья многоцелевого назначения [35, 143, 196, 223, 224]. Определяющими моментами целесообразности этого являются: высокая скорость размножения, способность утилизировать разнообразные соединения, малая трудоёмкость производства, возможность направленного культивирования микробов. Бактериальная масса содержит азотосодержащие вещества – аминокислоты, амины, амиды, протеины, которые являются основными структурными элементами; в цитоплазме находятся белки-ферменты [146]. Обращает на себя внимание большое содержание белка в некоторых бактериях (% белка в сухой биомассе): *Streptococcus aureus* - 75,5; *Escherichia coli* - 82,0; *Bacillus subtilis* - 63,0; *Pseudomonas aeruginosa* - 67,8 [189]. Экстракты бактериальной массы в составе питательных сред нередко оказывает стимулирующее влияние на размножение других видов [94].

В изготовлении питательных сред роль белковой составляющей трудно переоценить. Ферменты бактерий имеют такую же химическую и физическую структуру, как и субстраты, на которые они действуют. Превращения естественных продуктов окружающей среды происходят с таким «расчётом», чтобы максимально уменьшить энергетические затраты для нового строительства, поэтому протеолитические ферменты представляют особый интерес [505]. Конец прошлого столетия известен широкой разработкой стратегии продовольственной и энергетической проблемы с использованием микроскопических грибов [220, 240, 499]. Мировое научное сообщество начало рассматривать дрожжи в качестве «естественных концентратов белков» [189]. Крупным шагом на пути развития нового направления в микробиологической промышленности

явились работы по изучению производства кормовых (углеводородных) дрожжей и применению в хозяйственной деятельности белково-витаминного концентрата (БВК) [240]. Дрожжи содержат около 5000 органических соединений, в том числе примерно 3000 белков [130]. Для получения кормовых дрожжей используют микроорганизмы рода *Torulopsis*, *Phodotorula*, *Truhoosporon*, *Candida* [220]. Наиболее активные расы дрожжей, усваивающих углеводороды, являются представителями рода *Candida*. Технология приготовления БВК предусматривает плазмолиз и обеспечивает расщепление значительной части белков. По нашим данным, впервые изготовление бактериологических питательных сред из гидролизатов БВК предпринял в 1967 г. Е.Г.Борисенко [37]. Первым из отечественных препаратов микробиологического назначения, который было признано целесообразным производить, явился сухой биогенный стимулятор ЭКД (экстракт кормовых дрожжей) [297]. Препарат получали путём экстракции дрожжей рода *Candida* [127] и использовали как стимулятор роста или как белковую основу питательных сред, а также – в вакцино-сывороточном производстве [105]. Экстракт БВК в качестве основы питательных сред для выращивания возбудителей особо опасных инфекций изготавливали по иной схеме [16]. Для жидкой питательной среды готовили водный экстракт: в подогретую до 30-40°C дистиллированную воду вносили сухие кормовые дрожжи (1-5%), перемешивали, кипятили 15 минут при pH 5,0-5,5, фильтровали, подщелачивали до pH 8,5-9,0, автоклавировали при 115°C в течение 20 минут. Дополнительные процедуры предпринимали для избавления от фосфолипидов и полисахаридов. Очищенный экстракт содержал 7-13% (к сухому весу) общего азота, который на 20% представляли аминокислоты, 8-11% - нуклеиновых кислот, 20% углеводов. В препарате не обнаружен триптофан, снижено содержание метионина и цистеина [198, 199]. По мере очистки экстракта уменьшается количество пептонов, увеличивается – аминокислот.

В многочисленных работах [29, 182, 283] представлены различные способы изготовления гидролизатов микроорганизмов, в том числе - гидролиз кормовых дрожжей ортофосфорной кислотой [40]. В условиях кислотного гидролиза сырья имеет значение то, что белки мембран имеют своеобразные кислотно-основные свойства и, кроме разнообразных пептидов, в гидролизате появляются не идентифицированные продукты. Длинные полипептидные цепи необходимо расщепить на более короткие пептиды таким образом, чтобы расщепление происходило в каждой точке пептидной связи. Для этой цели наилучшим методом является ферментативный гидролиз с применением протеолитического фермента трипсина, который выделяется в тонкий кишечник из поджелудочной железы в виде трипсиногена (предшественника трипсина). Этот фермент катализирует гидролиз только тех пептидных связей, карбонильная группа которых принадлежит остатку лизина или аргинина (независимо от длины полипептидной цепи) [164]. Преследуя цель получить белковые основы для разных микроорганизмов, помимо кислотного гидролиза кормовых дрожжей, разрабатывали технологии ферментативного переваривания. В частности, сообщалось [145] об изготовлении путём панкреатического гидролиза БВК белковой основы сред, пригодных для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций. Исследователи пришли к заключению, что полученный ими дрожжевой ферментализат следует совмещать с кислотным гидролизатом казеина. Другая научная группа сравнивала влияние на ростовые свойства триптических гидролизатов кормовых дрожжей и казеина. На основании проделанной работы сделано заключение, что высокое содержание аминного азота в среде и характер гидролиза по-разному влияют на выращивание микроорганизмов. Высказано мнение [300], что оптимизацию питательных основ следует проводить путём усложнения состава. В отличие от ЭДОС (экстракт дрожжевой очищенный сухой), гидролизат [40] представлен преимущественно пептидами с высокой молекулярной массой: примерно

36% биуретовых продуктов против 18% экстракта. И наоборот: сумма свободных аминокислот гидролизата составляет лишь 5%, тогда как в экстракте их 29% [302]. Препараты были объединены в составе новой питательной основы – пептона «Д», содержащего (в % сухого веса) 8% общего азота, 3% аминного азота, 30% биуретовых продуктов, около 10% аминокислот. В экспериментальных исследованиях пептон «Д» проявил эффективность в составе питательных сред при выращивании возбудителей кишечных и особо опасных инфекций. Позже производство БВК резко сократилось вследствие гигиенических и экологических проблем, но до настоящего времени продолжается изготовление различных дрожжевых препаратов для бактериологии. Экстракт кормовых дрожжей используется в приготовлении сред для сальмонелл [42, 187, 224] и туберкулёзной палочки [188]. Хорошо зарекомендовала себя среда СЭДХ в первичном не модифицированном варианте [268].

1.4.4.2 Белковые основы питательных сред из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Особое внимание уделяется дрожжам рода *Saccharomyces*, которые, помимо высокого содержания белка в клетке, имеют тонкую регуляцию биохимических процессов факторами окружающей среды [95, 131, 499, 500, 501]. По этой причине дрожжи являются модельной системой для изучения ферментов эндоплазматической сети, в том числе, человека [502]. Дрожжи *Saccharomyces spp.*, как специально выращенные, так и побочные продукты основного производства (пива, кваса и др.) - экономически выгодное, легко воспроизводимое, доступное, экологически безопасное сырьё. В конце прошлого века их мировое производство достигло 2 млрд. тонн [144]. Различные виды дрожжей отличаются особенностями физиологии, что предоставляет возможность выбора их для целевого использования [223]. Некоторые дрожжевые препараты применяют для культивирования одноклеточных организмов, как более «питательные», чем гидролизаты

казеина [20]. Дрожжи содержат примерно 50% белка и 30% безазотистых экстрактивных веществ [91, 220]. Большая доля протеина находится в митохондриях; на белок клеточной стенки приходится от 6-15% до 27-30% сухой биомассы дрожжей, а её основные аминокислоты в составе *Saccharomyces cerevisiae* – аспарагиновая и глутаминовая, серин и треонин. Оболочка в наружном слое имеет липопротеиновую мембрану (клеточная стенка содержит иногда 90% полисахарида), средний слой - маннаны с белками (обработка клеточной стенки дрожжей папаином приводит к выделению маннано-белкового комплекса), а третий - на 94% представлен глюкозой (10% - глюкозамин в виде хитина) [95, 130]. В процедуре выделения белка из дрожжевых клеток разрушение оболочки представляет сложность. Лизаты дрожжей часто служат стимуляторами роста в виде «витаминной добавки» к основе бактериологической среды. Они известны как активаторы биологических процессов со свойствами коферментов, их включают в реакции обмена в тех случаях, когда он затруднён [195]. Содержание витаминов группы В у микроскопических грибов таково (мкг/г сухого веса): рибофлавин – 45 (*Torula*), 36-42 (*Saccharomyces*); пиридоксин - 33,4 (*Torula*), 25-100 (*Saccharomyces*); тиамин - 5,5 (*Torula*), 50-360 (*Saccharomyces*); биотин - 2,3 (*Torula*), 5-18 (*Saccharomyces*) [189]. В руководстве [193] состав 76 сред имеет 43 прописи, содержащие дрожжевые препараты. Современные питательные среды содержат дрожжевые экстракты, аутолизаты и состоящие более чем на три четверти из белковых компонентов гидролизаты [183, 224, 503]. Особенности препаратов зависят от расы дрожжей (есть метаболические различия между пекарскими, пивными и винными дрожжами), условий культивирования, способа обработки сырья, методов контроля. В настоящее время вопросы стандартизации, в том числе, выполнение стандартов ГОСТ Р ИСО и система менеджмента лабораторной практики подвергаются пересмотру как на международном, так и национальном уровне [506, 507]. Это имеет непосредственное отношение к пептонам, поскольку пептонный бульон

является белковой основой большинства сред [128, 246]. С позиции технологии производства пептоны - это продукты переработки протеинов разного происхождения, представляющие собой смесь пептидов, образованных в результате более мягкого способа изготовления питательных основ, чем кислотный гидролиз [212]. Действие ферментов приводит к неполному распаду белковых молекул, но в пептонах содержатся как полимеры, так и аминокислоты. При длительном процессе образуется более 50% аминокислот, избыток солей, разрушается триптофан, содержание цистина снижается до следовых количеств, происходит карамелизация. Переваривание осуществляют пепсином, трипсином, папаином, нередко – панкреатином поджелудочной железы. Экзоферменты микробного происхождения осуществляют гидролиз в основном по гидрофобным связям ароматических соединений, образуя избыток крупных молекул [195, 503]. Найдены различия при сравнении протеолитической активности коммерческого препарата трипсина и протеазы протеовибрина [146]. Основной химической характеристикой пептона признаётся количество органических азотистых веществ, но некоторые исследователи считают не менее важными показателями: соотношение полипептидов разной молекулярной массы, наличие пептидов с молекулярной массой ниже 1250 D, количество свободных аминокислот не более 15% [118, 503]. Для изготовления основ питательных сред предпочтение отдают панкреатическому перевару, особенности которого хорошо изучены [518, 195]. Трипсином быстро расщепляются пептидные связи, если они принадлежат карбонильной группе одной из основных аминокислот - лизину или аргинину. Представленные в руководстве фирмы Merck, основавшей производство этой питательной основы [496], пептоны отличаются по химическим характеристикам, количеству общего и аминного азота, хотя соотношение этих показателей примерно 25: 1. Все они содержат «коагулабельный» белок, чем отличаются от выпускаемого той же фирмой дрожжевого экстракта. Можно присоединиться к мнению, согласно которому

«пептон – химически неопределённый термин, используемый для обозначения водорастворимых продуктов, получаемых после гидролиза протеинов» [140]. Пептоны в виде разнообразных белковых гидролизатов изготавливают все ведущие зарубежные фирмы и отечественные производители питательных сред. Традиционным видом сырья является мясо и казеин, некоторые сырьевые продукты - с «географическим уклоном» (рыба, креветки), иные производства связаны с предприятиями, где имеются дешёвые полуфабрикаты. Многие бактериальные виды (и, пожалуй, все патогенные микроорганизмы) не способны развиваться без белковых гидролизатов, и в питательных средах это возмещается мясными и казеиновым пептонами [187, 212, 519]. Панкреатические перевары пекарских дрожжей содержат вещества, образующиеся естественно в организме животных (человека) и составляющие основу питания патогенных бактерий. Выпускают пептоны, предназначенные для культивирования дрожжей и плесневых грибов, получения столбнячного токсина, производства вакцин, использования в биотехнологии. Существует питательная основа для выращивания нескольких групп микроорганизмов - Universal peptone M 66 – смесь казеинового, мясного и соевого пептонов [496]. Подобный подход к производству микробиологических сред послужил мотивом исследований авторов, предложивших пять различных питательных основ (в том числе дрожжевой) для изучения чумного микроба [118, 302]. При изготовлении питательных основ из микробного сырья приходится считаться с тем, что такой сырьевой источник обладает ауторегуляцией автолитических процессов. В дрожжевой клетке в конце цикла роста в течение 4-6 часов происходит интенсивная деструкция под воздействием клеточных гидролаз [514]. Эндопептидазы рвут пептидные цепи по внутренним связям и образуется своеобразный набор свободных аминокислот [503]. Высокий уровень метаболизма хлебопекарных дрожжей способствует быстрому «обороту» синтеза белка и клеточному делению. Сокращается время жизни клетки, в популяции увеличивается количество

мёртвых микроорганизмов. Вместе с тем, «сопротивление» стрессовым условиям осуществляется вследствие высокого уровня пластичности белков *S.cerevisiae* [374]. Происходят связанные между собой сложные процессы: аутофагия – деградация внутриклеточного белка, аутолиз и выход за пределы клетки белковых продуктов [515]. Аутолизат дрожжей – продукт экстракции клеток, извлечения большинства содержащихся в них биологически активных веществ [91, 262], которые, присутствуя в среде, вызывают активную жизнедеятельность бактерий [30]. Аутолизаты и экстракты дрожжей давно заняли видное место в изготовлении питательных сред [523, 524]. Недостаток аутолизатов - наличие неферментированных продуктов [32], малое содержание аминного азота и отсутствие триптофана [128]. Сравнение разных способов изготовления аутолизатов пекарских дрожжей показало следующее [514]. Деструкция под влиянием клеточных гидролаз заканчивается через 4-6 часов. В производстве аутолизатов хлебопекарных дрожжей, предназначенных, в частности, для изготовления питательных сред, этот период изменяют разнообразными способами: физическим воздействием, прогреванием бактериальной массы, добавлением к взвеси хлорида натрия, ненасыщенных жирных кислот, чужеродных гидролитических ферментов [90, 215, 276, 516, 523]. Классический способ получения аутолизата пекарских дрожжей при воздействии внутриклеточных протеаз – прогревание суспензии клеток при 60° в течение 2 суток [522, 524]. Такой аутолизат дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой препарат 45-55%-ного расщепления белка, содержащий 250-300 мг% общего азота и 75-150 мг% – аминного [246]. Получаемые продукты гидролиза имеют характер смесей органических веществ и требуются дополнительные манипуляции (осветление, очистка), чтобы выделить наиболее важный компонент. Одним из таких приёмов является экстракция. Результаты зависят от средства экстрагирующего вещества каждому из химических компонентов гетерогенной смеси, условий проведения экстракции (Т°, рН, центрифугирование, фильтрация), методов контроля извлекаемых продуктов

[521]. Экстракты широко используют как источник витаминов и аминокислот в изготовлении питательных сред для прихотливых бактерий [42]. По некоторым данным [193], активным ростовым компонентом дрожжевого экстракта является один или несколько пептидов с молекулярной массой 1000 D. Помимо этого, для «обогащения белковых основ» имеют применение дрожжевые диализаты [36, 309], если они содержат витамины группы B и незаменимые аминокислоты [299].

1.4.4.3 Использование препаратов из биомассы микроорганизмов для выращивания чумного микроба

В отечественной научной литературе впервые была показана возможность применения гидролизата из микробной массы штамма EV в качестве основы питательной среды для диагностики чумного микроба [136]. Некоторые исследователи [303, 304, 404], пытались оптимизировать условия культивирования чумного микроба с помощью дрожжевых препаратов. Очищенный водный экстракт кормовых углеводородокисляющих дрожжей использовали в качестве основного источника белкового питания и добивались высокой скорости роста и хорошего выхода бактериальной массы [304]. Изучение роста чумного микроба на плотных средах [266, 267] показало, что при наличии в них водного экстракта кормовых дрожжей в концентрации 50 мг% аминного азота росли культуры из различных очагов. На физиологическое состояние штамма EV чумного микроба, выращиваемого на подобной среде, не влияли добавки метионина и цистина [308]. Среда на основе сухого аутолизата дрожжей применялась для выращивания чумного микроба при содержании аминного азота всего 25-30 мг% (правда, в неё добавляли метабисульфит натрия) [6, 90]. Однако, в результате изучения влияния дрожжевых сред на рост и синтез капсульного антигена возбудителя чумы авторы пришли к выводу, что в них имеется недостаток цистеина, метионина, лейцина, изолейцина, треонина, аргинина [302] и для получения максимального эффекта следует применять

стимуляторы [47, 152, 285, 294, 295, 304]. Предложения другой направленности – использовать препараты дрожжей, в частности, отходы хлебопекарного производства, только в качестве стимуляторов [142]. Особый интерес представляет применение экстракта кормовых дрожжей (ЭКД) для культивирования L- форм чумного микроба [27].

1.4.4.4 Использование препаратов из биомассы микроорганизмов для выращивания холерного вибриона

Препараты микробного происхождения - аутолизаты и экстракты дрожжей первоначально использовали в качестве стимулирующих добавок для улучшения роста холерных вибрионов. В начале седьмой пандемии холеры для выделения холерных вибрионов была предложена среда TCBS (тиосульфат-цитрат-жёлчь-сахарозная) [347]. Эта стандартная среда фирмы «Фикен» (Токио, Япония) в качестве основы имела 1% пептона и 0,5% дрожжевого экстракта [71]. Другим примером совместного употребления дрожжевого экстракта (0,5%) и триптона (1,0%) является среда LB, на которой нередко выращивают холерные вибрионы при выполнении экспериментальной работы [434, 373]. Японские исследователи [360] разработали рецептуру пептонной среды с добавкой дрожжевого экстракта, обеспечивающей высокую продукцию токсина вибрионами Эль Тор. Помимо этих, оптимизация сред для холерного вибриона за счёт дополнения мясо-пептонной основы экстрактом дрожжей допускается и в других случаях [158].

Положительные результаты по изготовлению «дрожжевой» питательной среды для холерного вибриона были получены путём использования принципа смешивания сухих кормовых углеводородных дрожжей с натрием хлористым и натрием углекислым [191, 197]. Затем для этих целей стали использовать экстракт кормовых дрожжей [116]. При микробиологических исследованиях на средах, содержащих менее 75 мг% аминного азота белковой основы ЭДОС, были получены позитивные

результаты в отношении холерных вибрионов. Авторы показали последовательность утилизации аминокислот при выращивании холерных вибрионов в среде из этого экстракта. Исчезновение некоторых аминокислот из среды приводило к снижению скорости роста или уровня конечной продукции, что соответствует положению: смена аминокислотного состава среды выращивания меняет синтетические процессы в микробной клетке. При культивировании в полупроизводственных условиях на среде из очищенного дрожжевого экстракта исследователи [170] получали холерный токсин при низком содержании аминного азота (20 мг%). Эту особенность дрожжевых сред позже подтвердили другие исследователи [1]. Они использовали среду из аутолизата пекарских дрожжей (30 мг%) для выращивания вибрионов и производства холерного токсина методом глубинного культивирования. В экспериментальных исследованиях в составе питательных сред при выращивании возбудителя холеры и других особо опасных инфекций проявил эффективность пептон «Д» [239]. Здесь уместно сказать, что использование одного препарата в качестве питательной основы нескольких сред, в том числе предназначенных для выращивания *Yersinia pestis* и *Vibrio cholerae*, особенно важно для достижения практических целей - работы в условиях чрезвычайных ситуаций при неясных источниках контаминации. Монооснова, изготовленная из гидролизата пекарских дрожжей, на наш взгляд, может решить проблему создания единой базовой коммерческой агаровой среды для выявления возбудителей чумы и холеры.

1.4.4.5 Перспективы использования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве сырья для приготовления основ микробиологических питательных сред

В заключение обзора литературы следует сказать о перспективах развития обозначенного в нём научного направления. Практика

бактериологических исследований позволяет утверждать, что трудности выращивания микроорганизмов во многом связаны с особенностями предшествующего роста и размножения микроорганизмов. Для гетеротрофных бактерий, в особенности, облигатных паразитов, источниками питания в естественных условиях являются азотсодержащие продукты, поэтому общепринятые питательные основы микробиологических сред – препараты из мяса и казеина. В практической работе микробиолога всегда имеются базовые среды, изготавливаемые на основе пептонов. Качество этих белковых гидролизатов зависит от специфичности ферментов и структуры белка сырья. Эти параметры определяют пептидный состав будущей питательной основы и, в конечном результате, биологические показатели среды выращивания. Конструирование питательных сред предполагает дополнительное введение в питательные среды специальных компонентов с учётом цели исследования, особенностей роста и цикла развития микробной популяции [20, 146, 147, 375, 376, 380, 520].

Представленные материалы исследований свидетельствуют о перспективности использования пекарских дрожжей в качестве сырья для изготовления белковых питательных основ (пептонов). Словарь медицинских терминов [517] имеет следующее определение: «Бактопептоны – продукты неполного ферментативного гидролиза богатых белком субстратов, используемые в бактериологических исследованиях в качестве основного источника азота». В настоящее время для получения аутолизатов и экстрактов хлебопекарных дрожжей используют штаммы (расы), содержащие более 60% белка, и разработаны специальные модели биотрансформации дрожжевого сырья [514]. Наиболее эффективному использованию физиологических особенностей пекарских дрожжей способствует современное состояние биотехнологии, а именно – прикладной генетики, метаболической и клеточной инженерии. Адаптационные возможности *Saccharomyces cerevisiae* рассматриваются с позиции эволюционной инженерии и молекулярных особенностей вновь получаемого

фенотипа [516]. Метаболический инженерный путь у *Saccharomyces cerevisiae* позволяет не только увеличить продукцию метаболитов, присущих данному виду, но и модифицировать их в дрожжах с помощью разных генетических способов [392, 512]. Важной составляющей модернизации технологии производства *Saccharomyces cerevisiae* является повышение синтеза протеинов с помощью изменения питания, регуляции кинетики или путей ферментации [53]. Компании, вырабатывающие пекарские дрожжи, выращивают клетки при условиях дыхания, что обеспечивает высокий уровень роста. Однако, дыхательные процессы не всегда совместимы с высоким уровнем ферментации, в особенности у модифицированных штаммов. В этих случаях меняется стратегия адаптации, требуется применение новых приёмов культивирования, в частности, репрессия генов оксидативного метаболизма.

С высокой долей достоверности можно утверждать, что в ближайшее время биотехнология займёт ведущую позицию в производстве микробиологических питательных сред, а панкреатический гидролизат хлебопекарных дрожжей - среди белковых продуктов со свойствами пептонов.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы микроорганизмов

В настоящем исследовании были использованы 50 штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп, в том числе, три тест-штамма для контроля питательных сред по биологическим показателям (Таблица 1);

Таблица 1
Штаммы холерного вибриона из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, использованные при выполнении настоящей работы

№ п/п	Наименование штамма	Биовар	Серогруппа	Источник выделения
1	2	3	4	5
1	<i>V.cholerae classical P-1 (145)</i> (тест-штамм)	Инаба	O1	Не известен
2	<i>V.cholerae classical 569B</i>	Инаба	O1	Не известен
3	<i>V.cholerae classical P-2/60</i>	Огава	O1	Не известен
4	<i>V.cholerae El Tor 1310</i>	Огава	O1	Не известен
5	<i>V.cholerae El Tor M-878</i> (тест-штамм)	Инаба	O1	Не известен
6	<i>V.cholerae El Tor P-10058</i>	Инаба	RO	Человек
7	<i>V.cholerae El Tor P-14863</i>	Огава	O1	Вода
8	<i>V.cholerae El Tor P-14864</i>	Огава	O1	Вода
9	<i>V.cholerae El Tor P-15301</i>	Огава	O1	Вода
10	<i>V.cholerae El Tor P-18302</i>	Огава	O1	Вода
11	<i>V.cholerae El Tor P-18367</i>	Огава	O1	Вода
12	<i>V.cholerae El Tor P-18369</i>	Огава	O1	Вода
13	<i>V.cholerae El Tor P-18588</i>	Огава	O1	Вода
14	<i>V.cholerae El Tor P-18729</i>	Огава	O1	Вода
15	<i>V.cholerae El Tor P-18730</i>	Огава	O1	Вода
16	<i>V.cholerae El Tor P-18774</i>	Огава	O1	Вода
17	<i>V.cholerae El Tor P-18776</i>	Огава	O1	Вода
18	<i>V.cholerae El Tor P-18777</i>	Огава	O1	Вода
19	<i>V.cholerae El Tor P-18779</i>	Инаба	O1	Вода
20	<i>V.cholerae El Tor P-18897</i>	Инаба	O1	Вода
21	<i>V.cholerae El Tor P-18898</i>	Инаба	O1	Вода
22	<i>V.cholerae El Tor P-18901</i>	Инаба	O1	Вода

Таблица 1 (окончание)

23	<i>V.cholerae El Tor P-18902</i>	Инаба	O1	Вода
24	<i>V.cholerae El Tor P-18903</i>	Инаба	O1	Вода
25	<i>V.cholerae El Tor P-18963</i>	Огава	O1	Стоки
26	<i>V.cholerae El Tor P-18969</i>	Огава	O1	Вода
27	<i>V.cholerae El Tor P-18970</i>	Огава	O1	Вода
28	<i>V.cholerae El Tor P-18974</i>	Инаба	O1	Стоки
29	<i>V.cholerae El Tor P-18975</i>	Огава	O1	Вода
30	<i>V.cholerae El Tor P-18976</i>	Инаба	O1	Вода
31	<i>V.cholerae El Tor P-19051</i>	Гико- шима	O1	Вода
32	<i>V.cholerae El Tor P-19052</i>	Огава	O1	Вода
33	<i>V.cholerae El Tor P-19053</i>	Огава	O1	Вода
34	<i>V.cholerae El Tor P-19054</i>	Огава	O1	Вода
35	<i>V.cholerae El Tor P-19055</i>	Огава	O1	Вода
36	<i>V.cholerae El Tor P-19056</i>	Огава	O1	Вода
37	<i>V.cholerae O139 MO45</i>		O139	Вода
38	<i>V.cholerae O139 P-16063</i>		O139	Человек
39	<i>V.cholerae O139 P-16064</i>		O139	Человек
40	<i>V.cholerae O139 P-16065</i>		O139	Человек
41	<i>V.cholerae O139 AP1</i>		O139	Не известен
42	<i>V.cholerae O139 P-16131</i>		O139	Не известен
43	<i>V.cholerae O139 88</i>		O139	Вода
44	<i>V.cholerae O139 PO-2</i>		O139	Не известен
45	<i>V.cholerae O139 PO-7</i>		O139	Не известен
46	<i>V.cholerae non O1/ non O139 P-9741(тест-штамм)</i>			Вода
47	<i>V.cholerae non O1/ non O139 P-16003</i>		O65	Вода
48	<i>V.cholerae non O1/ non O139 P-16005</i>		O68	Вода
49	<i>V.cholerae non O1/ non O139 P-11972</i>		O63	Вода
50	<i>V.cholerae non O1/ non O139 P-12691</i>		O64	Вода

11 штаммов чумного микроба, отличающихся по вирулентности и месту выделения, в том числе, три тест-штамма для контроля питательных сред (Таблица 2) из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Таблица 2

**Штаммы чумного микроба из коллекции музея живых культур ФКУЗ
Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
использованные при выполнении настоящей работы**

№ п/п	Наименование штамма	Вирулентность	Место выделения
1	<i>Y. pestis</i> EV 1290 (вакцинный, тест-штамм)	-	Мадагаскар
2	<i>Y. pestis</i> 1 (вакцинный)	-	Туркмения
3	<i>Y. pestis</i> 17 (вакцинный)	-	Россия, г.Чита
4	<i>Y. pestis</i> Otten (вакцинный)	-	Китай
5	<i>Y. pestis</i> P-1680 (тест-штамм)	авирулентный	Азербайджан, Закавказский горный очаг
6	<i>Y. pestis</i> И-2377 (тест-штамм)	авирулентный	Россия, Горно- Алтайская область
7	<i>Y. pestis</i> P-146	авирулентный	Россия, Астраханская область
8	<i>Y. pestis</i> 21КБ	слабовирулентный	Россия, Кабардино- Балкария
9	<i>Y. pestis</i> И-2442	вирулентный	Россия, Тува
10	<i>Y. pestis</i> 231	вирулентный	Киргизия
11	<i>Y. pestis</i> 753	вирулентный	Туркмения

Для оценки дифференцирующих свойств разработанных и контрольных питательных сред были использованы также штаммы других микроорганизмов: *Shigella flexneri* 1 «А»8516, *Proteus vulgaris* 14, *Aeromonas hydrophila* 6020-P, *Pseudomonas aeruginosa* P-5810, *Escherichia coli* 1015 из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

2.2 Питательные среды

2.2.1 Сконструированные питательные среды

В ходе выполнения настоящей работы были сконструированы на основе ПППД и исследованы следующие питательные среды.

2.2.1.1 Агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД – 0,08% по аминному азоту;
- натрий хлористый – 3,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 5,0 г;
- агар микробиологический – 14,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

рН готовой среды – $7,2 \pm 0,1$.

2.2.1.2 Агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования чумного микроба при 37°C

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД – 0,13 % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- магний сернокислый 7-водный – 0,6 г;
- железо (II) сернокислое 7-водное – 0,01 г;
- натрий сернистокислый безводный – 0,6 г;
- кальций хлористый 6-водный – 0,3 г;
- D-маннит – 1,0 г;
- агар микробиологический – 13,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л; рН среды – $7,1 \pm 0,1$.

2.2.1.3 Щелочной агар – агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения холерного вибриона

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД – 0,05 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 4,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 6,0 г;
- агар-агар микробиологический – 12,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

2.2.1.4 Жидкая накопительная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения холерного вибриона

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД – 0,2 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 50,0 г;
- калий азотнокислый – 1,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 5,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л (в концентрированном варианте), до 10,0 л (в разведенном варианте);

pH готовой среды – $8,2 \pm 0,2$.

2.2.1.5 Бульон для культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД – из расчёта ($0,07 \pm 0,005$) % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-ти водный – 6,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;

- рН среды $7,8 \pm 0,2$.

2.2.1.6 Питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД – 0,013 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 5,0 г;
- калий фосфорнокислый двузамещённый 3-водный – 0,4 г;
- Д-глюкоза кристаллическая – 10,0 г;
- бромтимоловый синий водорастворимый – 0,03 г (или его 1 % водный раствор – 3 мл);
- агар-агар бактериологический – 3,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

рН готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

2.2.1.7 Питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД из расчёта ($0,013 \pm 0,001$) % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- глюкоза – 1,0 г;
- L-аминокислота – 10 г (варианты с аргинином, лизином, орнитином и контрольный вариант – без аминокислоты);
- бромкрезоловый пурпурный (1,6% спиртовой р-р) – 0,6 мл;
- крезоловый красный (0,1% спиртовой р-р) – 5,0 мл;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;
- рН среды – $6,45 \pm 0,1$.

2.2.1.8 Глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний

Данная среда имеет следующий состав (на 1,0 л):

- ПППД – 0,065 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 5,0 г;
- D – глюкоза кристаллическая – 1,0 г;
- Альфа – D - лактоза кристаллическая – 10 г;
- натрий сернистокислый безводный – 0,4 г;
- натрий серноватистокислый 5 – водный – 0,16 г;
- железо (II) сернокислое 7 – водное - 0,5 г;
- феноловый красный (0,2 % раствор в 50 % этиловом спирте) – 12 мл;
- агар-агар бактериологический – 11,5 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,1$.

2.2.2 Контрольные питательные среды

В настоящей работе в качестве контрольных были использованы как коммерческие зарегистрированные в установленном порядке питательные среды, так и среды лабораторного изготовления (которым нет коммерческих аналогов), рекомендованные действующими практическими руководствами и методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры и чумы [169, 202].

2.2.2.1 Контрольные коммерческие питательные среды

- Агар щелочной сухой, производства ФГУП НПО «Микроген»;
- Пептон основной сухой, производства ФГУП НПО «Микроген»;
- Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий – среда Клиглера сухая, производства ФГУП НПО «Микроген»;

- Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий – среда Ресселя сухая, производства ФГУП НПО «Микроген»;

- Питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба ЧПС, производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», п. Оболенск Московской области.

2.2.2.2 Контрольные питательные среды лабораторного изготовления

- Бульон Мартена рН $7,8 \pm 0,2$ [278];
- Агар Мартена рН $7,8 \pm 0,2$ [278];
- Агар Хоттингера рН $7,2 \pm 0,2$ [278];
- Бульон Хоттингера рН $7,2 \pm 0,2$ [278];
- Среда АКІ [434];
- Среды Меллера с аминокислотами [467];
- Среды Гисса с углеводами и многоатомными спиртами [169];
- Среда Хью-Лейфсона [430];
- Бульон Кларка [169];
- Среда лактозо-сахарозная [5]

Изготовление питательных сред на основе экспериментальных гидролизатов проводили в соответствии с прописями, рекомендуемыми отечественными руководствами для чумного микроба [202] и холерного вибриона [169].

При изучении разработанной на основе ПППД агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C в качестве сред сравнения использовали предложенные в разные годы экспериментальные питательные среды аналогичного назначения: ЛХАТ, ДК-37, СО [18, 336], а также питательную среду из компонентов Veston Dickinson – LB. Ниже приведены составы указанных питательных сред (из расчета на 1,0 л):

Питательная среда ЛХАТ:

- сернокислотный гидролизат казеина с аминным азотом 0,16% - 0,75 л;
- основной раствор Хоттингера с аминным азотом 0,16% - 0,25 л;
- дрожжевой экстракт – 3,0 г;
- маннит – 0,6 г;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- магний сернокислый семиводный – 0,6 г;
- железо (II) сернокислое семиводное – 0,01 г;
- марганец сернокислый пятиводный – 0,002 г;
- кальций хлористый – 0,3 г;
- агар-агар бактериологический – 17,5 г;
- рН 7,1±0,1.

Питательная среда ДК-37:

- дрожжевой экстракт жидкий – 0,05% по аминному азоту;
- гидролизат казеина сухой – 12,5 г;
- натрий хлористый – 2,0 г;
- натрий сернистоокислый 0,5 Г;
- агар-агар бактериологический пластинчатый – 18,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;
- рН 7,1±0,1

Питательная среда СО:

- аутолизат селезенки – 0,125% по аминному азоту;
- гидролизат белка отрубей – 0,03% по аминному азоту;
- натрий хлористый – 2,0 г;
- натрий сернистоокислый – 0,5 г;
- агар-агар бактериологический пластинчатый -16,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;
- рН 7,0±0,1.

Питательная среда LB:

- бакто-триптон «Becton Dickinson» - 10,0 г;
- дрожжевой экстракт «Becton Dickinson» - 5,0 г;

- натрий хлористый – 10,0 г;
- агар-агар бактериологический «Becton Dickinson» - 20,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – 1,0 л;
- рН 7,2±0,1.

2.3 Белковые гидролизаты

В качестве препаратов сравнения для оценки ПППД как основы питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба были использованы следующие белковые гидролизаты.

2.3.1 Коммерческие белковые гидролизаты

- Пептон ферментативный (производитель - ООО НПО «Порт-Петровск», г. Курск);
- Гидролизат казеина солянокислый (ФГУП НПО «Микроген»);
- Гидролизат казеина панкреатический (ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г.Оболенск);
- Гидролизат каспийской кильки панкреатический – сухой питательный бульон (ФГУП НПО «Микроген»);
- Бакто-пептон («Becton Dickinson», США);
- Казаминовые кислоты – сернокислый гидролизат казеина высокой степени расщепления («Becton Dickinson», США);
- Бакто-триптон («Becton Dickinson», США).

2.3.2 Белковые гидролизаты лабораторного изготовления

- гидролизат мяса по Хоттингеру;
- пептон Мартена;
- сернокислотный гидролизат казеина;
- солянокислотный гидролизат казеина;
- панкреатический гидролизат казеина;
- аутолизат селезенки;

- гидролизат белка отрубей.

2.4 Дрожжи хлебопекарные прессованные

В процессе выполнения настоящей работы были использованы следующие марки дрожжей хлебопекарных прессованных (Таблица 3).

Таблица 3

Использованные в исследовании дрожжи хлебопекарные прессованные

№ п/п	Марка дрожжей	Производитель	ГОСТ или ТУ
1	«Особые»	ООО «Ростовский дрожжевой завод»	ТУ 9182-023-00371185-98
2	«Градус»	ООО «Ростовский дрожжевой завод»	ГОСТ 171-81
3	«Хлебное дерево»	ООО «Ростовский дрожжевой завод»	ГОСТ 171-81
4	«Экстра»	ООО «Воронежские дрожжи»	ТУ 9182-001-59559671-2003
5	Дрожжи хлебопекарные прессованные	ООО «Черкесский дрожжевой завод»	ГОСТ 171-81
6	Дрожжи хлебопекарные прессованные	«Санкт-Петербургский дрожжевой завод»	ТУ 9182-005-00353595-2001

2.5 Методы исследования

2.5.1 Физико-химические методы исследования

2.5.1.1 Метод определения р

Определение рН белковых гидролизатов и питательных сред осуществляли потенциометрическим методом, согласно МУК 4.2.2316-08, с помощью рН-метров «Mettler Toledo Seven Easy S20K», «Mettler Toledo Seven Easy S40K», «Mettler Toledo Seven Go».

2.5.1.2 Метод определения общего азота

Определение общего азота белковых гидролизатов и питательных сред осуществляли согласно МУК 4.2.2316-08. Принцип метода основан на

свойстве реактива Несслера давать цветную реакцию с ионами аммония, образующимися после минерализации азотсодержащих органических веществ. Реактив Несслера готовили в соответствии с рекомендациями А.М. Петрунькиной [246].

2.5.1.3 Метод определения аминного азота

Определение аминного азота белковых гидролизатов и питательных сред осуществляли методом формольного титрования согласно МУК 4.2.2316-08. Принцип метода основан на блокировании формальдегидом при рН 7,0 свободных аминогрупп и титровании щелочью эквивалентного количества карбоксильных групп.

2.5.1.4 Метод определения содержания хлоридов

Определение содержания хлоридов (в пересчете на натрия хлорид) белковых гидролизатов и питательных сред осуществляли аргентометрическим методом согласно МУК 4.2.2316-08. Метод основан на определении ионов хлора после окисления белков перманганатом калия в кислой среде в присутствии нитрата серебра, избыток которого оттитровывают раствором роданида аммония.

2.5.1.5 Метод определения содержания углеводов

Определение содержания углеводов в белковых гидролизатах и питательных средах осуществляли антроновым методом МУК 4.1/4.2588-96. Принцип метода основан на способности углеводов после дегидратации образовывать производные фурфурола, которые дают цветную реакцию с антроном. Антроновый реактив готовили в соответствии с рекомендациями А.М. Петрунькиной [246].

2.5.1.6 Метод определения прочности агарового студня по Валенту

Определение прочности агарового студня питательных сред проводили с помощью прибора Валента согласно МУК 4.2.2316-08. Принцип метода основан на определении массы нагрузки, необходимой для разрушения структуры столбика агара.

2.5.2 Микробиологические методы исследования

2.5.2.1 Подготовка тест-штаммов для определения биологических показателей питательных сред

Подготовку тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба с целью оценки опытных и контрольных питательных сред по биологическим показателям проводили согласно требованиям МУ 3.3.2.2124-06.

2.5.2.2 Подготовка других штаммов микроорганизмов

Подготовку взятых в исследование остальных (не тестовых) штаммов холерного вибриона, чумного микроба и других микроорганизмов осуществляли методом, аналогичным изложенному в МУ 3.3.2.2124-06 для тест-штаммов.

2.5.2.3 Определение биологических показателей питательных сред

2.5.2.3.1 Определение показателя чувствительности

Показатель чувствительности согласно требованиям МУК 4.2.2316-08 и МУ 3.3.2.2124-06 определяли как максимальное разведение культуры, обеспечивающее визуально обнаруживаемый рост колоний соответствующего штамма микроорганизма в течение определенного времени инкубации при определенной температуре на всех засеянных чашках (пробирках) с питательной средой.

2.5.2.3.2 Определение показателя скорости роста микроорганизмов на питательных средах

Показатель скорости роста микроорганизмов согласно требованиям МУК 4.2.2316-08 и МУ 3.3.2.2124-06 определяли по минимальному времени инкубации посевов, за которое при соответствующем разведении культуры обеспечивается отчетливый видимый невооруженным глазом рост штамма: помутнение, наличие пленки или осадка во всех засеянных пробирках с жидкой средой; формирование типичных колоний на всех засеянных чашках с агаризованной средой.

2.5.2.3.3 Определение показателя прорастания питательных сред

Показатель прорастания определяли для агаризованных питательных сред как отношение среднего числа выросших на чашке Петри колоний к числу посеянных микробных клеток (соответствующему разведению культуры 10^{-6}) штамма микроорганизма, выраженное в процентах. Не является эквивалентным аналогично названному показателю в МУ 4.2.2316-08.

2.5.2.3.4 Определение показателя числа колоний, выросших при посеве шестичасовых бульонных культур на агаровые пластинки

Показатель числа колоний, выросших при посеве шестичасовых бульонных культур на агаровые пластинки определяли для жидких питательных сред накопления и культивирования холерного вибриона как среднее число выросших на агаровых пластинках колоний холерного вибриона через 12 часов инкубации при 37°C после высева бактериологической петлей № 5 шестичасовых бульонных (выращенных в соответствующей жидкой питательной среде) культур штаммов холерного вибриона, засеянных в соответствующую жидкую питательную среду из разведений 10^{-6} и 10^{-7} .

2.5.2.3.5 Определение показателя стабильности основных свойств микроорганизмов

Показатель стабильности основных свойств микроорганизмов определяли, согласно МУК 4.2.2316-08 и МУ 3.3.2.2124-06, как отношение числа атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным и другим свойствам колоний к общему числу колоний на чашках.

2.5.2.3.6 Определение показателя эффективности питательных сред

Показатель эффективности питательных сред определяли, согласно МУК 4.2.2316-08 и МУ 3.3.2.2124-06, как выход биомассы (число микробных клеток) с 1,0 мл питательной среды и прирост числа микроорганизмов относительно засеянного.

2.5.2.3.7 Определение дифференцирующих свойств питательных сред

Дифференцирующие свойства питательных сред (в настоящей работе - выраженность отличительных биохимических признаков холерного вибриона от других микроорганизмов) определяли согласно действующим методическим указаниям и практическим руководствам [169, 170].

2.5.2.3.8 Определение диаметра колоний и радиальной скорости роста

Для определения показателей диаметра колоний и радиальной скорости роста пользовались методом, предложенным О.В. Шереметом и В.А. Копыловым [338].

2.5.2.4 Определение гемолитической активности штаммов холерного вибриона

Гемолитическую активность штаммов холерного вибриона определяли постановкой пробы Грейга с эритроцитами барана согласно действующим методическим указаниям и практическим руководствам [169, 170].

2.5.2.5 Получение супернатантов бульонных культур холерного вибриона

Получение супернатантов бульонных культур холерного вибриона с целью оценки энтеротоксинопродуцирующей активности штаммов холерного вибриона на опытной и контрольных питательных средах осуществляли в соответствии с методом [434].

2.5.3 Биологические и цитологические методы исследования

Оценку энтеротоксинпродуцирующей активности штаммов холерного вибриона на опытной и контрольных питательных средах проводили путем постановки теста кожной проницаемости по Craig J.P. [394] и титрованием в культуре клеток СНО-К1 [118, 179, 182].

2.5.4 Серологические методы исследования

Выявление продукции капсульного антигена (фракции I) чумного микроба проводили следующими серологическими методами: постановкой реакции агломерации объемной (РАО), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), методом флюоресцирующих антител (МФА) согласно рекомендациям, приведенным в руководствах [170, 202].

2.5.5 Методы статистической обработки полученных результатов

При статистической обработке данных математический анализ включал вычисление средних величин, ошибок средних арифметических, коэффициентов вариаций, доверительных интервалов, t – критерия

Стьюдента. Для сравнения результатов, полученных на опытных и контрольных средах, использовали критерий «хи-квадрат» [287]. Группировку первичных данных и вычисления проводили на персональных компьютерах с использованием пакета программ Excel 7.0.

Оптимизацию конструируемых питательных сред по количественному содержанию ингредиентов с учетом их влияния на биологические показатели данных сред проводили методами Гаусса-Зейделя [435] и Розенброка-Вотруба [513].

Биологическую безопасность работы обеспечивал высокий уровень подготовки персонала лабораторий [41], на базе которых проводили исследования, и соблюдение требований санитарных правил [30].

ГЛАВА 3. ОПТИМИЗАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА ИЗГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ ОСНОВЫ – ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ (ПППД)

3.1. Исследование различных марок дрожжей хлебопекарных прессованных в аспекте их использования в качестве питательного субстрата для панкреатического гидролиза

В настоящем исследовании были использованы три основных марки дрожжей хлебопекарных прессованных, выпускаемых Ростовским-на-Дону дрожжевым заводом: «Особые» (ТУ 9182-023-00371185-98), «Градус» (ГОСТ 171-81) и «Хлебное дерево» (ГОСТ 171-81), а также дрожжи хлебопекарные прессованные «Экстра» производства ООО «Воронежские дрожжи» (ТУ 9182-001-59559671-2003), дрожжи Черкесского (ГОСТ 171-81) и Санкт-Петербургского (ТУ 9182-005-00353595-2001) дрожжевых заводов. Аналогичную продукцию (соответствующую требованиям данных ГОСТов и ТУ) выпускает ряд других предприятий в разных регионах России.

Указанные марки прессованных пекарских дрожжей были исследованы в аспекте их потенциального использования в качестве основного субстрата для приготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) с оценкой их по следующим критериям: гомогенности суспензии пекарских дрожжей в воде очищенной; наличию пенообразования при их суспендировании или в процессе гидролиза; длительности гидролиза (период от момента внесения фермента в суспензию до выхода на плато кривой нарастания аминного азота); физико-химическим показателям полученных из них панкреатических гидролизатов при равных оптимальных условиях гидролиза и сбалансированном соотношении концентраций фермента и субстрата (общему и аминному азоту; отношению аминного азота к общему, характеризующему глубину расщепления белков; содержанию углеводов и хлоридов); осветляемости полученных гидролизатов; биологическим

показателям приготовленных из панкреатических переваров (в концентрации 0,7% по аминному азоту) каждой из вышеперечисленных марок прессованных хлебопекарных дрожжей агаризованных питательных сред в отношении тест-штаммов *V.cholerae non O1 P-9741* и *Y.pestis EV 1290*. Наряду с этим, были построены кривые гидролиза использованных в исследовании дрожжей различных марок и производителей, для чего с интервалом в 1 час от момента внесения фермента в гидролизуемую суспензию определяли показатель аминного азота в ней.

Анализ полученных результатов (таблицы 4,5) свидетельствует, что по совокупности выбранных критериев оценки все 6 исследованных марок дрожжей хлебопекарных прессованных могут быть использованы в качестве субстрата для изготовления ПППД. Получаемые из них ферментативные гидролизаты характеризуются близкими физико-химическими показателями (общего и аминного азота; отношения аминного азота к общему; углеводов; хлоридов), а по биологическим показателям изготовленных из них агаризованных сред (чувствительности, показателю прорастания, диаметру и морфологии колоний, выходу биомассы в отношении тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба) соответствуют требованиям действующих нормативных документов. Однако, дрожжи хлебопекарные прессованные «Особые» Ростовского-на-Дону дрожжевого завода и дрожжи производства Черкесского заводов имеют ряд преимуществ перед четырьмя другими исследованными марками данной продукции: отсутствие пенообразования при суспендировании; наименьшая длительность гидролиза; более высокие показатели аминного и общего азота полученных из них гидролизатов; низкое содержание углеводов в их панкреатических переварах, позволяющее использовать данную основу для приготовления моно- и полиуглеводных цветных дифференциально-диагностических сред; более короткий срок осветления путём отстаивания и формирование при этом плотного осадка, облегчающего декантацию.

Таблица 4

Сравнительная характеристика прессованных хлебопекарных дрожжей различных производителей по технологическим характеристикам и физико-химическим показателям получаемых из них панкреатических гидролизатов

Критерии оценки	Марки дрожжей хлебопекарных прессованных					
	«Особые», Ростовский-на-Дону дрожжевой завод	«Градус», Ростовский-на-Дону дрожжевой завод	«Хлебное дерево», Ростовский-на-Дону дрожжевой завод	Дрожжи хлебопекарные прессованные, Черкесский дрожжевой завод	«Экстра», ООО «Воронежские дрожжи», г.Воронеж	Дрожжи хлебопекарные прессованные, Санкт-Петербургский дрожжевой завод
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
1. Гомогенность суспензии в воде очищенной	гомогенна	гомогенна	гомогенна	гомогенна	гомогенна	гомогенна
2. Пенообразование при суспендировании или в процессе гидролиза	отсутствует	выраженное	отсутствует или умеренное	отсутствует	отсутствует	отсутствует или умеренное
3. Длительность гидролиза (ч)	12±1,2	15±2,3	13±1,7	12±0,6	12±1,7	13±1,7
4. Общий азот получаемого гидролизата (%)	0,93±0,21	0,89±0,11	0,78±0,08	0,88±0,16	0,86±0,12	0,74±0,06

Таблица 4 (окончание)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
5. Аминный азот получаемого гидролизата (%)	0,3±0,04	0,26±0,02	0,21±0,01	0,29±0,03	0,28±0,02	0,23±0,03
6. Отношение аминного азота к общему в получаемом гидролизате (%)	32,3±2,1	29,2±1,9	27,2±2,3	32,9±3,4	32,6±2,8	31,1±3,3
7. Содержание углеводов в получаемом гидролизате (%)	0,04±0,014	0,06±0,012	0,04±0,016	0,04±0,012	0,05±0,009	0,06±0,018
8. Содержание хлоридов в получаемом гидролизате (%)	0,46±0,08	0,38±0,12	0,49±0,07	0,42±0,08	0,48±0,06	0,43±0,05
9. Осветляемость при отстаивании; длительность осветления гидролизата; характер осадка	полная; в течение 4 мес; осадок плотный	полная; в течение 6 мес; осадок рыхлый	полная; в течение 5 мес; осадок плотный	полная; в течение 4 мес; осадок плотный	полная; в течение 6-7 мес; осадок рыхлый	полная; в течение 5 мес; осадок плотный

Таблица 5

Сравнительная характеристика прессованных хлебопекарных дрожжей различных производителей по биологическим показателям вариантов агаризованной питательной среды, приготовленных на основе панкреатических гидролизатов данных дрожжей, взятых в концентрации 0,07 % по аминному азоту

Критерии оценки	Марки дрожжей хлебопекарных прессованных					
	«Особые», Ростовский- на-Дону дрожжевой завод	«Градус», Ростовский- на-Дону дрожжевой завод	«Хлебное дерево», Ростовский- на-Дону дрожжевой завод	Дрожжи хлебопекарные прессованные, Черкесский дрожжевой завод	«Экстра», ООО «Воронежские дрожжи», г.Воронеж	Дрожжи хлебопекарные прессованные, Санкт- Петербургский дрожжевой завод
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
<i>Тест-штамм V.cholerae non 01 / non O139 P-9741</i>						
10. Чувствительность (м.к.)	10	10	10	10	10	10
11. Показатель прорастания (% из 100 посеянных м.к.)	38,3±2,5	32,4±3,6	28,7±2,9	37,1±3,5	39,2±2,8	31,1±3,3
12. Диаметр колоний (мм)	2,4±0,3	1,8±0,2	2,2±0,1	2,5±0,2	2,5±0,3	2,0±0,3

Таблица 5 (окончание)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
13.Морфология колоний	типичная для <i>V.cholerae</i>					
14.Выход биомассы с 1 мл среды (млрд.м.к.)	23,2±1,8	15,7±1,9	17,4±2,2	22,9±2,7	23,4±2,2	16,6±1,4
Тест-штамм <i>Y.pestis</i> EV 1290						
1. Чувствительность (м.к.)	10	10	10	10	10	10
2. Показатель прорастания (% из 100 посеянных м.к.)	58,2±4,6	51,4±5,4	53,3±3,7	56,2±5,4	57,7±4,9	50,8±4,6
3. Диаметр колоний (мм)	1,5±0,2	1,2±0,1	1,3±0,1	1,5±0,1	1,4±0,2	1,3±0,1
4. Морфология колоний	типичная для <i>Y.pestis</i>					
5. Выход биомассы с 1 мл среды (млрд.м.к.)	14,4±1,3	8,9±0,9	12,1±1,1	13,9±1,7	14,6±1,8	11,3±1,1

Анализ кривых гидролиза исследуемых хлебопекарных дрожжей различных марок и производителей (рисунок 1), выявил, что постоянная скорость нарастания аминного азота в течение первых 8 часов от момента внесения фермента наблюдалась только у дрожжей «Особые» Ростовского-на-Дону дрожжевого завода.

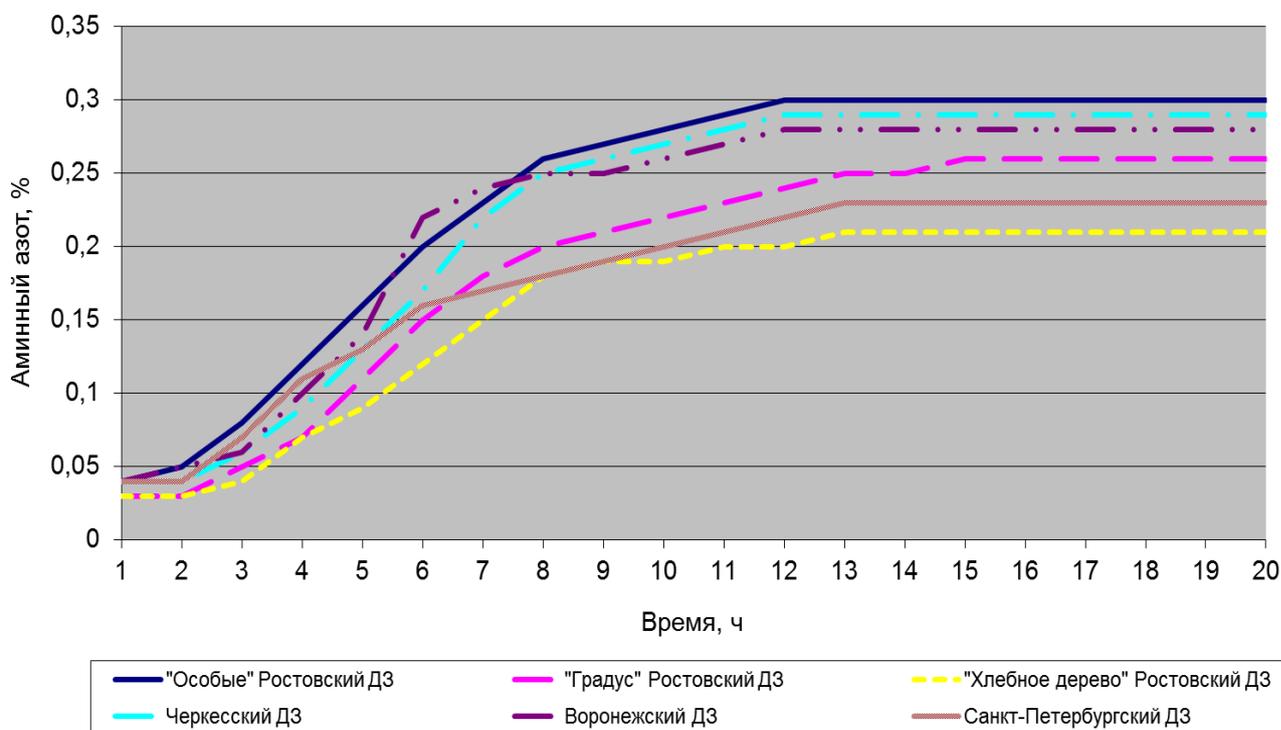


Рисунок 1. Кривые нарастания аминного азота при гидролизе хлебопекарных дрожжей различных марок и производителей

Гидролиз других дрожжей в этом временном промежутке протекал с изменениями скорости нарастания аминного азота. Постоянство этого показателя у дрожжей «Градус» того же производителя наблюдалось до 4-го часа от начала ферментации, но скорость расщепления дрожжевых белков была ниже, чем при переваривании дрожжей «Особых», затем с 5-го по 8-ой час скорости нарастания аминного азота обеих марок становились идентичными, а с 8-ого часа до выхода кривых на «плато» - замедлялись вследствие исчерпания в смеси субстрата и фермента. Окончание гидролиза дрожжей «Особых» регистрировалось на 3 часа раньше и при более высоком

итоговом значении аминного азота гидролизуемой суспензии, чем при использовании дрожжей «Градус». Незначительное отставание скорости гидролиза хлебопекарных дрожжей Черкесского завода от дрожжей марки «Особые» нивелировалось к 7-ому часу от момента внесения фермента, после чего процессы их переваривания шли параллельно, о чём свидетельствуют идентичные формы кривых нарастания аминного азота. Увеличение интенсивности гидролиза дрожжей ООО «Воронежские дрожжи» в промежутке между 5-ым и 6-ым часами от начала ферментации при существенном отставании нарастания аминного азота в первые 4 часа от такового при переваривании дрожжей «Особые» связано, вероятно, с особенностями строения и большей устойчивостью клеточной стенки «воронежских» дрожжей к ферментам, входящим в состав панкреатина. Нарушение целостности их клеточных стенок под действием фермента и, возможно, хлороформа (используемого в качестве консерванта гидролизуемых суспензий) и выход из дрожжевых клеток протоплазмы (содержащей наибольшее количество белков и, соответственно, являющейся основным субстратом ферментализации) происходит на 2-3 часа позже, чем у других исследованных дрожжей. Это подтверждается результатами микроскопии мазков, приготовленных из гидролизуемых суспензий в разных временных точках и окрашенных по Граму. К 4-ому часу от момента внесения фермента в мазках из суспензий всех исследованных дрожжей доминируют мелкие грамтрицательные формы, образующиеся вследствие разрушения клеточной стенки, потери пептидогликанов и опорожнению содержимого клеток во внешнюю среду (рисунок 2). У «воронежских» дрожжей к этому времени присутствует в полях зрения до 10-15% исходных крупных грамположительных дрожжевых клеток (рисунок 3), исчезающих к концу 6-ого часа ферментативного гидролиза. Прирост количества высвобождающегося из клеток субстрата между 5-ым и 6-ым часом процесса переваривания предположительно способствует более крутому восхождению

кривой нарастания аминного азота в указанный период у данной марки дрожжей.

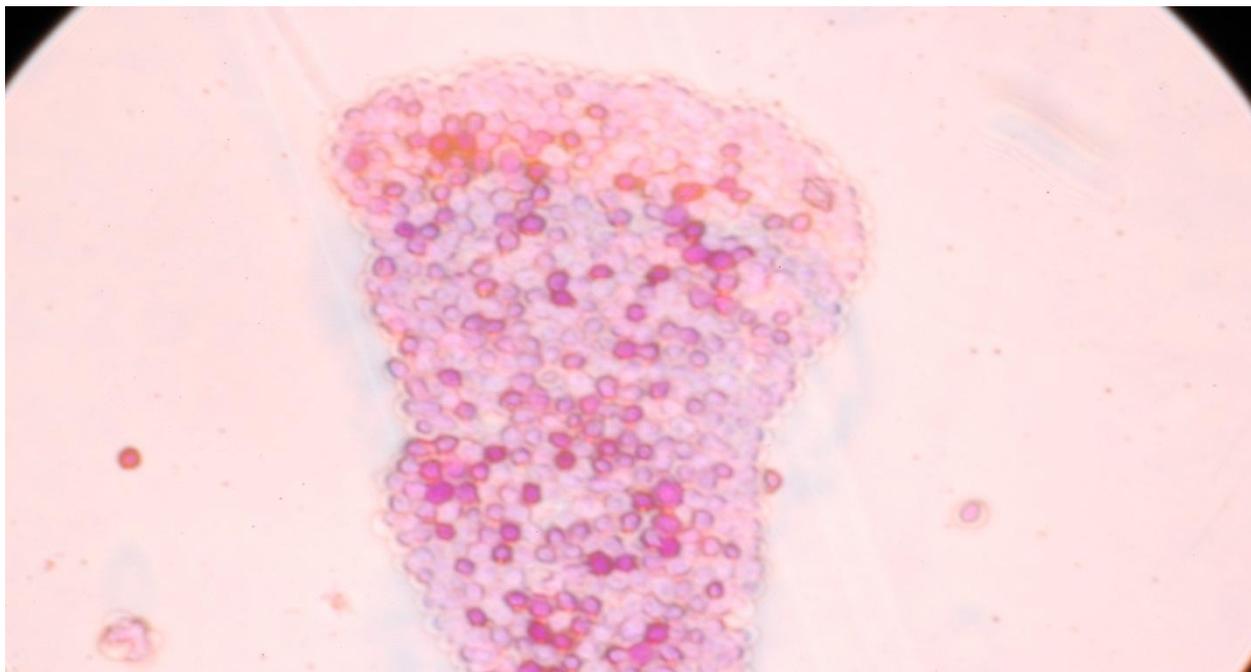


Рисунок 2. Мазок из гидролизуемой суспензии дрожжей пекарских Черкесского дрожжевого завода через 4 часа после внесения фермента. Доминируют мелкие грамотрицательные формы с разрушенной клеточной стенкой

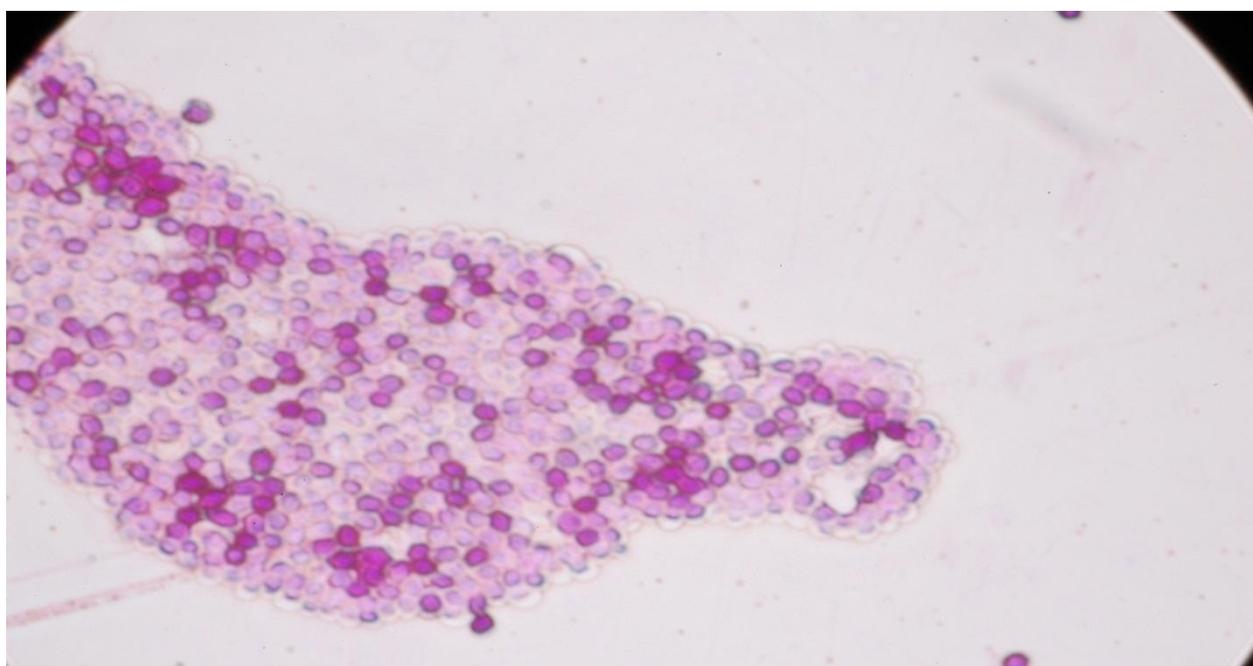


Рисунок 3. Мазок из гидролизуемой суспензии дрожжей пекарских ООО «Воронежские дрожжи» через 4 часа после внесения фермента. В полях зрения до 10-15% исходных крупных грамположительных клеток с неразрушенной клеточной стенкой

Наиболее раннее замедление скорости гидролиза, регистрируемое уже к 6-ому часу от момента внесения фермента, наблюдалось у дрожжей хлебопекарных производства Санкт-Петербургского завода, хотя нарастание аминного азота при их переваривании прекращалось только к 13-ому часу. Дрожжи марки «Хлебное дерево» Ростовского-на-Дону дрожжевого завода характеризовались самой низкой интенсивностью процесса ферментализации панкреатином и наименьшим конечным значением аминного азота в полученном из них гидролизате.

Таким образом, в технологическом процессе изготовления ПППД в качестве основного сырья следует рекомендовать использование дрожжей хлебопекарных прессованных марки «Особые» Ростовского-на-Дону дрожжевого завода, а также дрожжи Черкесского завода. Дрожжи марок «Градус», «Хлебное дерево» (г.Ростов-на-Дону), «Экстра» производства ООО «Воронежские дрожжи» и Санкт-Петербургского дрожжевого завода могут рассматриваться как резервный субстрат для получения ПППД.

3.2 Определение оптимальной для проведения панкреатического гидролиза плотности суспензии прессованных пекарских дрожжей в очищенной воде

С целью обеспечения оптимальных условий проведения панкреатического гидролиза прессованных пекарских дрожжей и получения максимального выхода конечного продукта с высоким содержанием аминного азота нами было проведено исследование ферментализации суспензий пекарских дрожжей с различной плотностью в воде очищенной: 0,5 кг дрожжей/ 1 кг суспензии (1 кг дрожжей на 1 л воды); 0,33 кг дрожжей/ 1 кг суспензии (1 кг дрожжей на 2 л воды); 0,25 кг дрожжей/ 1 кг суспензии (1 кг дрожжей на 3 л воды); 0,2 кг дрожжей/ 1 кг суспензии (1 кг дрожжей на 4 л воды); 0,17 кг дрожжей/ 1 кг суспензии (1 кг дрожжей на 5 л воды); 0,14 кг дрожжей/ 1 кг суспензии (1 кг дрожжей на 6 л воды). Данные суспензии с различной плотностью были оценены по следующим критериям: длительности

гидролиза, выходу конечных продуктов гидролиза, содержанию аминного азота в полученных гидролизатах, расчётному выходу агаризованной (с концентрацией каждого из полученных гидролизатов в соответствующем варианте среды, эквивалентной 0,05 % по аминному азоту) и жидкой (с концентрацией - 0,07 % по аминному азоту) питательных сред.

При планировании исследований нами была принята за основу рабочая гипотеза, базирующаяся на общепринятой в ферментологии концепции, согласно которой «чем выше разведение субстрата, тем быстрее и полнее протекает ферментативный гидролиз белков». Вместе с тем, фактором, лимитирующим уменьшение плотности суспензии прессованных хлебопекарных дрожжей в очищенной воде для достижения наименьшей длительности технологического процесса, является итоговый показатель аминного азота в полученном гидролизате. В соответствие с этим, суспендирование дрожжей в большем количестве дистиллированной воды должно приводить к сокращению сроков гидролиза и повышению выхода целевого продукта, однако данный продукт будет характеризоваться более низким аминным азотом вследствие разведения водой, следовательно для приготовления среды с фиксированным значением этого показателя (0,05% - агаризованной и 0,07% - жидкой) потребуется увеличить содержание такого гидролизата в ней. Таким образом, поиск оптимума плотности суспензии дрожжей был направлен на нахождение баланса между скоростью гидролиза, итоговым показателем аминного азота в конечном продукте и расчётным выходом из полученного количества гидролизата агаризованной и жидкой сред.

Анализ данных, полученных в ходе проведённых экспериментов подтвердил правомерность вышеприведённых теоретических представлений. Результаты исследований, представленные в таблице 6, свидетельствует, что оптимальной плотностью суспензии прессованных пекарских дрожжей в дистиллированной воде является значение 0,2 кг дрожжей / 1 кг суспензии (эквивалентная 1 кг дрожжей на 4 л воды).

Таблица 6

Сравнительная оценка суспензий прессованных хлебопекарных дрожжей с различной плотностью в дистиллированной воде

Критерии оценки	Плотность суспензии хлебопекарных дрожжей в дистиллированной воде (кг дрожжей / 1 кг суспензии)					
	0,5	0,33	0,25	0,2	0,17	0,14
Длительность гидролиза, ч	16±1,25	15±1,5	13±1,25	12±0,75	12±1,25	12±0,5
Выход конечного продукта гидролиза из 1 кг дрожжей при соответствующей плотности суспензии, л	0,8±0,1	2,1±0,2	3,0±0,1	4,1±0,2	5,0±0,4	5,9±0,3
Аминный азот в полученных гидролизатах, %	0,36±0,03	0,35±0,02	0,32±0,03	0,30±0,04	0,18±0,02	0,16±0,01
Расчётный выход агаризованной питательной среды из полученного кол-ва гидролизата, л	4,6±1,2	14,7±2,2	19,2±2,5	24,6±4,5	18,0±3,5	18,9±2,2
Расчётный выход жидкой питательной среды – бульона из полученного кол-ва гидролизата, л	3,3±0,8	10,5±1,6	13,7±1,8	17,6±3,2	12,9±2,5	13,5±1,5

При данной плотности регистрируется наименьшая длительность гидролиза и наилучшие расчётные показатели выхода агаризованной и жидкой питательных сред из полученного количества гидролизата. Дальнейшее снижение плотности суспензии не ускоряет процесс и ведёт к уменьшению как аминного азота полученного целевого продукта, так и количества сред, которое можно из него приготовить.

3.3 Сравнительное изучение различных методов ингибирования собственных дрожжевых ферментов в гидролизуемых смесях при проведении панкреатического переваривания прессованных пекарских дрожжей

Известно [138], что дрожжи характеризуются наличием собственных протеолитических ферментов – пепсиназы, триптазы и эриптазы, которые при определённых условиях (рН от 4,5 до 7,6 и температуре $45\pm 8^\circ\text{C}$) могут вызывать аутолиз дрожжей. Каждый из этих ферментов имеет строго определённую направленность в отношении связывания с субстратом (белками продуцирующих данные ферменты дрожжевых клеток) и разрыва пептидных связей, свой оптимум концентрации водородных ионов и температуры реализации протеолитической активности. Продукт, получаемый в результате такой ферментативной реакции, содержит пептиды с различной молекулярной массой, длиной и степенью полимерности. Скорость и степень усвоения таких пептидов бактериями (в том числе, холерным вибрионом и чумным микробом) достаточно вариабельна, во многом определяется наличием и особенностью их депептидаз, требует в ряде случаев дополнительных затрат клеточной энергии. Это, в свою очередь, может затруднять развитие в изготовленных из аутолизатов питательных средах микробных популяций. Необходимость предварительного ингибирования собственных дрожжевых ферментов в суспензии пекарских дрожжей до момента внесения внешнего фермента – панкреатина диктуется возможностью параллельного протекания в

гидролизуемой смеси панкреатического переваривания субстрата и его аутолиза, что делает данный технологический процесс практически неуправляемым и приводит к появлению несбалансированного по пептидному составу конечного продукта, ухудшающего основные бактериологические показатели изготовленных из него питательных сред.

Нами было проведено сравнительное изучение некоторых методов ингибирования собственных дрожжевых ферментов на стадии изготовления суспензии пекарских дрожжей: щелочения суспензии с помощью 20% раствора гидроксида натрия до значений pH (свыше 8,0), обеспечивающих оптимальную протео-, амило- и липолитическую активность вносимого в неё панкреатина и угнетающих деятельность всех трёх дрожжевых ферментов, в том числе, и эриптазы, оптимум активности которой приходится на слабощелочной pH (7,4-7,6); предварительного прогревания изготовленной суспензии на водяной бане при 56°C в течение 30 минут; кипячения суспензии в течение 18-20 минут; сочетания прогревания суспензии с последующим щелочением и кипячения со щелочением. Оценку эффективности исследуемых методов ингибирования дрожжевых ферментов осуществляли по следующим критериям: степени нарастания аминного азота в суспензии с течением времени без внесения в неё панкреатина, длительности последующего гидролиза после внесения панкреатина, осветляемости полученных гидролизатов, основным биологическим показателям изготовленных из них агаризованных питательных сред в отношении тест-штаммов *V.cholerae non O1 P-9741* и *Y.pestis EV 1290* (таблица 7). Данные, приведённые в таблице 7 наглядно демонстрируют очевидные преимущества (по совокупности использованных критериев оценки) метода ингибирования собственных дрожжевых протеолитических ферментов путём предварительного щелочения суспензии прессованных пекарских дрожжей до значения pH $8,3 \pm 0,2$ перед другими исследованными методами.

Таблица 7

Сравнительная оценка эффективности различных методов ингибирования собственных дрожжевых ферментов в суспензии прессованных хлебопекарных дрожжей перед внесением внешнего фермента – панкреатина

Критерии оценки эффективности методов ингибирования собственных дрожжевых ферментов	Методы ингибирования собственных дрожжевых ферментов				
	Щелочение 20% раствором гидроокиси натрия до значений pH $8,3\pm 0,2$	Предварительное прогревание суспензии при 56°C на водяной бане в течение 30 минут	Предварительное кипячение суспензии в течение 18-20 минут	Сочетание предварительного прогрева суспензии при 56°C в течение 30 минут с последующим щелочением до pH $8,3\pm 0,2$	Сочетание предварительного кипячения суспензии в течение 18-20 минут с последующим щелочением до pH $8,3\pm 0,2$
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Наращение аминного азота в суспензии в течение 6 часов без внесения в неё панкреатина	Отсутствует (аутолиз блокирован)	Небольшой прирост аминного азота – 0,02 % по сравнению с исходным уровнем (аутолиз не полностью блокирован)	Отсутствует (аутолиз блокирован)	Отсутствует (аутолиз блокирован)	Отсутствует (аутолиз блокирован)
Длительность гидролиза после внесения панкреатина, ч	$12\pm 1,7$	$13\pm 1,2$	$15\pm 1,7$	$14\pm 1,2$	$18\pm 2,3$

Таблица 7 (окончание)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
Осветляемость полученных панкреатических гидролизатов методом отстаивания на холоде	Полная в течение 4 месяцев, осадок плотный, надосадочная жидкость прозрачная	Неполная в течение 8 месяцев, осадок рыхлый, надосадочная жидкость опалесцирующая	Полная в течение 6 месяцев, осадок плотный, надосадочная жидкость прозрачная	Неполная в течение 8 месяцев, осадок рыхлый, надосадочная жидкость опалесцирующая	Полная в течение 5 месяцев, осадок плотный, надосадочная жидкость прозрачная
Биологические показатели приготовленных агаризованных питательных сред в отношении <i>V.cholerae non O1 P-9741</i>					
Чувствительность, м.к.	10	10	10	10	10
Показатель прорастания, %	36,8±3,4	19,6±2,2	32,6±2,8	29,2±2,6	31,2±3,2
Диаметр колоний, мм	3,0±0,3	0,9±0,8	1,9±0,4	1,9±0,2	2,4±0,4
Морфология колоний	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная
Выход биомассы, млрд. м.к./ мл среды	24,6±1,8	11,3±1,1	17,1±1,8	14,6±1,5	21,8±2,2
Биологические показатели приготовленных агаризованных питательных сред в отношении <i>Y.pestis EV 1290</i>					
Чувствительность, м.к.	10	10	10	10	10
Показатель прорастания, %	57,4±4,7	38,6±3,4	51,7±5,3	47,6±4,7	52,2±5,1
Диаметр колоний, мм	1,6±0,2	0,7±0,1	1,3±0,2	1,4±0,2	1,5±0,1
Морфология колоний	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная
Выход биомассы, млрд. м.к./ мл среды	14,6±1,1	8,8±0,7	11,2±1,1	9,5±0,8	12,2±1,7

Однако, принимая во внимание факт, что при последующем панкреатическом переваривании суспензии с заблокированным таким способом аутолизом происходит накопление в гидролизуемой смеси кислых продуктов, сдвигающее её рН в зону активности собственных дрожжевых ферментов, а это в свою очередь может инициировать процесс аутолиза на фоне снижения скорости панкреатического переваривания субстрата в неоптимальных значениях показателя концентрации водородных ионов, представляется целесообразной постоянная коррекция рН гидролизуемой панкреатином дрожжевой суспензии с помощью 20% раствора гидроксида натрия с целью удержания этого показателя на уровне, превышающем значение 8,0.

3.4 Подбор дозы панкреатина сухого, обеспечивающей оптимальный гидролиз прессованных пекарских дрожжей

В работе был использован панкреатин крупного рогатого скота сухой (ОСТ 49167-92) производства ООО «Мясокомбинат Ростовский», г.Ростов-на-Дону. Активность 1 мг данного препарата эквивалентна: по липазе – 25 F.I.P. (единиц Международной Фармацевтической Федерации); по амилазе – 19,3 F.I.P.; по протеазе – 1,3 F.I.P. Определение оптимальной дозы данного препарата для гидролиза прессованных пекарских дрожжей осуществляли по методу Гаусса-Зейделя. Исследовали дозы панкреатина крупного рогатого скота сухого (в пересчёте на 1 кг дрожжей) в диапазоне от 0,1 до 1,0 г/ кг дрожжей с шагом 0,1 г/кг. Критериями оценки эффективности использования указанного ферментного препарата в исследованных дозах являлись: длительность гидролиза, содержание аминного азота в полученных панкреатических гидролизатах, осветляемость полученных гидролизатов, бактериологические показатели агаризованных питательных сред, приготовленных из данных панкреатических переваров, в отношении тест-штаммов *V.cholerae non O1 P-9741* и *Y.pestis EV 1290* (Таблица 8).

Таблица 8

Оценка эффективности использования панкреатина крупного рогатого скота сухого в различных дозах для гидролиза прессованных пекарских дрожжей

Критерии оценки эффективности использования исследуемой дозы фермента для гидролиза прессованных пекарских дрожжей	Дозы панкреатина крупного рогатого скота сухого (г/кг дрожжей)									
	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
Длительность гидролиза	21±1,75ч	19±1,5 ч	18±1,75ч	17±1,25ч	16±1,0 ч	14±1,0 ч	12±0,75ч	12±0,5 ч	12±0,75ч	12±1,0ч
Содержание аминного азота в полученных панкреатических гидролизатах	0,13±0,01 %	0,16±0,03 %	0,17±0,02 %	0,22±0,02 %	0,24±0,03 %	0,27±0,03 %	0,30±0,04 %	0,29±0,02 %	0,31±0,03 %	0,30±0,02 %
Осветляемость полученных панкреатических гидролизатов при отстаивании на холоде	неполная (8 мес.)	неполная (8 мес.)	полная (7 мес.)	полная (6 мес.)	полная (6 мес.)	полная (5 мес.)	полная (4 мес.)	полная (4 мес.)	полная (4 мес.)	полная (4 мес.)

Таблица 8 (продолжение)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
Бактериол. показатели агаризованной питательной среды приготовленной из полученных панкреатических гидролизатов в отношении тест-штамма <i>V.cholerae non O1 / non O139 P-9741</i>	1) 10 м.к. 2) 19,0±1,7 % 3) 1,1±0,2 мм 4) типичная 5) 6,8±0,3 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 22,1±2,4 % 3) 1,2±0,2 мм 4)типичная 5) 7,9±0,9 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 29,2±2,7 % 3) 1,6±0,3 мм 4)типичная 5) 11,3±2,1 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 31,1±2,7 % 3) 1,5±0,3 мм 4)типичная 5)13,9±1,7 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 32,6±3,4 % 3) 2,2±0,4 мм 4)типичная 5) 17,1±1,9 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 32,8±2,6 % 3) 2,7±0,3 мм 4)типичная 5) 21,4±2,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 36,8±3,2 % 3) 3,0±0,2 мм 4)типичная 5) 24,6±2,8 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 35,9±2,3 % 3) 2,9±0,3 мм 4)типичная 5) 23,7±3,1 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 36,2±2,6 % 3) 3,1±0,2 мм 4)типичная 5) 25,1±1,9 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 34,9±3,8 % 3) 2,8±0,3 мм 4)типичная 5) 23,4±2,2 млрд.м.к.

Примечание: 1) чувствительность (м.к.);
 2) показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к. (%);
 3) диаметр колоний (мм);
 4) морфология колоний;
 5) выход биомассы с 1 мл среды (млрд.м.к.).

Таблица 8 (окончание)

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
Бактериол. показатели агаризованной питательной среды, приготовленной из полученных панкреатических гидролизатов в отношении тест-штамма <i>Y.pestis EV 1290</i>	1) 10 м.к. 2) 39,1±2,3 % 3) 0,9±0,2 мм 4)типичная 5) 3,2±0,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 43,1±3,4 % 3) 1,0±0,2 мм 4)типичная 5) 3,8±0,3 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 49,2±4,7 % 3) 1,2±0,1 мм 4)типичная 5) 5,1±1,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 52,1±4,7 % 3) 1,1±0,2 мм 4)типичная 5) 6,8±1,3 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 52,6±3,8 % 3) 1,3±0,2 мм 4)типичная 5) 9,4±1,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 53,4±3,8 % 3) 1,5±0,3 мм 4)типичная 5) 11,7±1,8 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 56,7±5,2 % 3) 1,6±0,2 мм 4)типичная 5) 12,8±1,8 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 55,9±4,7 % 3) 1,5±0,2 мм 4)типичная 5) 12,2±1,8 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 56,4±3,6 % 3) 1,6±0,2 мм 4)типичная 5) 13,4±2,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 53,8±5,3 % 3) 1,5±0,1 мм 4)типичная 5) 11,9±1,2 млрд.м.к.

Примечание: 1) чувствительность (м.к.);
 2) показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к.;
 3) диаметр колоний (мм);
 4) морфология колоний;
 5) выход биомассы с 1 мл среды (млрд.м.к.).

Анализ данных, представленных в таблице 8 свидетельствует, что наилучшие результаты гидролиза и характеристики полученных панкреатических переваров были достигнуты при использовании панкреатина крупного рогатого скота сухого в дозах от 0,7 до 1,0 г/ кг дрожжей с практически идентичными значениями всех оцененных показателей для каждой из доз данного диапазона. За оптимальную дозу фермента для обеспечения процесса панкреатического гидролиза прессованных пекарских дрожжей была принята минимальная из четырёх доз указанного диапазона, т.е. 0,7 г/ кг дрожжей. Использование более низких доз панкреатина не обеспечивает полноты расщепления субстрата, создаёт трудности при пассивном осветлении полученного в процессе гидролиза конечного продукта, полученные таким образом панкреатические перевары дрожжей характеризуются невысоким содержанием аминного азота, среды на их основе имеют более низкие показатели прорастания, диаметра колоний, выхода биомассы, чем сваренные из гидролизатов, приготовленных с использованием больших доз фермента.

3.5 Поиск оптимума рН для проведения панкреатического гидролиза прессованных пекарских дрожжей

Известно, что ферментативные реакции сильно зависят от рН и каждый фермент проявляет максимум своей активности при определённом значении показателя концентрации водородных ионов, известном под названием оптимума рН [138]. По данным литературы [504] оптимум рН панкреатина лежит в диапазоне 8,0-8,5, при выходе рН за границы данного диапазона равновесие между активной и неактивной формами ферментов, входящих в состав панкреатина сдвигается в сторону неактивной формы, что вызывает замедление панкреатического гидролиза. Кроме того значение рН гидролизуемой панкреатином суспензии прессованных пекарских дрожжей, лежащее в оптимальном диапазоне 8,0-8,5, является фактором, ингибирующим аутолитическое расщепление субстрата.

Принимая во внимание вышеизложенное, мы исследовали влияние на панкреатический гидролиз прессованных пекарских дрожжей значений рН, близких к описанному в литературе оптимальному диапазону (Таблица 9).

Анализ данных, представленных в таблице 9, показал, что по совокупности взятых для оценки критериев оптимальным значением рН панкреатического гидролиза суспензии прессованных пекарских дрожжей следует считать значение 8,3, так как именно при этих условиях регистрируется наиболее высокая скорость гидролиза и наилучшие качества конечного продукта, о чём свидетельствуют результаты приведённых физико-химических (аминный азот) и бактериологических исследований.

Поскольку в процессе панкреатического гидролиза происходит постоянный сдвиг рН в кислую сторону (наиболее интенсивный в первые 6 часов от момента внесения панкреатина), то для поддержания его оптимального значения необходима регулярная компенсация этого сдвига добавлением соответствующих количеств 20% раствора гидроксида натрия. Так как в первые 6 часов скорость реакции наиболее высокая, а буферность гидролизуемой смеси низкая (т.к. в ней присутствуют преимущественно белки и высокополимерные пептиды, а не свободные аминокислоты и олигомерные пептиды, образующиеся при гидролизе белков и полипептидов) коррекцию рН необходимо проводить с интервалом в 20 минут. В последующем этот интервал увеличивается до 1 ч (6-ой - 12-ый час реакции); 12 ч (12-ый – 48-ой час реакции); 24 ч (от 48-ого часа до окончания гидролиза).

Таблица 9

Оптимизация значения рН для проведения панкреатического гидролиза суспензии прессованных пекарских дрожжей

Критерии оценки	Значения рН гидролизуемой панкреатином суспензии прессованных пекарских дрожжей					
	7,7	8,0	8,3	8,6	8,9	9,2
1	2	3	4	5	6	7
Длительность гидролиза	18±0,5 ч	13±0,75 ч	12±0,75 ч	13±1,25 ч	16±1,25 ч	17±1,5 ч
Содержание аминного азота в полученных панкреатических гидролизатах	0,22±0,02%	0,26±0,03%	0,30±0,04%	0,27±0,02%	0,19±0,01%	0,18±0,03%
Бактериологические показатели приготовленных из полученных гидролизатов агаризованных питательных сред в отношении тест-штамма <i>V.cholerae non O1/non O139 P-9741</i>	1) 10 м.к. 2) 27,9±2,7 % 3) 1,3±0,3 мм 4) типичная 5) 11,9±1,1 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 32,4±3,2 % 3) 2,4±0,2 мм 4) типичная 5) 18,8±1,6 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 36,8±3,2 % 3) 3,0±0,3 мм 4) типичная 5) 24,6±2,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 31,1±3,7 % 3) 2,5±0,3 мм 4) типичная 5) 20,3 ±1,9 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 22,4±1,8 % 3) 1,1±0,4 мм 4) типичная 5) 7,4 ± 0,9 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 18,6±1,6 % 3) 0,8±0,4 мм 4) полиморф. колонии 5) 2,8±0,2 млрд.м.к.

Таблица 9 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
Бактериологические показатели приготовленных из полученных гидролизатов агаризованных питательных сред в отношении тест-штамма <i>Y.pestis EV 1290</i>	1) 10 м.к. 2) 38,7±3,7 % 3) 0,9±0,1 мм 4) типичная 5) 5,9±1,1 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 53,2±4,4 % 3) 1,4±0,2 мм 4) типичная 5) 9,6±1,4 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 58,3±5,2 % 3) 1,6±0,2 мм 4) типичная 5) 13,2±1,8 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 50,4±4,2 % 3) 1,5±0,1 мм 4) типичная 5) 11,6 ±1,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 36,2±2,6 % 3) 0,7±0,1 мм 4) типичная 5) 3,8 ± 0,4 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 27,1±2,3 % 3) 0,5±0,1 мм 4) типичная 5) 1,4±0,2 млрд.м.к.

Примечание: 1) чувствительность (м.к.);
 2) показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к. (%);
 3) диаметр колоний (мм);
 4) морфология колоний;
 5) выход биомассы (млрд.м.к. на 1 мл)

3.6 Оптимизация температурного режима панкреатического гидролиза суспензии прессованных пекарских дрожжей

Установлено, что существует температурный оптимум большинства ферментативных реакций близкий к 30-40°C. Tammann G. ещё в 1889 году [508] показал, что этот заметный оптимум представляет собой простое следствие того, что по мере нарастания температуры ферменты инактивируются с возрастающей скоростью, в то время как скорость каталитической реакции с нарастанием температуры равномерно увеличивается.

Принимая во внимание приведённые выше аргументы, для поиска оптимальной температуры проведения панкреатического гидролиза пекарских дрожжей нами было исследовано влияние на указанный процесс температур в диапазоне от 30 до 55°C (Таблица 10).

Представленные в таблице 10 результаты убедительно свидетельствуют, что оптимальной для проведения панкреатического гидролиза пекарских дрожжей является температура 45°C, на что указывает наименьшая длительность данного процесса при наиболее высоком содержании аминного азота в конечном продукте и лучшие бактериологические показатели приготовленных из него агаризованных питательных сред в отношении тест-штаммов *V.cholerae non O1 P-9741* и *Y.pestis EV 1290*.

3.7 Сравнительное изучение эффективности методов осветления панкреатического перевара пекарских дрожжей

В практике изготовления питательных сред и их основ используют различные методы осветления: фильтрование, осветление с помощью различных сорбентов (угля, глин, талька, бентонита, целлюлозы, яичного белка), изоэлектрическое осаждение, центрифугирование, отстаивание на холоде. В процессе выполнения настоящей работы нами были использованы:

Таблица 10

Оптимизация температурного режима панкреатического гидролиза суспензии прессованных пекарских дрожжей

Критерии оценки	Температура проведения гидролиза					
	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C
1	2	3	4	5	6	7
Длительность гидролиза	21±1,75 ч	17±0,75 ч	13±0,75 ч	12±0,75 ч	14±1,25 ч	19±1,5 ч
Содержание аминного азота в полученных панкреатических гидролизатах	0,16±0,02%	0,19±0,01%	0,25±0,03%	0,30±0,04%	0,24±0,02%	0,12±0,01%
Бактериологические показатели приготовленных из полученных гидролизатов агаризованных питательных сред в отношении тест-штамма <i>V.cholerae non O1 / non O139 P-9741</i>	1) 10 м.к. 2) 19,0±1,2 % 3) 0,7±0,3 мм 4) полиморф. колонии 5) 2,1±0,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 28,2±2,4 % 3) 1,4±0,1 мм 4) типичная 5) 9,6±0,8 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 31,8±3,2 % 3) 2,3±0,3 мм 4) типичная 5) 18,3±1,6 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 35,1±3,5 % 3) 2,9±0,3 мм 4) типичная 5) 22,7 ±2,1 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 32,4±2,8 % 3) 1,9±0,1 мм 4) типичная 5) 17,3 ± 1,1 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 18,6±1,6 % 3) 0,8±0,4 мм 4) типичная 5) 3,6±0,3 млрд.м.к.

Таблица 10 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
Бактериологические показатели приготовленных из полученных гидролизатов агаризованных питательных сред в отношении тест-штамма <i>Y.pestis EV 1290</i>	1) 10 м.к. 2) 23,5±2,1 % 3) 0,7±0,1 мм 4) типичная 5) 2,6±0,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 48,8±4,2 % 3) 1,1±0,1 мм 4) типичная 5) 4,7±1,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 52,1±4,8 % 3) 1,4±0,2 мм 4) типичная 5) 12,2±1,4 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 56,2±5,2 % 3) 1,7±0,1 мм 4) типичная 5) 14,8 ±1,6 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 51,0±4,9 % 3) 1,4±0,1 мм 4) типичная 5) 11,3 ± 2,2 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 22,3±2,1 % 3) 0,8±0,1 мм 4) типичная 5) 3,8±0,6 млрд.м.к.

Примечание: 1) чувствительность (м.к.);

2) показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к. (%);

3) диаметр колоний (мм);

4) морфология колоний;

5) выход биомассы (млрд.м.к. на 1 мл)

метод центрифугирования (как наиболее быстрый метод осветления) и метод отстаивания на холоде (как наименее затратный и позволяющий получать большие объёмы конечного продукта). Центрифугирование осуществляли на центрифуге «Вескман» при 18 тыс. г и 4°C в течение 20 минут с последующей декантацией. Отстаивание на холоде осуществляли при температуре 5 ± 3 °C в стеклянных баллонах ёмкостью 3-20 л под завинчивающимися пластмассовыми пробками в течение 3-8 месяцев. Сравнительное изучение использованных методов осветления ПППД изучали по следующим критериям: длительности периода полного осветления, характеру осадка и надосадочной жидкости, образованию осадка в осветлённом гидролизате после стерилизации автоклавированием, наличию осадка в приготовленных из него средах, бактериологическим показателям агаризованных питательных сред на основе полученных гидролизатов в отношении тест-штаммов *V.cholerae non O1 P-9741* и *Y.pestis EV 1290*. Результаты данного исследования представлены в таблице 11.

Полученные данные позволяют отдать приоритет методу осветления панкреатического перевара пекарских дрожжей путём отстаивания на холоде, несмотря на его значительную длительность, поскольку он позволяет получить продукт, не образующий осадка при автоклавировании и приготовлении питательных сред, а также обеспечивает более высокие значения бактериологических показателей агаризованных питательных сред на его основе.

3.8 Результаты оптимизации технологического процесса изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД)

Проведённые исследования позволили установить оптимальные параметры технологического процесса изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (Таблица 12).

Таблица 11

**Сравнительное изучение эффективности методов осветления
панкреатического перевара пекарских дрожжей**

Критерии оценки эффективности	Методы осветления	
	Центрифугирование	Отстаивание на холоде
Длительность полного осветления	20 мин	4 месяца
Характер осадка	плотный	плотный
Характер надосадочной жидкости	прозрачная	прозрачная
Образование осадка в осветлённом гидролизате после автоклавирования	образуется	отсутствует
Наличие осадка в средах, изготовленных из осветлённого гидролизата	присутствует	отсутствует
Бактериологические показатели агаризованных питательных сред, изготовленных из осветлённого гидролизата в отношении тест-штамма <i>V.cholerae non O1 / non O139 P-9741</i>	1) 10 м.к. 2) 28,2±2,6 % 3) 1,4±0,3 мм 4) типичная 5) 19,4±1,6 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 36,8±3,2 % 3) 2,9±0,3 мм 4) типичная 5) 22,1±2,4 млрд.м.к.
Бактериологические показатели агаризованных питательных сред, изготовленных из осветлённого гидролизата в отношении тест-штамма <i>Y.pestis EV 1290</i>	1) 10 м.к. 2) 49,3±3,8 % 3) 1,2±0,1 мм 4) типичная 5) 9,1±1,3 млрд.м.к.	1) 10 м.к. 2) 58,4±4,6 % 3) 1,6±0,2 мм 4) типичная 5) 14,4±1,8 млрд.м.к.

Примечание: 1) чувствительность (м.к.)
 2) показатель прорастания из 100 посеянных м.к. (%)
 3) диаметр колоний (мм)
 4) морфология колоний
 5) выход биомассы с 1 мл среды (млрд.м.к.)

Таблица 12

**Оптимальные параметры технологического процесса изготовления
панкреатического перевара пекарских дрожжей**

Наименование параметра	Оптимум
Марка прессованных пекарских дрожжей	«Особые» ТУ 9182-023-00371185-98; дрожжи Черкесского дрожжевого завода ГОСТ 171-81
Плотность суспензии прессованных пекарских дрожжей в воде очищенной	0,2 кг дрожжей / 1 кг суспензии (эквивалентная 1 кг дрожжей на 4 л воды очищенной)
Стабилизатор	Хлороформ в насыщающих концентрациях
Метод ингибирования собственных дрожжевых ферментов	Щелочение до рН выше 8,0 с помощью 20% раствора гидроокиси натрия
Ферментный препарат	Панкреатин крупного рогатого скота сухой ОСТ 49167-92
Доза ферментного препарата	0,7 г / кг дрожжей
рН гидролиза	8,3±0,2
Температура гидролиза	45±1°С
Длительность гидролиза	16,5±1,5 ч
Метод осветления гидролизата	Отстаивание на холоде при температуре 5±3°С с последующей декантацией
Метод стерилизации	Автоклавирование при 110°С 20 минут

На основании результатов проведённого исследования разработана технологическая схема изготовления панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД), включающая пять основных стадий технологического процесса:

1. Получение суспензии пекарских дрожжей;
2. Получение неосветлённого панкреатического перевара пекарских дрожжей;
3. Получение осветлённого панкреатического перевара пекарских дрожжей;
4. Получение готового целевого продукта – ПППД;

5. Фасовка, герметизация, стерилизация, этикетировка и упаковка готовой продукции.

Разработанная технологическая схема легла в основу оформленной на препарат нормативной документации I уровня: «Инструкции по изготовлению и контролю», «Инструкции по применению», рассмотренной Учёным Советом ФГУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора (Протокол № 11 от 10.11.04 г.) и утверждённой директором института (12.11.04 г.).

3.9 Характеристика конечного продукта технологического процесса – панкреатического перевара пекарских дрожжей (ППД)

3.9.1 Физико-химические показатели

- прозрачность и цветность – препарат должен быть прозрачным, коричневого или светло-коричневого цвета;

- рН – $(8,2 \pm 0,3)$;
- аминный азот - $(0,285 \pm 0,065)$ %;
- общий азот - $(0,93 \pm 0,21)$ %;
- содержание хлорида натрия - $(0,46 \pm 0,14)$ %;
- углеводы - $(0,04 \pm 0,015)$ %;
- свободный триптофан – $(0,107 \pm 0,004)$ %;
- нуклеиновые кислоты – $(0,002 \pm 0,00005)$ %

3.9.2 Биологические свойства препарата

Биологические свойства препарата определяются по совокупности биологических показателей четырёх приготовленных на его основе сред: агаризованной питательной среды для культивирования и выделения холерного вибриона, жидкой накопительной питательной среды для культивирования и выделения *V.cholerae* и бульона для культивирования холерного вибриона в отношении тест-штаммов *V.cholerae cholerae P-1 (145)*, *V.cholerae eltor M-878* и *V.cholerae non O1 / non O139 P-9741*; агаризованной

питательной среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C в отношении тест-штаммов *Y.pestis EV 1290*, *Y.pestis P-1680*, *Y.pestis И-2377*.

Агаризованная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона должна характеризоваться **чувствительностью** в отношении тест-штаммов холерного вибриона не ниже 10 м.к.; **показателем прорастания** – не менее 30 % от расчётной посевной дозы 1×10^2 м.к. при наличии единичных колоний на всех трёх чашках Петри с посевной дозой 10 м.к. (расчёт ведётся по среднему числу колоний на трёх чашках с одной посевной дозой); **диаметром колоний** на всех чашках – не менее 1,0 мм, **стабильностью основных свойств тест-штаммов** – не более двух атипичных по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным свойствам колоний на каждой чашке с посевной дозой 1×10^2 м.к.

Жидкая накопительная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона должна характеризоваться **чувствительностью** в отношении тест-штаммов *V.cholerae* не ниже 10 м.к.; **числом колоний, выросших при высеве культур после 6 ч инкубации в данной жидкой среде на агаровые пластинки** – не менее 10 - при расчётной посевной дозе 1×10^2 м.к. (разведение 10^{-6}) и не менее 1 - при расчётной посевной дозе 10 м.к. (разведение 10^{-7}), расчёт ведётся по среднему числу колоний на трёх чашках с одной посевной дозой; **стабильностью основных свойств тест-штаммов** – не более одной атипичной по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным свойствам колонии на каждой чашке из посевной дозы 1×10^2 м.к. (разведение 10^{-6}).

Жидкая питательная среда для культивирования холерного вибриона (бульон) должна характеризоваться **чувствительностью** в отношении тест-штаммов *V.cholerae* не ниже 10 м.к.; **числом колоний, выросших при высеве культур после 6 ч инкубации в данной жидкой среде на агаровые**

пластинки – не менее 10 - при расчётной посевной дозе 1×10^2 м.к. (разведение 10^{-6}) и не менее 1 - при расчётной посевной дозе 10 м.к. (разведение 10^{-7}), расчёт ведётся по среднему числу колоний на трёх чашках с одной посевной дозой; **стабильностью основных свойств тест-штаммов** – не более одной атипичной по морфологии, биохимическим, серологическим, фаголизабельным свойствам колонии на каждой чашке из посевной дозы 1×10^2 м.к. (разведение 10^{-6}).

Агаризованная питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба при 28 °С должна характеризоваться **чувствительностью** в отношении тест-штаммов чумного микроба не ниже 10 м.к.; **показателем прорастания** – не менее 50 % от расчётной посевной дозы 1×10^2 м.к. при наличии единичных колоний на всех трёх чашках Петри с посевной дозой 10 м.к. (расчёт ведётся по среднему числу колоний на трёх чашках с одной посевной дозой); **диаметром колоний** на всех чашках – не менее 1,0 мм, **типичной морфологией колоний тест-штаммов** – колонии зернистые, бугристые с кружевной периферической зоной.

ГЛАВА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ И ДРУГИХ БЕЛКОВЫХ ГИДРОЛИЗАТОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

4.1 Подбор белковых гидролизатов для сравнительной оценки с панкреатическим переваром пекарских дрожжей. Метод сравнения, критерии оценки

В качестве препаратов сравнения для оценки панкреатического перевара пекарских дрожжей как основы питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба нами были выбраны девять наиболее широко применяемых при производстве различных питательных сред в России и за рубежом белковых гидролизатов преимущественно из сырья животного происхождения: гидролизат мяса по Хоттингеру, пептон Мартена (первые два гидролизата лабораторного изготовления), пептон ферментативный (производитель - ООО НПО «Порт-Петровск», г.Курск), гидролизат казеина солянокислый (ФГУП НПО «Микроген»), гидролизат казеина панкреатический (ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г.Оболенск), гидролизат каспийской кильки панкреатический – сухой питательный бульон (ФГУП НПО «Микроген»), бакто-пептон («Becton Dickinson», США), казаминовые кислоты – сернокислый гидролизат казеина высокой степени расщепления («Becton Dickinson», США), бакто-триптон («Becton Dickinson», США). В каждом из взятых в работу белковых гидролизатов определяли показатель аминного азота методом формольного титрования согласно требованиям МУК 4.2.2316-08. Сухие гидролизаты в количестве 10,0 г предварительно растворяли в 100,0 мл воды дистиллированной.

Каждый тестируемый белковый гидролизат в количествах, создающих его концентрации в среде, эквивалентные значениям от 0,01% до 0,15% по аминному азоту с шагом 0,005%, использовали для приготовления

агаризованной питательной среды следующего состава (из расчёта на 1,0 л среды):

- тестируемый гидролизат в соответствующих вышеуказанных концентрациях;

- натрий хлористый – 5,0 г;

- агар-агар микробиологический – 12,0 г;

- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,2 \pm 0,1$.

Варианты среды, содержавшие в качестве питательных основ исследуемые белковые гидролизаты в различных концентрациях, исследовали на соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06 в отношении тест-штаммов холерного вибриона (*V.cholerae non O1/ non O139 P-9741*) и чумного микроба (*Y.pestis EV 1290*). Полное соответствие варианта среды требованиям указанного документа по всем оцениваемым биологическим показателям в отношении каждого из микроорганизмов рассматривали как «позитивный отклик». Совокупность значений концентрации гидролизата в составе варианта среды, при которых регистрировали «позитивный отклик» в отношении тест-штамма *V.cholerae* или *Y.pestis*, обозначали как «диапазон концентраций, обеспечивающих позитивный отклик». Если значения концентрации гидролизата в указанных диапазонах для каждого из микроорганизмов совпадали, то определяли «интервал универсальности» (взаимоперекрывание «диапазонов концентраций, обеспечивающих позитивный отклик» в отношении холерного вибриона и чумного микроба). Чем шире «интервал универсальности», тем больше степень соответствия исследуемого гидролизата питательным потребностям обоих микроорганизмов и лучше стандартизуемость универсальной среды на его основе. Отсутствие «интервала универсальности» свидетельствует о невозможности создания на основе такого гидролизата единой агаризованной питательной среды для микробиологической диагностики чумы и холеры.

В качестве контрольных питательных сред в настоящем исследовании были использованы: агар Хоттингера лабораторного изготовления (для культивирования и выделения чумного микроба) и агар щелочной сухой производства ФГУП НПО «Микроген», приготовленный по инструкции производителя (для культивирования и выделения холерного вибриона). Обе контрольные среды соответствовали требованиям приведённых выше МУ по результатам предварительного тестирования.

4.2 Результаты сравнительной оценки панкреатического перевара пекарских дрожжей и других белковых гидролизатов в отношении тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба

Проведённое исследование (таблица 13) показало, что девять из 10 изученных белковых гидролизатов обеспечивали соответствие приготовленных из них вариантов среды требованиям указанных МУ в отношении тест-штамма холерного вибриона. Наиболее широкий «диапазон концентраций, обеспечивающих позитивный отклик» был зарегистрирован при использовании ПППД – 12 исследованных значений концентрации гидролизата дали положительный результат. Варианты среды, приготовленные на основе казаминовых кислот, бакто-пептона, бакто-триптона и панкреатического гидролизата каспийской кильки, соответствовали требованиям приведённого выше документа в диапазонах, содержащих вдвое меньшее, чем при использовании ПППД, количество значений концентрации. «Диапазоны концентраций, обеспечивающих позитивный отклик» в отношении холерного вибриона у других исследованных гидролизатов включали от двух до пяти значений концентрации каждого из них.

Только пять из 10 гидролизатов обеспечивали соответствие приготовленных на их основе сред требованиям указанных МУ в отношении тест-штамма чумного микроба *Y.pestis EV 1290*. Как и для холерного вибриона, наиболее широкий «диапазон концентраций, обеспечивающих

Таблица 13

Сравнительная оценка различных белковых гидролизатов по критерию соответствия изготовленных из них агаризованных сред требованиям МУ 3.3.2.2124-06 в отношении холерного вибриона и чумного микроба

Наименование белкового гидролизата	«Диапазон концентраций, обеспечивающих позитивный отклик» в отношении тест-штамма холерного вибриона, % (по аминному азоту)	«Диапазон концентраций, обеспечивающих позитивный отклик» в отношении тест-штамма чумного микроба, % (по аминному азоту)	«Интервал универсальности», % (по аминному азоту)
ПППД	0,015-0,070	0,030-0,130	0,03-0,07
Гидролизат мяса по Хоттингеру	0,035-0,040	0,090-0,140	отсутствует
Пептон Мартена	0,050-0,060	нет позитивного отклика	отсутствует
Пептон ферментативный	0,045-0,050	нет позитивного отклика	отсутствует
Гидролизат казеина солянокислый	нет позитивного отклика	нет позитивного отклика	отсутствует
Гидролизат казеина панкреатический	0,060-0,080	0,075-0,110	0,075-0,080
Казаминовые кислоты	0,030-0,055	нет позитивного отклика	отсутствует
Бакто-пептон	0,035-0,060	нет позитивного отклика	отсутствует
Бакто-триптон	0,040-0,065	0,045-0,11	0,045-0,065
Гидролизат каспийской кильки панкреатический	0,045-0,070	0,065-0,080	0,065-0,070

позитивный отклик» в отношении тест-штамма чумного микроба был зафиксирован в случае применения ПППД. Он включал 21 значение концентрации данного гидролизата (от 0,03 до 0,13% с шагом в 0,005% по аминному азоту), в то время как у бакто-триптона аналогичный диапазон содержал 14 значений, у гидролизата мяса по Хоттингеру – 11, гидролизата казеина панкреатического – восемь, гидролизата каспийской кильки – четыре значения.

В исследованном диапазоне концентраций гидролизат казеина солянокислый в составе агаризованной среды не обеспечивал соответствия последней требованиям указанных выше МУ как в отношении холерного вибриона, так и чумного микроба. Следовательно, данный гидролизат не может быть использован в качестве самостоятельной основы агаризованных сред для диагностики чумы и холеры, а только в сочетании с каким-либо стимулятором роста (мясной водой, дрожжевым экстрактом).

Проведённое исследование выявило интересный факт. Если при конструировании агаризованных сред для культивирования и выделения холерного вибриона в качестве их питательной моноосновы может быть с различной степенью эффективности использован любой из протестированных белковых гидролизатов (кроме солянокислого гидролизата казеина), то при создании сред для чумного микроба перспективны только гидролизаты, полученные путём панкреатического ферментолиза исходного сырья (мяса, казеина, дрожжей).

4.3 Анализ результатов сравнительного тестирования панкреатического перевара пекарских дрожжей и других белковых гидролизатов в аспекте создания на их основе универсальной питательной среды для холерного вибриона и чумного микроба

Существование проблемы разработки единой базовой агаризованной среды для холерного вибриона и чумного микроба обусловлено отсутствием в настоящее время научно обоснованной возможности использования какого-

либо из существующих белковых гидролизатов в качестве универсальной основы такой среды, в равной мере обеспечивающей питательные потребности обоих микроорганизмов. Кроме того, рекомендованные действующими практическими руководствами [170] и используемые в микробиологической практике специализированные для каждого из этих возбудителей агаризованные питательные среды (агар Хоттингера – для чумного микроба и щелочной агар – для холерного вибриона) содержат в качестве основ гидролизаты белков животного происхождения (мяса, казеина). Это существенно увеличивает стоимость таких сред, создаёт трудности при их стандартизации (из-за нестандартности используемого сырья), может быть причиной невоспроизводимости полученных при их использовании результатов.

Одним из рациональных подходов к решению обозначенной проблемы нам представлялась оценка возможности использования ПППД в качестве универсальной питательной основы среды для культивирования и выделения как холерного вибриона, так и чумного микроба.

Анализ результатов проведённых экспериментов (таблица 13) показал, что среди исследованных препаратов наличие «интервала универсальности» было зарегистрировано только у четырёх: ПППД, бакто-триптона, панкреатического гидролизата каспийской кильки (сухого питательного бульона) и панкреатического гидролизата казеина. Однако, установленная величина этого интервала для панкреатических гидролизатов казеина и каспийской кильки (сухого питательного бульона) оказалась мала и соизмерима с шагом приращения концентрации гидролизата. В данном случае при изготовлении унифицированной питательной среды из различных серий указанных гидролизатов (с отличающимися от тестируемых серий показателями общего и аминного азота) отсутствует необходимый «запас прочности» для оптимизации каждой серии среды по содержанию питательной основы. Это лимитирует возможность использования данных гидролизатов при конструировании универсальной среды.

Наибольшая величина «интервала универсальности» была зарегистрирована у ПППД – девять значений концентрации гидролизата (от 0,03 до 0,07% по аминному азоту). Это позволяет с достаточным «запасом прочности» применять ПППД в качестве моноосновы универсальной среды для диагностики чумы и холеры. При этом по основным биологическим показателям в отношении тест-штаммов чумного микроба и холерного вибриона такая среда не уступает специализированным для данных микроорганизмов средам.

Бакто-триптон также может быть успешно применён при конструировании унифицированной питательной среды для диагностики чумы и холеры, хотя по величине «интервала универсальности» уступает ПППД и является значительно более дорогим продуктом.

В случае использования созданной на основе ПППД или бакто-триптона универсальной агаризованной среды с целью выделения холерного вибриона из любого исследуемого материала для придания определённых элективных свойств такой среде её целесообразно предварительно подщелочить до pH 7,8–8,2.

Таким образом, разработанный нами белковый гидролизат – ПППД является наиболее эффективным и экономически выгодным среди протестированных в ходе настоящей работы отечественных и зарубежных аналогов в аспекте создания на его основе как отдельных агаризованных сред для возбудителей чумы и холеры, так и универсальной питательной среды для обоих микроорганизмов.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ НА ОСНОВЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ АГАРИЗОВАННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЧУМНОГО МИКРОБА ПРИ 28°C И 37°C

5.1 Агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C

5.1.1 Состав разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C

В результате проведенных исследований по подбору ингредиентов и оптимизации их концентраций был сформирован состав агаризованной питательной среды на основе ПППД для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C:

- ПППД – 0,08% по аминному азоту;
- натрий хлористый – 3,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 5,0 г;
- агар микробиологический – 14,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,2 \pm 0,1$.

5.1.2 Сравнительное изучение разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C и контрольных сред по основным биологическим показателям

Для проведения лабораторных испытаний разработанной агаризованной питательной среды на основе ПППД для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C с оценкой её основных биологических

показателей (чувствительности, показателя прорастания, диаметра и морфологии колоний, выхода биомассы с единицы объёма среды) в сравнении с контрольными средами были использованы 11 штаммов *Y.pestis* из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, отличающиеся по вирулентности, из различных природных очагов: в том числе, четыре вакцинных – *EV 1290* (место выделения – Мадагаскар), *1* (Туркмения), *17* (Россия, г. Чита), *Otten* (Китай); три авирулентных – *P-1680* (Закавказский горный очаг), *И-2377* (Россия, Горно-Алтайская область), *P-146* (Россия, Астраханская область); один слабовирулентный – *21КБ* (Россия, Кабардино-Балкария); три вирулентных – *И-2442* (Россия, Тува), *231* (Киргизия), *753* (Туркмения).

В настоящем исследовании средами сравнения являлись: питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба сухая (ЧПС) производства ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) п. Оболенск Московской области, приготовленная по инструкции производителя, и традиционный агар Хоттингера.

Подготовку культур, их посев на опытную и контрольные среды проводили в соответствии с требованиями МУ 3.3.2.2124-06 [144]. Культивирование посевов осуществляли при 28°C, учёт результатов – через 48 часов.

Анализ результатов сравнительного изучения основных биологических показателей разработанной на основе ПППД питательной среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C и контрольных сред (Таблица 14) свидетельствует, что опытная среда по всем изученным показателям не уступала контрольной среде ЧПС (ФБУН ГНЦ ПМБ) в отношении каждого из взятых в исследование штаммов и полностью соответствовала требованиям МУ 3.3.2.2124-06 [144]. Вместе с тем, по

Таблица 14

Сравнительная оценка опытной среды на основе ПППД для культивирования чумного микроба при 28°C и контрольных сред ЧПС (ФБУЗ ГНЦ ПМБ) и агара Хоттингера по основным биологическим показателям*

Питательные среды	EV 1290	Штаммы чумного микроба										
		1	17	Otten	P-1680	И-2377	P-146	21КБ	И-2442	231	753	
Чувствительность, м.к.												
Опытная среда	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
ЧПС	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
Агар Хоттингера	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	100,0	100,0	100,0	10,0
Показатель прорастания, % (M±m)												
Опытная среда	62,5±3,6	59,4±6,6	61,6±5,2	58,5±5,6	51,5±3,1	52,7±4,6	55,7±5,5	48,8±2,7	52,0±5,1	48,0±5,4	53,6±4,2	
ЧПС	60,4±5,0	61,1±7,4	62,1±4,6	59,4±6,3	54,7±6,2	54,0±6,2	60,7±6,2	46,4±5,1	55,3±6,0	46,3±4,1	52,4±4,0	
Агар Хоттингера	57,8±6,3	56,3±5,4	58,2±4,7	54,2±6,7	50,8±5,1	51,9±3,2	54,4±5,8	4,7±0,5	6,8±0,5	5,2±0,6	38,3±3,2	
Диаметр колоний через 48 часов, мм (M±m)												
Опытная среда	1,5±0,2	1,6±0,1	1,4±0,1	1,3±0,2	1,2±0,1	1,4±0,2	1,4±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1	1,2±0,1	1,2±0,1	1,2±0,2
ЧПС	1,4±0,2	1,6±0,2	1,5±0,1	1,4±0,1	1,2±0,1	1,5±0,1	1,3±0,2	1,2±0,1	1,2±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1	1,1±0,1
Агар Хоттингера	1,2±0,1	1,3±0,1	1,1±0,1	1,2±0,2	1,1±0,1	1,3±0,1	1,1±0,1	0,8±0,1	0,7 ±0,1	0,9±0,1	1,0±0,1	
Выход биомассы с 1 мл среды, млрд. м.к. (M±m)												
Опытная среда	18,8±1,6	16,2±2,1	19,1±2,3	16,4 ±1,8	11,2±1,6	17,8±2,5	15,2±2,6	9,9±1,3	10,1±1,9	9,1±1,2	12,7±2,1	
ЧПС	19,2±1,8	17,6±1,4	18,4±1,2	15,0±2,0	12,1±1,9	16,5±1,7	16,3±2,8	10,2±1,2	9,3±1,5	10,7±1,3	11,9±1,6	
Агар Хоттингера	13,5±2,1	12,8±1,6	13,3±1,4	12,5±1,3	9,5±1,2	11,7±1,9	10,9±0,4	6,6±0,8	5,6±0,7	6,2±0,9	8,1±1,4	
Морфология колоний												
Опытная среда	типичная*	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная
ЧПС	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная
Агар Хоттингера	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная	типичная

* Примечание: колонии зернистые, пигментированные, бугристые с «кружевной» периферической зоной.

показателям чувствительности и прорастания опытная среда на порядок превосходила традиционный агар Хоттингера в отношении слабовирулентного штамма *Y.pestis 21 КБ* и двух вирулентных штаммов *Y.pestis И-2442* и *231*.

Таким образом, на основании результатов проведённых лабораторных испытаний, можно сделать заключение, что разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 28°C может являться полноценной альтернативой используемым в лабораторной практике питательным средам: ЧПС (ФБУН ГНЦ ПМБ) и агару Хоттингера. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что сконструированная на основе ПППД среда удовлетворяет питательным потребностям штаммов чумного микроба, изолированных из различных природных очагов, и отличающихся друг от друга по вирулентности.

5.2 Агаризованная питательная среда основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для культивирования чумного микроба при 37°C

5.2.1 Теоретическое и практическое обоснование необходимости и возможности создания на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C

Оптимальной температурой для роста и размножения *Y. pestis* является 28°C, поэтому чумные бактерии на искусственных питательных средах выращивают преимущественно при этой температуре. Такой подход оправдан при выделении возбудителя чумы из объектов окружающей среды, так как в этом случае определяющими являются сроки появления на питательных средах видимого роста *Y.pestis* и специфическая, характерная только для данной температуры культивирования, морфология колоний чумного микроба. Однако, по мнению ряда авторов [190, 191, 377] культивирование возбудителя чумы при 37°C – температуре тела

теплокровных животных и человека, способствует формированию его фенотипа, близкого к таковому при инфекционном процессе в восприимчивом к чуме макроорганизме. Эта точка зрения подтверждается многочисленными исследованиями, показавшими, что при выращивании *Y.pestis* в условиях 37°C происходит резкое увеличение продукции капсульного антигена (фракции I) [61], повышается синтез V и W антигенов [148, 379], пилей адгезии [65], нейраминидазная активность [54], устойчивость к поглощению макрофагами [256]. Кроме того, современные чумные иммуноглобулиновые диагностикумы направлены, преимущественно, на выявление капсульного антигена (фракции I) *Y.pestis*, оптимальной температурой синтеза которого является именно 37°C. Отсутствие доступных коммерческих и экспериментальных питательных сред для этой температуры культивирования ограничивает возможность применения для идентификации выделенных культур чумного микроба метода флюоресцирующих антител (МФА), реакции агломерации объёмной (РАО), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

Представленные в главе 4 и разделе 5.1 настоящей главы результаты проведённых исследований свидетельствуют об эффективном применении ПППД в качестве питательной основы среды для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C, а также основы универсальной среды, обеспечивающей в широком диапазоне концентраций питательные потребности как чумного микроба, так и холерного вибриона. Изложенные обстоятельства послужили аргументированной предпосылкой для проведения следующей серии экспериментов по конструированию агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C, которая отличается от предложенных ранее сред аналогичного назначения тем, что в качестве её питательной основы используют только один компонент – ПППД, в то время как при конструировании других питательных сред для данной температуры культивирования *Y.pestis* применяли различные комбинации белковых гидролизатов (например,

триптического перевара мяса по Хоттингеру и гидролизата казеина). Кроме того, конструируемая среда за счёт использования ПППД в качестве моноосновы характеризуется значительно более низкой по сравнению с существующими аналогами себестоимостью и простой технологией изготовления.

5.2.2 Состав разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C

Сконструированная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C согласно результатов проведённого подбора ингредиентов и их количественной оптимизации имела следующий состав:

- ПППД – 0,13 % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- магний сернокислый 7-водный – 0,6 г;
- железо (II) сернокислое 7-водное – 0,01 г;
- натрий сернистокислый безводный – 0,6 г;
- кальций хлористый 6-водный – 0,3 г;
- D-маннит – 1,0 г;
- агар микробиологический – 13,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л; рН среды – $7,1 \pm 0,1$.

5.2.3 Сравнительное изучение разработанной на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C и контрольных сред по основным биологическим показателям

Целями настоящего раздела исследования явились: лабораторные испытания разработанной агаризованной питательной среды на основе ПППД для культивирования чумного микроба при 37°C с оценкой её

основных биологических показателей (чувствительности, показателя прорастания, скорости роста, диаметра колоний, выхода биомассы с единицы объёма среды, продукции капсульного антигена – фракции I) в сравнении с контрольными средами ДК-37, ЛХАТ, СО, LB и агаром Хоттингера в отношении 10 штаммов *Y.pestis* из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, отличающихся по вирулентности, из различных природных очагов: в том числе, четырёх вакцинных – *EV 1290* (место выделения – Мадагаскар), *I* (Туркмения), *17* (Россия, г.Чита), *Otten* (Китай); двух авирулентных – *I-2377* (Россия, Горно-Алтайская область), *P-146* (Россия, Астраханская область); одного слабовирулентного – *21КБ* (Россия, Кабардино-Балкария); трёх вирулентных – *I-2442* (Россия, Тува), *231* (Киргизия), *753* (Туркмения).

Следует отметить, что зарегистрированных в установленном порядке питательных сред для культивирования чумного микроба при 37°C в настоящее время не существует, в связи с чем в качестве контрольных питательных сред в исследовании были использованы предложенные в различные годы экспериментальные питательные среды лабораторного изготовления: ДК-37 (дрожжевая казеиновая питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C), СО (питательная среда на основе аутолизата селезёнки и гидролизата белка отрубей), ЛХАТ (питательная среда на трёхкомпонентной основе, включающей триптический гидролизат мяса по Хоттингеру, сернокислый гидролизат казеина и экстракт кормовых дрожжей; аббревиатура соответствует названию лаборатории, в которой была разработана данная среда – лаборатории химии антигенов и токсинов), LB (питательная среда на основе панкреатического гидролизата казеина – триптона и экстракта аутолизированных дрожжей). Наряду с указанными средами в качестве контрольной среды был также использован традиционный агар Хоттингера. Обращает на себя внимание тот факт, что из всех вышеупомянутых сред только опытная среда и агар Хоттингера являются монокомпонентными по питательной основе – содержат в своём

составе только один белковый гидролизат: ПППД или триптический гидролизат мяса соответственно.

Подготовку культур, их посев на опытную и контрольные среды проводили в соответствии с требованиями МУ 3.3.2.2124-06 [144]. Культивирование посевов осуществляли при 37°C, учёт результатов – через 24, 48 и 72 часа.

Анализ результатов сравнительного изучения основных биологических показателей разработанной на основе ПППД питательной среды и контрольных сред, полученных при проведении лабораторных испытаний (Таблица 15), свидетельствует, что опытная среда характеризовалась чувствительностью 10 м.к. в отношении шести из 10 изученных штаммов, в то время как контрольные среды ЛХАТ и ДК-37 – только четырёх, а СО и LB – трёх из 10 культур. Наименьшей чувствительностью в отношении всех использованных штаммов чумного микроба при температуре культивирования 37°C характеризовался агар Хоттингера: рост в виде единичных колоний был зарегистрирован только из посевных доз 100 м.к. и выше. Чувствительность опытной среды и лучших среди контрольных сред - ЛХАТ и ДК-37 в отношении четырёх использованных в исследовании вакцинных и двух авирулентных штаммов *Y.pestis* была идентичной и составила 10 м.к. (для вакцинных штаммов) и 100 м.к. (для авирулентных). Вместе с тем, по данному показателю в отношении слабовирулентного штамма *Y.pestis 21 КБ* и вирулентного *Y.pestis 753* разработанная среда на порядок превосходила контрольные среды ЛХАТ и ДК-37 и на два-три порядка – среды СО, LB и агар Хоттингера.

Показатель прорастания опытной среды достоверно превосходил таковой контрольных сред ЛХАТ и ДК-37 в отношении девяти из 10, а контрольных сред СО и LB - всех взятых в работу штаммов чумного микроба. Самые низкие значения данного показателя были зарегистрированы на агаре Хоттингера, где из посевной дозы 100 м.к. выросли только три штамма из 10 использованных в исследовании.

Таблица 15 (продолжение)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Выход биомассы с 1 мл среды, млрд. м.к. (M±m)										
Опытная среда	14,8±2,2	18,1±2,1	16,7 ±1,9	12,4±1,2	7,3±0,5	6,8±0,4	4,7±0,2	13,1±1,7	6,1±0,8	8,3±1,2
ЛХАТ	7,0±1,1	8,6±0,9	8,0±1,0	5,9±0,7	3,5±0,7	3,2±0,3	2,2±0,2	6,2±0,8	2,9±0,4	3,9±0,5
ДК-37	4,5±0,6	5,5±0,7	5,0±0,9	3,8±1,1	2,2±0,2	2,0±0,4	1,4±0,2	4,0±0,8	1,8±0,2	2,5±0,4
СО	3,1±0,5	5,5±0,9	3,5±0,4	2,6±0,3	1,6±0,3	1,4±0,2	1,0±0,2	2,7±0,4	1,3±0,4	1,7±0,2
LB	2,7±0,5	3,4±0,5	3,1 ±0,4	2,3±0,3	1,4±0,2	1,3±0,2	0,9±0,1	2,4 ±0,4	1,1±0,1	1,5±0,2
Агар Хоттингера	1,8±0,3	2,3±0,4	2,1±0,3	1,5±0,2	0,9±0,1	0,8±0,1	0,6±0,1	1,6±0,2	0,7±0,1	1,0±0,2

По скорости роста использованных штаммов *Y.pestis* в условиях 37°C разработанная на основе ПППД среда превосходила все использованные в исследовании контрольные среды. Так, при посевной дозе 100 м.к. на опытной среде уже через 48 ч формировались колонии чумного микроба диаметром 0,3-0,8 мм, которые можно было идентифицировать методами МФА и РАО, на контрольной среде ЛХАТ диаметр колоний к этому сроку не превышал 0,4 мм, а на остальных контрольных средах через данный промежуток времени от начала культивирования видимого роста штаммов не было.

Через 72 ч культивирования при 37°C диаметр колоний шести из 10 штаммов *Y.pestis* на опытной среде превосходил аналогичный показатель контрольных сред не менее чем в 1,4 раза. На агаре Хоттингера из посевной дозы 100 м.к. при данной температуре культивирования через 72 часа выросли только три вакцинных штамма чумного микроба, а диаметр их колоний не превышал 0,7 мм.

По показателю выхода биомассы с единицы объёма среды (среднему для всех взятых в исследование штаммов) разработанная питательная среда на основе ПППД для культивирования чумного микроба при 37°C превосходила контрольные среды: ЛХАТ – в 2,1 раза; ДК-37 – в 3,3 раза; СО – в 4,8 раза; LB – в 5,4 раза; агар Хоттингера – в 8,1 раз.

Было также установлено, что культуры чумного микроба (кроме FraГ штамма *Y.pestis Otten*), выращенные на опытной среде характеризовались более высокими титрами капсульного антигена (фракции I) в серологических тестах РАО и РНГА по сравнению с культурами, полученными на всех контрольных средах.

Таким образом, на основании результатов проведённых лабораторных испытаний, можно сделать заключение, что разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C по всем изученным биологическим показателям превосходит все использованные контрольные среды.

Разработанная агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C запатентована как составляющая способа определения заражённости продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях ЧС [243].

5.3 Апробация разработанных на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей питательных сред для чумного микроба в ходе тактико-специального учения СПЭБ

С нашей точки зрения, важным слагаемым успешной подготовки специалистов СПЭБ, способствующим повышению эффективности их последующей работы в зонах ЧС, является использование на всех этапах обучения новых диагностических препаратов и питательных сред, которые в перспективе могут стать ключевыми составляющими мобилизационного резерва бригад.

Целью настоящего исследования явилась оценка эффективности разработанных на основе ПППД питательных сред для диагностики чумы на ключевом этапе подготовки специалистов СПЭБ к работе в условиях ЧС - в ходе тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ по проведению специфической индикации патогенных биологических агентов (ПБА).

В ТСУ были апробированы разработанные на основе ПППД питательные среды:

- агаризованная питательная среда для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C;
- агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C.

В качестве контрольной среды для культивирования и выделения чумного микроба при проведении тактико-специального учения был использован рекомендованный действующими практическими руководствами по лабораторной диагностике опасных инфекционных

болезней и специфической индикации ПБА [170, 280] традиционный агар Хоттингера.

При подготовке ТСУ СПЭБ, проведённого в период с 27 по 31 июля 2009 года, специалистами нашего института была разработана оригинальная легенда о применении ПБА в качестве оружия массового поражения на территории мегаполиса. После получения донесения об обнаружении осколков контейнера и взрывного устройства, а также признаков возможного применения ПБА (облака белого цвета, порошка на листьях, стене здания) был введён в действие режим ЧС, реализованы схемы оповещения и сбора личного состава СПЭБ и осуществлена мобилизация бригады с целью проведения специфической индикации ПБА. На этапе биологической разведки были отобраны пробы материала, подозрительного на наличие ПБА. Среди отобранных проб наиболее эпидемиологически значимыми были определены: проба № 1 (воздух из зоны обнаружения осколков контейнера и взрывного устройства), пробы № 2 и № 3 (реальные мазки из зева людей, находившихся, согласно легенде, в очаге вероятного биологического заражения). Отобранные пробы № 1 и № 2 были дополнительно искусственно контаминированы вакцинным штаммом *Y. pestis EV 1290* до конечной концентрации чумного микроба 10^7 и 10^4 микробных клеток (м.к.) в 1,0 мл пробы соответственно.

Поступившие пробы исследовали в развёрнутых пневмокаркасных модулях (индикационной лаборатории и лаборатории особо-опасных инфекций) в автономном режиме функционирования согласно схеме специфической индикации и идентификации ПБА с использованием всех рекомендованных методов исследования. При этом наряду с традиционными диагностическими препаратами в ходе ТСУ для идентификации выделенных культур были использованы: разработанный в Ростовском-на-Дону противочумном институте полимерный чумной диагностикум для реакции агломерации объёмной (РАО) и видоспецифические в отношении *Y.pestis* праймеры vlm12for и ISrev216 [469], предложенные специалистами нашего

института для ПЦР-идентификации типичных и атипичных штаммов возбудителя чумы [310].

В ходе проведённого ТСУ (Таблица 16) чумной микроб был обнаружен в пробе № 1 при культивировании посевов нативного материала в условиях 28°C как на опытной агаризованной питательной среде на основе ПППД для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C, так и на контрольном агаре Хоттингера уже через 24 часа. Однако, наличие интенсивного специфического свечения при постановке метода флюоресцирующих антител (МФА), а также положительные результаты в РАО и РНГА (реакция непрямой гемагглютинации) были зарегистрированы только с культурой, изолированной на опытной агаризованной питательной среде на основе ПППД для культивирования чумного микроба при 37°C. Инкубирование посевов нативного материала пробы № 1 в условиях 37°C позволило выделить культуру *Y.pestis* на опытной среде (для 37°C) через 48 часов, а на агаре Хоттингера – только через 72 часа. Положительный результат всех вышеуказанных серологических тестов идентификации был получен при исследовании культуры, выделенной на опытной среде (для 37°C), в то время как у изолированной на агаре Хоттингера при 37°C культуры чумного микроба отмечалось лишь слабое свечение при постановке МФА.

Из пробы № 2, в которой концентрация возбудителя (10^4 м.к./мл) была ниже, чем в пробе № 1 (10^7 м.к./мл), культура чумного микроба была выявлена через 48 часов только на обеих опытных средах (как для 28°C, так и для 37°C) при соответствующих температурах культивирования. При использовании контрольного агара Хоттингера возбудитель чумы в пробе № 2 не был обнаружен.

Изолированные на опытных средах на основе ПППД из проб № 1 и № 2 культуры чумного микроба наряду с серологическими тестами были также идентифицированы методом ПЦР с помощью видоспецифических праймеров

Таблица 16

Результаты апробации разработанных на основе ПППД агаризованных питательных сред для чумного микроба в ходе ТСУ СПЭБ

№ п / п	Критерий оценки	Агаризованная питательная среда на основе ПППД для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C (опытная)	Агаризованная питательная среда на основе ПППД для культивирования чумного микроба при 37°C (опытная)	Агар Хоттингера (контрольная)	
		28°C	37°C	28°C	37°C
1	2	3	4	5	6
1	Время выделения культуры <i>Y.pestis</i> из пробы № 1 (концентрация возбудителя 10 ⁷ м.к./мл), ч	24	48	24	72
2	Время выделения культуры <i>Y.pestis</i> из пробы № 2 (концентрация возбудителя 10 ⁴ м.к./мл), ч	48	48	не выделена	не выделена
3	Результаты идентификации выделенных культур <i>Y.pestis</i> методами:				
	- МФА	+	+	-*	±*
	- РАО	+	+	-*	-*
	- РНГА	+	+	-*	-*
	- ПЦР с праймерами vlm12for и ISrev216	+	+	+	+

* данные только для культуры *Y.pestis*, выделенной из пробы № 1, так как культура из пробы № 2 на контрольной среде не была изолирована.

vIm12for и Psrev216. Данная пара праймеров, как показали результаты настоящего учения, может быть эффективно использована не только для идентификации выделенных культур, но и для детекции возбудителя чумы в нативном материале.

Таким образом, впервые в ходе ТСУ СПЭБ наряду с традиционным агаром Хоттингера, применяемым для специфической индикации ПБА, были успешно использованы разработанные нами новые агаризованные питательные среды на основе ПППД для чумного микроба. Об эффективности сконструированных сред свидетельствует выделение с их помощью культуры чумного микроба из обеих проб с разной степенью их контаминации вакцинным штаммом *Y.pestis EV 1290* при двух температурах инкубации посевов - 28°C и 37°C, в то время как на контрольном агаре Хоттингера возбудитель чумы был изолирован только из пробы № 1 с более высокой концентрацией чумного микроба (при 37°C - в более поздние, чем на опытной среде, сроки). Культуры, изолированные на разработанной агаризованной питательной среде для культивирования чумного микроба при 37 °C в ходе тактико-специального учения, характеризовались более высоким уровнем продукции капсульного антигена (фракции I), чем выделенные на контрольном агаре Хоттингера. Это было подтверждено результатами вышеуказанных серологических тестов.

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ КОМПЛЕКСА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ, ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА НА ОСНОВЕ ПАНКРЕАТИЧЕСКОГО ПЕРЕВАРА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ

6.1 Теоретическое и практическое обоснование необходимости и возможности создания на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона

В разные годы неоднократно предпринимались попытки улучшения ростовых качеств жидких и плотных питательных сред для холерного вибриона путём добавления к традиционной мясо-пептонной или казеиновой основе 0,5% глицерина [66], пшеничного экстракта [7], дрожжевого аутолизата [336], гемоэритрина [54].

Одним из ключевых звеньев в схеме бактериологической диагностики холеры являются среды накопления [208]. Наряду с традиционными – основным раствором пептона и 1% пептонной водой ранее были предложены альтернативные среды накопления на основе панкреатических и солянокислых гидролизатов казеина [236, 449], ферментализатов сои [254], кукурузного экстракта [208], кормовых углеводородных дрожжей [128, 208], бульонных кубиков «Maggi» [97]. Однако, в настоящее время, в лабораторной практике из всего вышеприведенного арсенала питательных сред используется только две накопительных среды - пептон основной и 1% пептонная вода различных производителей.

Жидкие среды накопления применяют в комплексе со щелочными агаризованными питательными средами: щелочным мясо-пептонным агаром рН 7,6-8,3; щелочным агаром Мартена рН 7,6-7,8 [5, 169, 208]; щелочными агарами на основе ферментативного мясного пептона [15] и экстракта кормовых дрожжей, гидролизата казеина [231].

Изучение различных свойств холерного вибриона, а также получение препаратов ряда его антигенов и токсинов (в том числе – гемолизина, холерного энтеротоксина, дермонекротического фактора, геморрагического фактора) требует использования особых жидких питательных сред, включающих в себя богатый питательный субстрат и совокупность ряда стимуляторов роста (источников витаминов группы В, пуриновых и пиримидиновых оснований) – бульонов. Кроме классических – мясо-пептонного бульона, бульонов Мартена и Хоттингера, были предложены другие жидкие питательные среды аналогичного назначения на основе ферментативных пептонов (2%, 3% и 5% пептонная вода) [383, 397, 489], сернокислых гидролизатов казеина высокой степени расщепления (казаминовых кислот) [411, 412, 452], комбинации казаминовых кислот с дрожжевым экстрактом [489, 490], бактопептона с дрожжевым экстрактом [434], гидролизатов казеина и шрота семян подсолнечника [2], а также различные полусинтетические [411] и синтетические среды [233, 385, 386].

В составе вышеуказанных жидких и плотных питательных сред для культивирования, выделения и изучения свойств *V.cholerae* - традиционное дорогостоящее сырье животного и растительного происхождения (мясо, субпродукты, казеин, соя, подсолнечник и т.д.). Данные виды исходного сырья имеют различное качество, в ряде случаев содержат балластные примеси, характеризуются сложностью и трудоемкостью технологического процесса переработки и изготовления из них пептонов и триптонов, среды на их основе достаточно сложно стандартизуемы и не всегда удовлетворяют поставленным целям их применения.

Используемые в практике мясные и казеиновые основы питательных сред для идентификации холерного вибриона по признакам ферментации углеводов, многоатомных спиртов и аминокислот характеризуются, с одной стороны, дороговизной, с другой - повышенными требованиями к содержанию в них углеводов (данный показатель не должен превышать значения 0,06%, чтобы не происходило существенного закисления среды и

изменения цвета индикатора вследствие ферментации сахаров самой питательной основы культивируемыми микроорганизмами). В связи с вышеизложенным, актуальной представляется проблема разработки питательных сред для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации углеводов и аминокислот на основе с низкой концентрацией углеводов из доступного и недорогого сырья.

В связи с резким сокращением производства кормовых углеводородных дрожжей применение щелочных агаров и накопительных сред для культивирования и выделения холерного вибриона на их основе [210] значительно уменьшено.

Использование стандартных синтетических питательных сред с известным химическим составом ограничено, с одной стороны, высокой стоимостью составляющих их ингредиентов (аминокислот, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, витаминов), с другой – особенностями питательных потребностей различных штаммов *V.cholerae* [233].

В связи с вышеизложенным, актуальной представляется проблема поиска доступного экономически выгодного сырья и создания из него недорогих питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона, не уступающих по качеству используемым в практике.

Принимая во внимание, что разработанный нами белковый гидролизат ПППД в составе сред для культивирования *V.cholerae* по своим биологическим показателям превосходит используемые в практике казеиновые гидролизаты и не уступает мясным ферментативным пептонам, существенно дешевле последних, характеризуется стабильностью биохимических и серологических свойств культур при пассажах через содержащие его среды, а также низким содержанием углеводов - $(0,04 \pm 0,015)$ %, представляется перспективным создание на его основе комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона.

6.2 Щелочной агар на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей

Среди 16 наименований питательных сред, необходимых для проведения лабораторной диагностики холеры, наиболее высока количественная потребность в щелочном агаре [5]. Так, для обеспечения работы СПЭБ по локализации и ликвидации эпидемического очага холеры в течение двух месяцев (при исследовании, в среднем, 500 проб в сутки) согласно регламентированной схеме по выделению и идентификации *Vibrio cholerae* [169] требуется 4320 л готового щелочного агара. Используемые в микробиологической практике щелочные агары содержат в качестве питательных основ трудно поддающиеся стандартизации и дорогостоящие гидролизаты белков животного происхождения (мяса, субпродуктов, казеина). Это существенно увеличивает себестоимость анализа по исследованию материала, подозрительного на наличие холерного вибриона, и требует дополнительной оптимизации (по содержанию соответствующего белкового гидролизата в готовой среде) каждой серии щелочного агара в процессе её изготовления.

В ходе проведенных исследований был сконструирован щелочной агар, в котором в качестве питательной моноосновы впервые использован препарат ПППД. Данная среда имеет следующий состав: (из расчёта на 1,0 л среды):

- ПППД – 0,05 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 4,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 6,0 г;
- агар-агар микробиологический – 12,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

В качестве контрольной коммерческой среды в экспериментах был использован агар щелочной сухой производства ФГУП НПО «Микроген»,

приготовленный по инструкции производителя, заранее отконтролированный и соответствующий требованиям МУ 3.3.2.2124-06 [144].

Подготовку коллекционных штаммов *V.cholerae* и их посев на опытную и контрольную среды осуществляли в соответствии с требованиями МУ 3.3.2.2124-06 [144]. Культивирование штаммов проводили при 37°C. Учёт результатов – через 12 ч. Согласно предписаниям вышеприведённых методических указаний оценивали следующие биологические показатели сред: чувствительность, показатель прорастания, диаметр и морфологию колоний.

Анализ результатов сравнительного изучения опытной (щелочной агар на основе ПППД) и контрольной (агар щелочной сухой производства ФГУП НПО «Микроген», приготовленный по инструкции производителя) питательных сред по основным биологическим показателям (Таблица 17) свидетельствует о том, что опытная среда достоверно превосходила контрольную по показателю прорастания и диаметру колоний в отношении группы из четырёх штаммов *V.cholerae classical O1*.

Наиболее выраженные преимущества разработанной питательной среды (щелочного агара на основе ПППД) перед контрольной были зарегистрированы в отношении группы из восьми штаммов *V.cholerae O139* как по чувствительности, которая более чем на порядок превышала аналогичный показатель контрольной среды, так и по показателям прорастания и диаметра колоний. Эти преимущества новой питательной среды приобретают особую значимость в связи с эпидемической опасностью штаммов холерного вибриона серовара O139 «Бенгал» и высокой частотой их обнаружения в последние десятилетия.

Результаты использования группы из 11 штаммов *V.cholerae eltor* для оценки биологических показателей изучаемых сред свидетельствуют, что на опытной среде среднее значение диаметра колоний данных культур было в

Таблица 17

Результаты сравнительного изучения опытной и контрольной агаризованных сред по их основным биологическим показателям

Группа штаммов	Чувствительность, м.к. (M±m)		Показатель прорастания, % (M±m)		Диаметр колоний, мм (M±m)		Морфология колоний	
	опытная среда	контрольная среда	опытная среда	контрольная среда	опытная среда	контрольная среда	опытная среда	контрольная среда
<i>V.cholerae classical O1</i> 4 штамма	10,0±0,0	32,5±22,5	36,5±1,6	20,6±1,8	2,2±0,2	1,6±0,1	типичная ¹	типичная
<i>V.cholerae El Tor O1</i> 11 штаммов	10,0±0,0	10,0±0,0	36,3±3,4	31,2±2,9	2,8±0,3	1,8±0,1	типичная	типичная
<i>V.cholerae O139</i> 8 штаммов	10,0±0,0	426,3±168,3	29,6±2,5	4,9±0,3	2,4±0,2	1,0±0,1	типичная	типичная
<i>V.cholerae non O1/ non O139</i> 5 штаммов	10,0±0,0	10,0±0,0	36,1±3,4	34,3±2,8	2,4±0,3	2,1±0,2	типичная	типичная

¹Колонии гладкие, блестящие, прозрачные или полупрозрачные, голубоватые, с ровными краями

1,55 раз выше, чем на контрольной среде при практически идентичных остальных показателях.

Полученные значения изученных биологических показателей сконструированной агаризованной питательной среды в отношении тест-штаммов холерного вибриона (*V.cholerae classical O1 P-1*, *V.cholerae El Tor O1 M-878* и *V.cholerae non O1/non O139 P-9741*), используемых для контроля качества питательных сред, продемонстрировали её полное соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06 [144].

Таким образом, щелочной агар на основе ППД не только соответствует критериям качества, регламентированным действующими методическими указаниями, но и превосходит используемый в практике аналог – коммерческий щелочной агар по ряду биологических показателей в отношении трёх из четырёх исследованных групп штаммов *V.cholerae*.

6.3 Жидкая накопительная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей

Как правило, при проведении исследований на холеру материал из объектов окружающей среды и от вибрионосителей содержит недостаточное для прямого высева на щелочной агар количество микробных клеток холерного вибриона. В связи с этим, в схему лабораторной диагностики холеры включен этап биологического обогащения исследуемой пробы с использованием специальных жидких накопительных сред (основного раствора пептона и 1% пептонной воды), создающих преимущества для холерного вибриона перед сопутствующими микроорганизмами за счет ограниченной шестью часами длительности культивирования, пока микробные популяции находятся в фазе логарифмического размножения (вследствие более короткой длительности одной генерации у *V.cholerae* по сравнению с микробами-контаминантами пробы), способности клеток холерного вибриона концентрироваться на поверхности среды и устойчивости к щелочному рН.

Нами была сконструирована новая жидкая накопительная питательная среда на основе ПППД для культивирования и выделения холерного вибриона в концентрированном (аналог основного раствора пептона) и разведенном (аналог 1% пептонной воды) вариантах, имеющая следующий состав:

- ПППД – 0,2 % (по аминному азоту);
 - натрий хлористый – 50,0 г;
 - калий азотнокислый – 1,0 г;
 - натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 5,0 г;
 - вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л (в концентрированном варианте), до 10,0 л (в разведенном варианте);
- pH готовой среды – $8,2 \pm 0,2$.

Результаты сравнительного изучения разработанной жидкой накопительной питательной среды на основе ПППД и контрольной жидкой накопительной среды – 1% пептонной воды, приготовленной из «Пептона основного сухого» производства ФГУП НПО «Микроген» представлены в таблице 18. Анализ представленных в таблице результатов демонстрирует достоверно более высокое среднее значение показателя чувствительности разработанной среды по сравнению с контрольной в отношении трех из четырех взятых в исследование групп штаммов: *V.cholerae classical O1*, *V.cholerae El Tor O1* и *V.cholerae O139*. В четвертой группе штаммов (*V.cholerae non O1/ non O139*) средние значения данного показателя опытной и контрольной сред идентичные. По показателю числа выросших колоний при высеве шестичасовых культур на агаровые пластинки из исходной посевной дозы 10 м.к. разработанная среда в 17,2 раза превосходила контрольную в отношении группы из восьми штаммов *V.cholerae O139*. В отношении трех других исследованных групп штаммов преимущества опытной среды имели место, но были не столь выражены. Аналогичная тенденция сохранялась при увеличении посевной дозы до 100 м.к.

Таблица 18

Результаты сравнительного изучения опытной и контрольной жидких накопительных сред по их основным биологическим показателям

Группа штаммов	Чувствительность, м.к. (M±m)		Показатель числа выросших колоний при высеве 6-часовых культур на агаровые пластинки, (M±m)			
			Исходная посевная доза 10 м.к.		Исходная посевная доза 100 м.к.	
	опытная среда	контрольная среда	опытная среда	контрольная среда	опытная среда	контрольная среда
<i>V.cholerae</i> <i>classical O1</i> 4 штамма	10,0±0,0	2507,5±499,5	8,9±1,1	5,4±3,9	72,8±9,5	44,7±33,2
<i>V.cholerae</i> <i>El Tor O1</i> 11 штаммов	10,0±0,0	18,2±2,7	9,0±1,8	5,8±2,4	108,6±35,8	61,8±8,3
<i>V.cholerae</i> <i>O139</i> 8 штаммов	10,0±0,0	538,8±49,4	7,0±1,6	0,4±1,9	75,4±17,7	5,9±13,6
<i>V.cholerae</i> <i>non O1/non O139</i> 5 штаммов	10,0±0,0	10,0±0,0	9,0±1,0	8,1±1,5	71,1±5,3	62,2±9,7

Таким образом, разработанная нами на основе ПППД жидкая накопительная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона по результатам сравнительного тестирования с использованием 28 музейных штаммов *V.cholerae* различных биоваров и серогрупп превосходила используемый в практике аналог (1% пептонную воду, приготовленную из «Пептона основного сухого» производства ФГУП НПО «Микроген») по основным биологическим показателям.

6.4 Результаты использования разработанного комплекса сред «Щелочной агар - Жидкая накопительная среда» на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей при мониторинге объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона и исследовании материала от людей

Целью настоящего раздела работы явилась оценка эффективности использования созданного на основе ПППД комплекса сред «Щелочной агар-Жидкая накопительная среда» для исследования проб воды поверхностных водоёмов и сточных вод из стационарных точек забора в процессе мониторинга объектов окружающей среды на территории г.Ростова-на-Дону и материала от больных острыми кишечными инфекциями, проходивших лечение в инфекционных отделениях МБУЗ Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко, на наличие холерного вибриона за 6 лет. В качестве контрольных сред были использованы «Агар щелочной сухой» и «Пептон основной сухой» производства ФГУП НПО «Микроген», приготовленные по инструкции производителя. Использованные контрольные среды полностью соответствовали требованиям МУ 3.3.2.2124-06 [144] по результатам их предварительного тестирования. Исследование проб воды поверхностных водоёмов и сточных вод на наличие холерного вибриона осуществляли в период 2000-2005 гг. силами специалистов СПЭБ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора согласно схеме,

регламентированной действовавшими в указанный период выполнения работы нормативно-методическими документами [119, 169]. Пробы отбирали из сети стационарных пунктов отбора проб воды на территории г. Ростова-на-Дону. Данная работа проводилась с целью оказания помощи учреждениям практического здравоохранения и как один из этапов подготовки сотрудников СПЭБ к работе в зонах ЧС, обусловленных или осложнённых вспышками холеры. Посев материала осуществляли параллельно на опытные и контрольные среды. Сравнение данных сред проводили по числу выделенных культур, идентифицированных как *Vibrio cholerae* O1 и не O1 / не O139 серогрупп. Всего за период с 2000 по 2005 гг. было исследовано 938 проб воды (816 – из поверхностных водоемов, 122 – из сточных вод). Результаты исследования представлены в таблицах 19, 20.

Таблица 19

Сравнительное изучение эффективности использования опытного («Щелочной агар – Жидкая накопительная среда» на основе ПППД) и контрольного («Агар щелочной сухой – Пептон основной сухой», ФГУП НПО «Микроген») комплексов питательных сред в ходе мониторинга объектов окружающей среды за период 2000-2005 гг. (по показателю выделения штаммов *V.cholerae* O1)

Годы	Кол-во исследованных проб воды / кол-во выделенных культур <i>V.cholerae</i> O1					
	Всего		Из поверхностных водоемов		Из сточных вод	
	Опытный комплекс сред	Контр. комплекс сред	Опытный комплекс сред	Контр. комплекс сред	Опытный комплекс сред	Контр. комплекс сред
2000	143 / 1	143 / 1	123 / 0	123 / 0	20 / 1	20 / 1
2001	146 / 6	146 / 0	125 / 5	125 / 0	21 / 1	21 / 0
2002	169 / 4	169 / 0	148 / 4	148 / 0	21 / 0	21 / 0
2003	160 / 1	160 / 0	140 / 1	140 / 0	20 / 0	20 / 0
2004	152 / 2	152 / 0	133 / 2	133 / 0	19 / 0	19 / 0
2005	168 / 4	168 / 0	147 / 4	147 / 0	21 / 0	21 / 0
Итого:	938 / 18	938 / 1	816 / 16	816 / 0	122 / 2	122 / 1

Таблица 20

Сравнительное изучение эффективности использования опытного («Щелочной агар – Жидкая накопительная среда» на основе ПППД) и контрольного («Агар щелочной сухой – Пептон основной сухой», ФГУП НПО «Микроген») комплексов питательных сред в ходе мониторинга объектов окружающей среды за период 2000-2005 гг. (по показателю выделения штаммов *V.cholerae non O1/ non O139*)

Годы	Кол-во исследованных проб воды / кол-во выделенных культур <i>V.cholerae non O1/ non O139</i>					
	Всего		Из поверхностных водоемов		Из сточных вод	
	Опытный комплекс сред	Контр. комплекс сред	Опытный комплекс сред	Контр. комплекс сред	Опытный комплекс сред	Контр. комплекс сред
2000	143 / 33	143 /	123 / 28	123 / 16	20 / 5	20 / 2
2001	146 / 68	146 /	125 / 63	125 / 28	21 / 5	21 / 3
2002	169 / 65	169 /	148 / 60	148 / 23	21 / 5	21 / 4
2003	160 / 89	160 /	140 / 84	140 / 35	20 / 5	20 / 3
2004	152 / 78	152 /	133 / 72	133 / 25	19 / 6	19 / 3
2005	168 / 105	168 /	147 / 100	147 / 19	21 / 5	21 / 3
Итого:	938 / 438	938 / 164	816 / 407	816 / 146	122 / 31	122 / 18

За шесть лет апробации разработанного на основе ПППД комплекса сред «Щелочной агар - Жидкая накопительная среда» при мониторинге водных объектов с его помощью были выделены 18 культур *V.cholerae O1* (16 – из воды поверхностных водоемов, две – из сточных вод) и 438 культур *V.cholerae non O1/ non O139* (407 – из воды поверхностных водоемов, 31 – из сточных вод), в то время как на контрольном комплексе сред «Агар щелочной сухой – Пептон основной сухой» была изолирована только одна культура *V.cholerae O1* (из сточных вод, которая была выделена и на опытном комплексе сред) и 164 культуры холерного вибриона не O1 / не O139 серогрупп (146 – из проб воды поверхностных водоемов, 18 – из сточных вод). Следует отметить, что 85% всех изолированных в Ростовской области за шесть указанных лет культур *V.cholerae O1* было выявлено только при использовании сред, сконструированных на основе ПППД, в процессе их лабораторных испытаний. Четыре *ctx+ tcp+* штамма холерного вибриона O1

серогруппы, изолированные на опытных средах в ходе мониторинга, характеризовались способностью продуцировать холерный энтеротоксин (СТ) *in vitro* при культивировании как в бульоне на основе ПППД, так и в бульоне Мартена, что подтверждалось одинаковыми титрами СТ (1/40 – 1/80) в тесте кожной проницаемости [394] при использовании обоих бульонов. Благодаря использованию разработанного комплекса сред в августе 2001 года из сточных вод на территории г.Ростова-на-Дону был выделен токсигенный, эпидемически опасный штамм *V.cholerae O1*, сходный по генотипу (по данным VNTR – анализа) со штаммами, вызвавшими вспышку холеры в г. Казани месяцем раньше. Это позволило своевременно провести необходимый комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий и предотвратить вспышку инфекции среди людей в г. Ростове-на-Дону.

Результаты проведенной в ходе мониторинга объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона апробации разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред «Щелочной агар – Жидкая накопительная среда» убедительно свидетельствуют о его преимуществах перед используемыми в микробиологической практике питательными средами в отношении возможности выявления в воде поверхностных водоемов и сточных водах штаммов холерного вибриона как O1, так и не O1 / не O139 серогрупп.

Принимая во внимание высокую чувствительность и значительно более низкую себестоимость разработанных на основе ПППД питательных сред, их внедрение в практику лабораторной диагностики холеры существенно повысит эффективность и снизит затраты на осуществление ежегодного мониторинга объектов окружающей среды.

Таким образом, испытания новых питательных сред на основе ПППД для диагностики холеры в ходе ежегодного мониторинга водных объектов силами специалистов СПЭБ способствовали не только возможности продемонстрировать более высокую эффективность разработанного комплекса

сред по сравнению с используемыми в практике аналогами, а также - повышению уровня практической подготовки членов бригад и реальному обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия на территории Ростовской области.

Апробации разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред «Щелочной агар – Жидкая накопительная среда» в ходе исследования материала от людей на базе бактериологической лаборатории МБУЗ «Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко» предшествовали модельные опыты по сравнительному изучению возможности выделения на опытных и контрольных средах штаммов холерного вибриона из искусственных смесей с микробами-контаминантами. В ходе проведённого исследования были смоделированы пробы, близкие по составу микрофлоры к ректальным мазкам вибрионосителя (с минимальным количеством микробных клеток холерного вибриона – 10 м.к. и различной концентрацией кишечной палочки и протей, имитирующей разные степени дисбактериоза). Искусственно созданные для этого смеси указанных микробов в 0,85% растворе натрия хлористого, содержащего М 1/150 калий-натриевого фосфатного буфера, исследовали как пробы материала из кишечника человека по классической схеме бактериологической диагностики холеры с параллельным посевом на опытные (Щелочной агар на основе ПППД – Жидкая накопительная среда на основе ПППД) и контрольные (Агар щелочной сухой и 1% пептонную воду, приготовленную из Пептона основного сухого) среды. Было установлено, что на средах опытного комплекса холерный вибрион удавалось изолировать в эксперименте из смесей, содержавших 10 м.к./мл *V.cholerae* и от 1×10^4 до 1×10^8 м.к./мл *E.coli* и *P.vulgaris*. На контрольном комплексе сред выделение *V.cholerae* было возможным при концентрации в смеси микробов-контаминантов, не превышающей 1×10^7 м.к./мл. Полученные данные свидетельствуют о более высокой чувствительности опытных сред по сравнению с контрольными, что создаёт предпосылки их эффективного

использования при исследовании материала от людей на наличие холерного вибриона, в том числе и на вибрионосительство.

В 747 пробах материала от людей холерный вибрион не был обнаружен как на опытных, так и на контрольных средах. Вместе с тем, результаты модельных опытов по выделению холерного вибриона из смесей, имитирующих клинический материал (которые показали преимущество сред на основе ПППД перед традиционными основным пептоном и щелочным агаром), создают предпосылки возможности эффективного использования разработанных сред для исследования материала от людей.

6.5 Бульон для культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей

Термином «бульон» (от французского слова bouillon – навар) прежде обозначали исключительно навар из мяса на воде; в настоящее время под «бульоном» подразумевают всякого рода навар на воде: из мяса, рыбы и морепродуктов, зелени и овощей, трав, грибов, биомассы микроорганизмов. В классической микробиологии со времен Луи Пастера под термином «бульон» понимают жидкую питательную среду, применяемую для культивирования микроорганизмов, участвующих в деградации белков [317]. Бульоны могут быть использованы как самостоятельные питательные среды и как основы (или компоненты) других более сложных по составу микробиологических питательных сред. Бульоны чаще всего представляют собой богатый питательный субстрат с высоким пластическим и энергетическим потенциалом (за счет входящего в его состав белкового гидролизата) и выраженными вегетирующими свойствами в отношении культивируемых в нем микроорганизмов (за счет стимуляторов роста, прежде всего, витаминов группы В и нуклеиновых оснований). Это обуславливает возможность использования бульонов для накопления не только биомассы выращиваемых штаммов бактерий, но и продуцируемых ими антигенов, ферментов и токсинов, а также для изучения различных

свойств микроорганизмов. Для культивирования и исследования холерного вибриона используют, преимущественно, бульоны на основе гидролизатов и экстрактов мяса: мясо-пептонный бульон, бульон Мартена, бульон Хоттингера. Очевидно, что исходное сырье для приготовления этих бульонов имеет высокую стоимость, нестандартно и требует сложного технологического обеспечения. В связи с этим, разработанный нами бульон на основе ПППД лишен этих недостатков и может рассматриваться как адекватная альтернатива традиционным мясным бульонам. Сконструированная среда имеет следующий состав:

- ПППД – из расчёта $(0,07 \pm 0,005)$ % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-ти водный – 6,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;
- рН среды $7,8 \pm 0,2$.

Результаты сравнительного изучения разработанного бульона для культивирования холерного вибриона на основе ПППД и контрольной среды – бульона Мартена представлены в таблице 21. Анализ полученных результатов свидетельствует, что по основным биологическим показателям разработанный бульон не уступает контрольному в отношении всех 28 изученных музейных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп.

Разработанный на основе ПППД бульон был исследован также в аспекте возможности его применения для оценки продукции холерного энтеротоксина (СТ) *in vitro* с тестированием полученных из исследованных штаммов *V.cholerae* супернатантов в тесте кожной проницаемости [394] и культуре клеток СНО-К1[. В ходе проведенного исследования (таблица 22) было установлено, что разработанный на основе ПППД бульон при культивировании в нем штаммов-продуцентов СТ *V.cholerae classical 569B*, *V.cholerae El Tor 1310* и предложенного нами ранее [233] потенциального продуцента СТ – штамма *V.cholerae O139 16077 (MO45)* в условиях аэрации

Таблица 21

Результаты сравнительного изучения бульона на основе ПППД и контрольного среды – бульона Мартена по их основным биологическим показателям

Группа штаммов	Чувствительность, м.к. (M±m)		Показатель числа выросших колоний при высеве 6-часовых культур на агаровые пластинки, (M±m)			
			Исходная посевная доза 10 м.к.		Исходная посевная доза 100 м.к.	
	Бульон на основе ПППД	Бульон Мартена	Бульон на основе ПППД	Бульон Мартена	Бульон на основе ПППД	Бульон Мартена
<i>V.cholerae</i> <i>classical O1</i> 4 штамма	10,0±0,0	10,0±0,0	8,1±2,7	7,5±1,9	87,8±8,5	72,3±12,1
<i>V.cholerae</i> <i>El Tor O1</i> 11 штаммов	10,0±0,0	10,0±0,0	10,8±4,2	9,6±2,1	119,0±43,7	89,7±11,2
<i>V.cholerae</i> <i>O139</i> 8 штаммов	10,0±0,0	10,0±0,0	6,0±1,1	5,8±1,1	66,0±9,5	64,6±10,3
<i>V.cholerae</i> <i>non O1/non O139</i> 5 штаммов	10,0±0,0	10,0±0,0	8,9±1,0	8,4±2,2	87,7±8,0	75,3±12,4

Таблица 22

Продукция холерного энтеротоксина (СТ) штаммами *V.cholerae* при их культивировании в бульоне на основе ПППД и контрольных средах (бульоне Мартена и среде АКІ)

Штаммы <i>V.cholerae</i>	Питательные среды					
	Бульон на основе ПППД		Б-н Мартена		Среда АКІ	
	Титр в тесте кожной проницаем.	Титр в культуре клеток СНО-К1	Титр в тесте кожной проницаем.	Титр в культуре клеток СНО-К1	Титр в тесте кожной проницаем.	Титр в культуре клеток СНО-К1
<i>V.cholerae</i> classical 569B (штамм-продуцент)	1/1280	1/25600	1/1280	1/25600	1/2560	1/51200
<i>V.cholerae</i> El Tor 1310 (штамм-продуцент)	1/640	1/6400	1/640	1/3200	1/2560	1/12800
<i>V.cholerae</i> O139 16077 (штамм-продуцент)	1/640	1/3200	1/640	1/3200	1/1280	1/6400
Штаммы <i>V.cholerae</i> El Tor, выделенные от людей в г. Казани во время вспышки 2001 г. 29 штаммов	1/4 – 1/64	1/100 – 1/3200	1/4 – 1/64	1/100 – 1/3200	1/8 – 1/256	1/200 – 1/6400
Штаммы <i>V.cholerae</i> El Tor, выделенные из воды поверхностных водоемов и стоков в г. Ростове-на-Дону в 2000-2001 гг. 3 штамма	1/2 - 1/64	1/10 – 1/800	1/4 - 1/32	1/10 – 1/800	1/32 – 1/512	1/100 – 1/1600

обеспечивал продукцию ими СТ, равнозначную таковой по величине титров в тесте кожной проницаемости и культуре клеток СНО-К1 при

использовании бульона Мартена и лишь незначительно уступал по данному показателю созданной специально для накопления СТ среде АКІ [434]. При исследовании 29 штаммов холерного вибриона, выделенных от людей во время вспышки холеры в г.Казани летом 2001 г., и трех токсигенных штаммов *V.cholerae El Tor*, изолированных из воды поверхностных водоемов и стоков на территории г.Ростова-на-Дону в 2000-2001 гг., было установлено что все взятые в исследование штаммы продуцировали СТ *in vitro*, наличие которого регистрировали в тесте кожной проницаемости и культуре клеток СНО-К1 при их культивировании как на разработанном бульоне, так и на контрольных средах – бульоне Мартена и среде АКІ. По величине титров СТ в указанных тестах опытная среда не уступала бульону Мартена и лишь незначительно отставала по этому показателю от одной из лучших в мире сред накопления СТ, состоящей из дорогих импортных ингредиентов – среде АКІ.

Исследование гемолитической активности 28 использованных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп в пробе Грейга [169] показало отсутствие расхождения в результатах, полученных при использовании разработанного на основе ПППД бульона и бульона Мартена.

Таким образом, сконструированный на основе ПППД бульон по основным биологическим показателям (чувствительности и показателю числа выросших колоний при высеве шестичасовых культур на агаровые пластинки) не уступает контрольной среде – традиционно используемому для культивирования и изучения свойств холерного вибриона бульону Мартена. Разработанный бульон обеспечивал продукцию СТ *in vitro* и возможность оценки гемолитической активности в пробе Грейга всех исследованных штаммов холерного вибриона на уровне контрольного бульона Мартена.

6.6 Питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях

Одним из главных биохимических признаков рода *Vibrio* является способность ферментировать глюкозу в аэробных и анаэробных условиях. По мнению ряда авторов [5, 354, 370, 391, 432, 451, 510] при ферментации глюкозы вибрионами в аэробных условиях в среде накапливаются молочная, янтарная и уксусная кислоты; в анаэробных условиях – этанол, глицерин, диацетил, молочная, янтарная, уксусная и муравьиная кислоты, а также альдегиды. Ферментацию глюкозы в аэробных условиях рассматривают как окисление, в анаэробных условиях – как брожение [430]. В обоих случаях в среде культивирования происходит сдвиг pH в кислую сторону, что может быть зарегистрировано по изменению цвета индикатора. Этот феномен лёг в основу предложенной в 1953 году Hugh R. и Leifson E. [430] питательной среды для изучения метаболизма углеводов в аэробных и анаэробных условиях у грамотрицательных бактерий, которая применяется до настоящего времени наряду с коммерческой средой OF Basal Medium с глюкозой фирмы Becton-Dickinson (где вместо пептона ферментативного в качестве питательной основы используется панкреатический гидролизат казеина) для идентификации вибрионов по признаку ферментации глюкозы.

Питательные основы данных сред – мясные ферментативные пептоны и панкреатические гидролизаты казеина характеризуются, с одной стороны, дороговизной, с другой – повышенными требованиями к содержанию в них углеводов (данный показатель не должен превышать значения 0,06%, чтобы не происходило существенного закисления среды и изменения цвета индикатора вследствие ферментации сахаров самой питательной основы культивируемыми микроорганизмами). Предложенная Гальцевой Г.В. с соавт. в 1974 году [69] технология производственного изготовления модифицированной сухой среды Хью-Лейфсона на основе рыбного сухого

питательного агара в настоящее время не используется предприятиями – производителями сухих питательных сред.

В связи с вышеизложенным, актуальной представляется проблема разработки питательной среды для изучения ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях на основе белкового гидролизата с низкой концентрацией углеводов из доступного и недорогого сырья.

Принимая во внимание, что разработанный нами ранее белковый гидролизат ПППД в составе сред для культивирования *V.cholerae* по своим бактериологическим показателям превосходит используемые в практике казеиновые гидролизаты и не уступает мясным ферментативным пептонам, существенно дешевле последних, характеризуется стабильностью биохимических свойств культур при пассажах через содержащие его среды, а также низким содержанием углеводов – $(0,04 \pm 0,015)\%$, представлялось перспективным конструирование на его основе питательной среды для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях.

При конструировании сред указанного назначения, по мнению Адамова А.К. [5], следует учитывать, что при наличии в среде большой концентрации аминного азота (за счёт аминокислот питательной основы) после закисления среды наступает её щелочение. Это обусловлено протеканием двух параллельных ферментативных реакций – окислительной (в аэробных условиях) или бродильной (в анаэробных условиях) ферментацией глюкозы, приводящей к закислению среды, и декарбоксилированием аминокислот питательной основы за счёт декарбоксилаз культивируемых микроорганизмов, ведущим к накоплению щелочных продуктов и, соответственно сдвигу рН в щелочную сторону.

В связи с вышеизложенным, очевидно, что концентрация питательной основы сред для определения ферментации глюкозы должна быть значительно более низкой не только по сравнению с таковой в средах для культивирования и выделения микроорганизмов, но и по сравнению с

концентрацией глюкозы в данной среде. Только при соблюдении этих условий доминирующей является реакция ферментации глюкозы (количество кислых продуктов этой реакции превалирует над количеством накапливаемых вследствие декарбоксилирования аминокислот питательной основы щелочных продуктов) и не происходит раннего истощения данного углевода (как субстрата реакции) в среде. Максимально возможная (без ущерба для прироста биомассы микроорганизма и, соответственно, накопления необходимых ферментов) низкая концентрация питательной основы в среде указанного назначения также обеспечивает её невысокую буферную ёмкость, препятствующую закислению среды и изменению цвета индикатора.

Принимая во внимание, что ПППД, являясь по сути триптическим белковым гидролизатом, содержит ряд ростовых факторов, включая витамины группы В, и, следовательно, может рассматриваться как «два в одном» (источник азота плюс стимулятор роста), нами была поставлена задача изучить возможность использования ПППД в качестве моноосновы конструируемой среды для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. Соответственно, основными параметрами оптимизации состава данной среды является концентрация ПППД и глюкозы в ней. Предпосылками успешного решения поставленной задачи стали результаты исследований, проведённых нами ранее при разработке на основе ПППД жидкой накопительной среды для холерного вибриона, показавшие, что даже при низкой (в пределах 0,02 % по аминному азоту) концентрации ПППД в данной среде последняя характеризуется высоким показателем эффективности (приростом биомассы культивируемых в ней штаммов *V.cholerae*).

Для определения оптимума концентрации питательной основы в составе конструируемой среды для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях в качестве базовой модели была принята среда Хью-Лейфсона, где вместо

ферментативного пептона использовали ПППД с варьированием значений его концентраций по аминному азоту в оцениваемом диапазоне.

Отправной точкой для определения диапазона исследуемых значений концентрации питательной основы (по аминному азоту) в составе конструируемой среды (предположительно, включающего оптимум данного параметра) явилась концентрация пептона ферментативного по аминному азоту в среде Хью-Лейфсона – 0,015 %. Диапазон исследованных значений содержания ПППД, как основы в составе разрабатываемой питательной среды, охватывал концентрации аминного азота $\pm 0,01$ % от указанной точки с шагом в 0,002 %.

Главными критериями отклика на изменение концентрации ПППД нами были выбраны: время закисления среды вследствие окислительной (аэробной) и бродильной (анаэробной) ферментации глюкозы, оцениваемое по переходу окраски индикатора бромтимолового синего от зелёного к жёлтому, и стабильность наступающей кислой реакции среды, оцениваемую по отсутствию возвращения цвета среды из жёлтого в зелёный или сине-зелёный вследствие накопления щелочных продуктов при ферментации аминокислот питательной основы декарбоксилазами холерного вибриона.

Проведённые исследования, результаты которых представлены в таблице 23, свидетельствуют, что с увеличением концентрации ПППД в составе среды удлиняется промежуток времени от внесения инокулума культуры до момента изменения реакции среды в кислую сторону (переход её цвета из зелёного в жёлтый). Эта тенденция обусловлена, вероятно, увеличением буферной ёмкости среды (связанной с пептидами питательной основы) с каждым последующим приращением концентрации ПППД, для преодоления которой требуется постоянно возрастающее количество кислых продуктов. Для их накопления в среде необходимо дополнительное время, что и ведёт к удлинению периодов сдвига рН. Параллельно протекающая реакция декарбоксилирования аминокислот питательной основы, ведущая к накоплению щелочных продуктов, также замедляет изменение реакции

Таблица 23

Влияние концентрации питательной основы (ПППД) в составе среды на время и стабильность её закисления вследствие ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях штаммом *V.cholerae non O1/non O139 P-9741*

Концентрация ПППД в среде, %	Аэробные условия		Анаэробные условия	
	Время закисления среды, ч	Стабильность закисления среды, ч (от момента изменения цвета среды из зелёного в жёлтый до обратной реакции)	Время закисления среды, ч	Стабильность закисления среды, ч (от момента изменения цвета среды из зелёного в жёлтый до обратной реакции)
0,005	15±1,2	более 48	17±1,2	более 48
0,007	12±0,6	более 48	14±1,2	более 48
0,009	9±1,2	более 48	11±1,2	более 48
0,011	9±0,6	более 48	11±1,2	более 48
0,013	8±0,6	более 48	10±0,6	более 48
0,015	9±0,6	36±2	10±1,2	32±2
0,017	9±1,2	36±3	11±1,2	28±3
0,019	10±0,6	28±2	12±1,2	20±2
0,021	11±0,6	22±4	12±1,2	16±4
0,023	12±1,2	19±3	12±1,2	12±2
0,025	12±1,2	17±3	14±1,2	12±2
Контроль (Среда Хью-Лейфсона)	8±0,6	более 48	10±0,6	более 48

среды в кислую сторону вследствие ферментации глюкозы. Установленная в ходе настоящего исследования зависимость времени закисления разрабатываемой среды от количественного содержания ПППД в ней не распространяется на самые низкие значения исследованного диапазона концентраций (ниже 0,007%). Вероятно это пороговая концентрация ПППД в среде, ниже которой культура испытывает острый дефицит азотистого питания, что ведёт к значительной задержке развития микробной популяции, уменьшению темпов прироста биомассы, и соответственно накопления необходимого фермента.

Как видно из данных, представленных в таблице, оптимум концентрации ПППД в разрабатываемой среде находится в точке 0,013 %. Время учёта результатов теста при данных значениях содержания ПППД в разрабатываемой питательной среде полностью соответствует таковому при использовании контрольной среды Хью-Лейфсона, равно как и выраженность перехода окраски индикатора.

Оптимальную концентрацию глюкозы в составе конструируемой среды определяли относительно найденного в предыдущей серии экспериментов частного оптимума содержания ПППД в ней (0,013% по аминному азоту) согласно метода Гаусса-Зейделя [435]. Основываясь на полученных Хью и Лейфсоном [430] данных об оптимальном соотношении концентраций глюкозы и питательной основы (пептона ферментативного) равном 5:1, позволяющем чётко фиксировать протекание реакций окислительной (в аэробных условиях) или бродильной (в анаэробных условиях) ферментации глюкозы в среде, мы провели масштабирование значений концентраций этих ингредиентов (глюкозы и питательной основы – ПППД, которая определялась по эквивалентному количеству аминного азота) с коэффициентом 2, сохранив указанный баланс между ними. За отправную точку было принято содержание глюкозы и питательной основы (ПППД) в контрольной среде Хью-Лейфсона: 10,0 и 2,0 г/л (в конструируемой среде это

количество соответствует 0,013 % по аминному азоту). Масштабирование было проведено как в сторону увеличения, так и уменьшения концентраций данных компонентов. Критериями отклика на изменение значений исследуемых параметров оптимизации, как и в предыдущих опытах, нами были выбраны показатели времени и стабильности закисления среды, фиксируемые по факту изменения цвета индикатора бромтимолового синего от зелёного к жёлтому и от жёлтого к зелёному и сине-зелёному соответственно. Результаты данного раздела исследований представлены в таблице 24. Анализ полученных результатов свидетельствует, что снижение концентраций глюкозы и ПППД относительно выбранной отправной точки удлиняет время закисления среды, а стабильность закисления при этом достаточно высока – свыше 48 часов. Данный факт объясняется тем обстоятельством, что снижение содержания субстрата параллельной реакции декарбоксилирования – аминокислот ПППД приводит к недостаточному для сдвига рН закисленной среды в щелочную сторону накоплению щелочных продуктов этой реакции. Снижение концентраций указанных ингредиентов разрабатываемой питательной среды в десять и более раз приводит к невозможности зафиксировать реакцию ферментации глюкозы по переходу цвета индикатора, что связано, вероятно, с недостаточным накоплением в опытной среде кислых продуктов данной реакции из-за малого количества субстрата. Увеличение содержания в конструируемой среде глюкозы и питательной основы ПППД по сравнению с отправной точкой не оказывало существенного влияния как на время её закисления, так и на стабильность этого процесса. Выявленные закономерности для аэробных и анаэробных условий культивирования штамма *V.cholerae* были идентичны, однако время закисления среды в результате бродильной (в анаэробных условиях) ферментации глюкозы превышало таковое при окислительной (в аэробных условиях) ферментации данного субстрата во всем исследованном диапазоне масштабирования. Резюмируя вышеизложенное, следует отметить, что именно отправная точка для проведённого масштабирования

Таблица 24

Влияние масштабирования соотношения концентраций глюкозы и питательной основы (ПППД) в составе конструируемой среды на время и стабильность её закисления вследствие ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях штаммом *V.cholerae non O1/non O139 P-9741*

Приращение концентраций глюкозы и ПППД в среде относительно отправной точки X*	Аэробные условия		Анаэробные условия	
	Время закисления среды, ч	Стабильность закисления среды, ч (от момента изменения цвета среды из сине-зелёного в жёлтый до обратной реакции)	Время закисления среды, ч	Стабильность закисления среды, ч (от момента изменения цвета среды из сине-зелёного в жёлтый до обратной реакции)
X:12	нет реакции			
X:10	нет реакции			
X:8	18±1,8	более 48	22±1,2	более 48
X:6	16±1,2	более 48	20±1,2	более 48
X:4	12±0,6	более 48	16±1,2	более 48
X:2	10±0,6	более 48	12±0,6	более 48
X	8±0,6	более 48	10±1,2	более 48
2×X	8±1,2	36±3	11±1,2	28±3
4×X	9±0,6	34±2	10±1,2	20±2
6×X	8±0,6	38±4	10±1,8	16±4
8×X	8±1,2	36±3	12±1,2	12±2
10×X	8±1,2	34±3	10±1,2	12±2
Контроль (Среда Хью-Лейфсона)	8±0,6	более 48	10±0,6	более 48

Примечание: X* - концентрация глюкозы – 10,0 г/л и ПППД – эквивалентная по аминному азоту 2 г/л пептона ферментативного.

соответствовала оптимальным концентрациям глюкозы – 10,0 г/л и питательной основы ПППД – 0,013 %.

Таким образом, оптимум содержания глюкозы в конструируемой среде на основе ПППД оказался идентичным таковому в контрольной среде Хью-Лейфсона и составил 10,0 г/л.

В результате проведённого подбора индикатора в состав предварительно оптимизированной по основным параметрам (концентрации ПППД, глюкозы, натрия хлористого и значению рН) конструируемой среды было установлено, что для данной среды наиболее подходящим является индикатор бромтимоловый синий, который обеспечивает, с одной стороны, соответствие исходного цвета конструируемой среды таковому у контрольной среды Хью-Лейфсона в условиях оптимального рН 7,8, с другой – оптимальные для учёта (согласно схеме лабораторной диагностики холеры) сроки изменения цвета среды вследствие аэробной и анаэробной ферментации глюкозы. Применение комплексного индикатора (крезоловый красный – бромкрезоловый пурпурный) приводит к увеличению срока учёта реакции до 18-20 ч, так как точка перехода цвета данного индикатора из сиренево-фиолетового через фиолетовый к жёлтому находится ниже 6,0 и для её достижения необходимо накопление значительно большего, чем при использовании бромтимолового синего, количества кислых продуктов реакции аэробной и анаэробной ферментации глюкозы. Феноловый красный имеет точку перехода цвета в жёлтый - 7,4, а в красный 7,7-7,9, поэтому исходный цвет среды (оранжевый) мало отличается от такового после ферментации глюкозы и накопления кислых продуктов. Таким образом, в составе конструируемой питательной среды для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях целесообразно использовать индикатор бромтимоловый синий. Была найдена оптимальная концентрация данного индикатора в разрабатываемой среде: 0,03 г (или его 1 % водный раствор – 3 мл).

В результате проведённой оптимизации был сформирован окончательный состав питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях (из расчёта на 1,0 л):

- ПППД – 0,013 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 5,0 г;
- калий фосфорнокислый двузамещённый 3-водный – 0,4 г;
- Д-глюкоза кристаллическая – 10,0 г;
- бромтимоловый синий водорастворимый – 0,03 г (или его 1 %

водный раствор – 3 мл);

- агар-агар бактериологический – 3,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

Результаты сравнительного изучения опытной среды на основе ПППД и контрольной среды Хью-Лейфсона по дифференцирующим свойствам в отношении 28 музейных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп, а также пяти штаммов других микроорганизмов (*Shigella flexneri 1 «А»8516*, *Proteus vulgaris 14*, *Aeromonas hydrophila 6020-P*, *Pseudomonas aeruginosa P-5810*, *Escherichia coli 1015*) представлены в таблице 25. Анализ результатов проведённого исследования свидетельствует, что разработанная среда на основе ПППД, как и контрольная среда Хью-Лейфсона, позволяет дифференцировать все использованные штаммы *V.cholerae* (проявившие типичное для данного вида свойство – способность к окислительной и бродильной ферментации глюкозы) от заведомо отличающегося от них штамма *P.aeruginosa P-5810* (ферментирующего глюкозу только в аэробных условиях). Остальные изученные музейные штаммы микроорганизмов проявили типичную для них ферментативную активность по отношению к глюкозе (т.е. способность её ферментировать в аэробных и анаэробных условиях) как на опытной, так и на контрольной средах в сроки от 9 до 24 ч.

Таблица 25

Результаты сравнительного изучения опытной и контрольной сред по признаку ферментации глюкозы штаммами холерного вибриона и других микроорганизмов в аэробных и анаэробных условиях

Группа штаммов	Ферментация глюкозы			
	Опытная среда		Контрольная среда	
	Аэробные условия	Анаэробные условия	Аэробные условия	Анаэробные условия
1	2	3	4	5
<i>V.cholerae</i> <i>classical O1</i> 4 штамма	+	+	+	+
<i>V.cholerae</i> <i>El Tor O1</i> 11 штаммов	+	+	+	+
<i>V.cholerae</i> <i>O139</i> 8 штаммов	+	+	+	+
<i>V.cholerae non</i> <i>O1/ non O139</i> 5 штаммов	+	+	+	+
<i>Shigella</i> <i>flexneri</i> 1 штамм	+	+	+	+
<i>Proteus</i> <i>vulgaris</i> 1 штамм	+	+	+	+

Таблица 25 (окончание)

1	2	3	4	5
<i>Aeromonas hydrophila</i> 1 штамм	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 1 штамм	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1 штамм	+	-	+	-

Примечания – а) «+» - положительная реакция; б) «-» - отсутствие реакции.

Аналогичные исследования были проведены при идентификации 164 штаммов холерного вибриона, выделенных из воды и от людей в разных регионах России. Все исследованные штаммы характеризовались типичной для *V.cholerae* способностью ферментировать глюкозу в аэробных и анаэробных условиях.

Таким образом, разработанная на основе ПППД питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях не уступает контрольной среде Хью-Лейфсона по дифференцирующим свойствам в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов и при этом характеризуется значительно более низкой себестоимостью.

6.7 Питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот

По мнению ряда авторов [5, 84, 277, 399, 477] большинство штаммов холерного вибриона обладают способностью декарбоксилировать аминокислоты орнитин и лизин, не ферментировать аргинин. Метод выявления декарбоксилаз орнитина и лизина и дигидролазы аргинина с использованием специальных питательных сред или микротестсистем является одним из ведущих биохимических тестов, включённых в схему микробиологической диагностики холеры [169].

В 1955 году Moeller V. [467] была предложена питательная среда для определения декарбоксилаз и дигидролаз аминокислот на основе ферментативного пептона и экстракта телятины с добавлением соответствующей аминокислоты и комплексного индикатора (бромкрезоловый пурпурный – крезоловый красный). В 1958 году Falcow S. [406] разработал модификацию данной среды, где вместо мясного экстракта был использован экстракт дрожжей, вместо ферментативного пептона – гидролизат казеина, а комплексный индикатор бромкрезоловый пурпурный –

крезоловый красный заменён на более доступный - спиртовой раствор бромтимолового синего. Предложенные в 1972 году Касаткиным Н.Ф. с соавт. и Ряпис И.В. с соавт. [208] среды для определения ферментации аминокислот содержали в качестве питательных основ: ферментативный пептон с добавлением экстракта кормовых углеводородокисляющих дрожжей и синтетическую среду 199 соответственно. Были предложены и другие модификации среды Мёллера [290, 327], однако они не нашли широкого применения в микробиологической практике.

Предложенные ранее [467, 406] питательные среды для оценки способности микроорганизмов ферментировать аминокислоты лизин, аргинин и орнитин характеризуются более низкой концентрацией питательной основы (мясных ферментативных пептонов и гидролизатов казеина) по сравнению со средами для культивирования и выделения данных микроорганизмов (с целью уменьшения буферности, создаваемой пептидами и препятствующей закислению среды вследствие ферментации глюкозы и защелачиванию при декарбоксилировании аминокислот). Недостаток азотистого питания, требуемого для накопления биомассы микроорганизмов и, соответственно, необходимого количества ферментов, обеспечивающих вышеуказанные реакции, компенсировали путём введения в состав сред дополнительных стимуляторов роста (мясных и дрожжевых экстрактов), характеризующихся высоким содержанием витаминов группы В при низкой концентрации азотистых компонентов. Таким образом, все разработанные ранее дифференциально-диагностические среды для определения наличия декарбоксилаз - дигидролаз аминокислот являются двухкомпонентными по питательному субстрату и достаточно дорогостоящими.

В связи с вышеизложенным, а также, принимая во внимание, что разработанный нами препарат - ПППД является источником как азотистых компонентов, так и ряда ростовых факторов, включая витамины группы В, нами была поставлена задача изучить возможность использования разработанного белкового гидролизата в качестве моноосновы

конструируемой среды для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот. Соответственно, основным параметром оптимизации состава данной среды являлась концентрация ПППД в ней. Предпосылками успешного решения поставленной задачи стали результаты исследований, проведённых нами ранее при разработке на основе ПППД жидкой накопительной среды для холерного вибриона, показавшие, что даже при низкой (в пределах 0,02 % по аминному азоту) концентрации ПППД в данной среде последняя характеризуется высоким показателем эффективности (приростом биомассы культивируемых в ней штаммов *V.cholerae*).

Для определения оптимума концентрации питательной основы в составе конструируемой среды в качестве базовой модели была принята среда Мёллера, где вместо ферментативного пептона и мясной воды использовали ПППД с варьированием значений его концентраций по аминному азоту в оцениваемом диапазоне.

Отправной точкой для определения диапазона исследуемых значений концентрации питательной основы (по аминному азоту) в составе конструируемой среды (предположительно, включающего оптимум данного параметра) явилась суммарная концентрация аминного азота пептона ферментативного и мясной воды в среде Мёллера – 0,05%. Диапазон исследованных значений содержания ПППД, как основы в составе конструируемой питательной среды, охватывал концентрации аминного азота $\pm 0,045\%$ от указанной точки с шагом в 0,005%.

Главными критериями отклика на изменение концентрации ПППД нами были выбраны: время закисления среды вследствие анаэробной ферментации глюкозы, оцениваемое по переходу окраски индикатора от сиренево-фиолетового к жёлтому, и время её последующего защелачивания (при условии первичного сдвига рН в кислую сторону) вследствие ферментации аминокислоты декарбоксилазами или дигидролазами, которое

фиксируют по факту перехода окраски индикатора от жёлтого к фиолетовому.

Следует отметить, что обе указанные реакции протекают параллельно. Первоначально наступающее закисление среды обусловлено большей интенсивностью процесса ферментации глюкозы по сравнению с декарбоксилированием аминокислоты. Вместе с тем, истощение глюкозы в среде наступает также раньше, т.к. её молярная концентрация на порядок ниже молярной концентрации аминокислоты. В дальнейшем доминирует ферментация аминокислоты, следствием которой становится накопление аминов и постепенный сдвиг рН уже в щелочную сторону. Таким образом, в связи с параллельностью протекания реакций временные точки перехода окраски индикатора как в жёлтый, так и в фиолетовый цвет фиксировались относительно единой точки отсчёта, соответствующей моменту внесения инокулюма культуры в среду.

Результаты поиска оптимума данного параметра представлены в таблицах 26, 27. Анализ данных таблиц позволил выявить чёткую тенденцию (общую для использованных в опытах микроорганизмов) к удлинению времени перехода окраски индикатора как в кислую, так в последующем и в щелочную сторону (вплоть до полного отсутствия этого перехода) при увеличении концентрации ПППД в среде. Эта тенденция обусловлена, вероятно, увеличением буферной ёмкости среды (связанной с пептидами питательной основы) с каждым последующим приращением концентрации ПППД, для преодоления которой требуется постоянно возрастающее количество кислых и, соответственно, щелочных продуктов. Для их накопления в среде необходимо дополнительное время, что и ведёт к удлинению периодов сдвига рН.

В рамках общей тенденции более быстрое наступление перехода окраски индикатора в кислую сторону при одинаковой концентрации ПППД

Таблица 26

Влияние концентрации питательной основы (ПППД) в составе среды на время* её закисления

Концентрация ПППД в среде, %	Время закисления среды (изменение окраски из сиренево-фиолетового в жёлтый цвет), ч ($M \pm m$)															
	<i>Vibrio cholerae non O1 P-9741</i>				<i>Shigella flexneri 1 «А» 8516</i>				<i>Proteus Vulgaris 14</i>				<i>Aeromonas hydrophila 6020-P</i>			
	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0,005	8±0,6	7±0,6	8±0,6	6±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	8±0,6	9±0,6	8±0,6	8±0,6
0,01	6±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6
0,015	6±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6
0,02	7±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	5±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	6±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	7±0,6
0,025	7±0,6	7±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6	6±0,6	6±0,6	5±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	7±0,6
0,03	7±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	7±0,6
0,035	7±0,6	6±0,6	7±0,6	6±1,2	7±0,6	7±0,6	7±0,6	6±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	7±0,6
0,04	7±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	8±0,6	9±0,6	8±0,6	7±0,6
0,045	7±0,6	6±0,6	7±1,2	6±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	8±0,6	7±0,6	8±0,6	9±0,6	8±0,6	8±0,6
0,05	8±0,6	7±0,6	8±0,6	6±0,6	7±0,6	7±0,6	7±0,6	7±1,2	8±1,2	7±0,6	9±0,6	7±0,6	8±1,2	9±0,6	8±0,6	8±0,6
0,055	8±0,6	7±0,6	8±0,6	7±1,2	8±0,6	8±0,6	8±0,6	7±0,6	8±1,2	8±0,6	9±0,6	8±0,6	9±1,2	10±1,2	9±1,2	8±1,2
0,06	10±1,2	8±0,6	10±0,6	8±0,6	8±0,6	8±0,6	8±0,6	7±0,6	8±0,6	8±0,6	9±0,6	8±0,6	9±1,2	10±1,2	9±0,6	9±1,2
0,065	10±1,2	9±0,6	10±1,2	8±0,6	8±1,2	8±0,6	8±0,6	7±0,6	8±0,6	8±0,6	9±0,6	8±1,2	9±1,2	10±1,2	9±1,2	9±1,2
0,07	11±1,2	9±0,6	11±1,2	8±0,6	8±1,2	8±0,6	8±0,6	8±1,2	9±1,2	9±1,2	10±1,2	8±0,6	10±1,2	12±1,7	11±1,2	10±1,2
0,075	11±1,2	9±0,6	11±1,2	9±1,2	9±1,2	9±1,2	9±1,2	8±0,6	9±1,2	9±1,2	10±1,2	9±0,6	11±1,2	12±1,2	11±1,2	11±1,2
0,08	11±1,2	10±0,6	11±1,2	9±0,6	9±1,2	9±1,2	10±1,2	8±0,6	10±1,2	9±1,2	10±1,7	9±1,2	12±1,2	13±1,7	12±1,2	11±1,2
0,085	13±1,2	10±1,2	13±1,7	10±1, 2	10±1, 2	9±1,2	10±1,2	9±0,6	10±1,2	10±0,6	11±1,2	10±1,7	12±1,2	14±1,7	12±1,2	12±1,7
0,09	-	13±1,7	-	12±1, 7	10±1, 2	10±1,7	10±1,2	9±1,2	10±1,2	10±1,2	12±1,7	10±1,7	13±1,7	-	13±1,7	13±1,7

Таблица 26 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0,095	-	-	-	-	10±1,2	10±1,2	11±1,2	10±1,2	11±1,2	12±1,7	-	11±1,7	-	-	-	-
К (Ср. Мёллера)	6±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6

Примечания – а) К (без АК) – контрольный вариант среды без аминокислоты; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры; г) концентрация ПППД в среде – в % по аминному азоту.

Таблица 27

Влияние концентрации питательной основы (ПППД) в составе среды на время* её защелачивания

Концентрация ПППД в среде, %	Время защелачивания среды (изменение окраски из жёлтого в фиолетовый цвет), ч (M ± m)															
	<i>Vibrio cholerae non O1 P-9741</i>				<i>Shigella flexneri 1 «А» 8516</i>				<i>Proteus Vulgaris 14</i>				<i>Aeromonas hydrophila 6020-P</i>			
	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0,005	16±1,2	-	15±1,7	-	-	-	-	-	-	-	18±1,2	-	-	49±4,6	-	-
0,01	13±1,2	-	12±1,2	-	-	-	-	-	-	-	14±1,2	-	-	42±2,8	-	-
0,015	13±0,6	-	13±1,2	-	-	-	-	-	-	-	14±1,2	-	-	41±2,8	-	-
0,02	14±1,2	-	15±1,2	-	-	-	-	-	-	-	16±1,7	-	-	48±4,6	-	-
0,025	17±2,3	-	16±1,7	-	-	-	-	-	-	-	18±1,2	-	-	49±4,6	-	-
0,03	17±1,7	-	17±1,7	-	-	-	-	-	-	-	18±1,7	-	-	48±4,0	-	-

Таблица 27 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
0,035	17±1, 7	-	17±1,7	-	-	-	-	-	-	-	18±1,7	-	-	52±5,2	-	-
0,04	17±1, 7	-	17±2,3	-	-	-	-	-	-	-	21±1,7	-	-	56±5,8	-	-
0,045	17±1, 7	-	17±1,7	-	-	-	-	-	-	-	20±2,3	-	-	59±5,8	-	-
0,05	19±1, 7	-	18±1,7	-	-	-	-	-	-	-	21±1,7	-	-	62±5,8	-	-
0,055	19±1, 7	-	20±2,3	-	-	-	-	-	-	-	21±1,7	-	-	61±6,4	-	-
0,06	21±2, 3	-	20±2,3	-	-	-	-	-	-	-	23±2,3	-	-	64±6,4	-	-
0,065	21±2, 3	-	22±1,7	-	-	-	-	-	-	-	22±2,3	-	-	69±6,9	-	-
0,07	23±2, 8	-	24±2,3	-	-	-	-	-	-	-	23±1,7	-	-	67±6,4	-	-
0,075	26±2, 3	-	25±2,8	-	-	-	-	-	-	-	25±1,7	-	-	72±6,9	-	-
0,08	28±2, 3	-	27±2,3	-	-	-	-	-	-	-	27±2,8	-	-	71±6,9	-	-
0,085	32±3, 4	-	30±2,8	-	-	-	-	-	-	-	31±2,3	-	-	-	-	-
0,09	н	-	н	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	н	-	-
0,095	н	-	н	-	-	-	-	-	-	-	н	-	-	н	-	-
К (Ср. Мёллера)	13±1, 2	-	13±1,2	-	-	-	-	-	-	-	15±1,7	-	-	44±4,6	-	-

Примечания – а) К (без АК) – контрольный вариант среды без аминокислоты; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры; г) «н» - невозможность учёта из-за отсутствия предварительного закисления; д) концентрация ПППД (%)

регистрировалось на вариантах среды с аминокислотами, к которым у исследуемого микроорганизма отсутствуют декарбоксилазы и дигидролазы (для *V.cholerae* – это вариант с аргинином). Это полностью согласуется с литературными данными и результатами, полученными на контрольной среде Мёллера.

Установленная в ходе настоящего исследования зависимость времени закисления-защелачивания разрабатываемой среды от количественного содержания ПППД в ней не распространяется на самые низкие значения исследованного диапазона концентраций (0,005%). Вероятно, это пороговая концентрация ПППД в среде, ниже которой культура испытывает острый дефицит азотистого питания, что ведёт к значительной задержке развития микробной популяции, уменьшению темпов прироста биомассы, и соответственно накопления необходимых ферментов.

Как видно из данных, представленных в таблицах, оптимум концентрации ПППД в конструируемой среде находится в диапазоне от 0,01 до 0,015 % в отношении всех исследованных микроорганизмов. Время учёта результатов теста при данных значениях содержания ПППД в разрабатываемой питательной среде полностью соответствует таковому при использовании контрольной среды Мёллера, равно как и выраженность перехода окраски индикатора.

Оптимальную концентрацию глюкозы и аминокислот в составе конструируемой среды определяли относительно найденного в предыдущей серии экспериментов частного оптимума содержания ПППД в ней (0,013% по аминному азоту) согласно метода Гаусса-Зейделя [435]. Основываясь на полученных Мёллером [467] данных об оптимальном соотношении концентраций глюкозы и аминокислот равном 1:10, позволяющем чётко фиксировать протекание обеих реакций в среде, мы провели масштабирование значений концентраций этих ингредиентов с коэффициентом 2, сохранив указанный баланс между ними. За отправную точку было принято содержание глюкозы и аминокислот в контрольной

среде Мёллера: 1,0 и 10,0 г/л соответственно. Масштабирование было проведено как в сторону увеличения, так и уменьшения концентраций данных компонентов. Критериями отклика на изменение значений исследуемых параметров оптимизации, как и в предыдущих опытах, нами были выбраны показатели времени закисления и защелачивания среды, фиксируемые по факту изменения цвета индикатора от сиренево-фиолетового к жёлтому и от жёлтого к фиолетовому.

Результаты данного раздела исследований представлены в таблицах 28, 29. Анализ полученных результатов свидетельствует, что снижение концентраций глюкозы и аминокислот относительно выбранной отправной точки (содержание этих ингредиентов в среде Мёллера, т.е. 1,0 и 10,0 г/л соответственно) в два и более раз приводит к невозможности зафиксировать реакцию ферментации глюкозы по переходу цвета индикатора, что связано, вероятно, с недостаточным накоплением в опытной среде кислых продуктов данной реакции из-за малого количества субстрата. Увеличение содержания в конструируемой среде глюкозы и аминокислот по сравнению с таковым в среде Мёллера не оказывало существенного влияния на время её закисления, но в последующем удлиняло время перехода цвета индикатора из жёлтого в фиолетовый (т.е. сдвига рН среды в щелочную сторону) при ферментации аминокислот. Этот феномен, по-видимому, обусловлен тем, что исчерпание резерва глюкозы, лимитирующего реакцию её ферментации, наступает позже, чем в контрольной среде Мёллера и соответственно сдвигается по времени период доминирования процессов декарбоксилирования аминокислот с накоплением щелочных продуктов.

Таким образом, оптимум содержания глюкозы и аминокислот в конструируемой среде оказался идентичным таковому в контрольной среде Мёллера и составил 1,0 и 10,0 г/л соответственно.

Одним из наиболее важных компонентов разрабатываемой питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот является индикатор, обеспечивающий изменение

Таблица 28

Влияние концентраций глюкозы и аминокислоты в составе среды на время* её закисления

Концентрация (г/л)		Время закисления среды (изменение окраски из сиренево-фиолетового в жёлтый цвет), ч ($M \pm m$)															
		<i>Vibrio cholerae non O1 P-9741</i>				<i>Shigella flexneri 1 «A» 8516</i>				<i>Proteus Vulgaris 14</i>				<i>Aeromonas hydrophila 6020-P</i>			
глю	АК	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)
0,25	2,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0,5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1,0	10,0	6±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6
2,0	20,0	6±0,6	5±0,6	7±0,6	5±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6	8±1,2	6±0,6	6±0,6
4,0	40,0	7±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	6±0,6	6±0,6	6±0,6	5±0,6	7±0,6	6±0,6	8±1,2	6±0,6	7±0,6	7±0,6	6±1,2	6±0,6
К (Ср. Мёллера)		6±0,6	5±0,6	6±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	5±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6	7±0,6	6±0,6	6±0,6

Примечания – а) К (без АК) – контрольный вариант среды без аминокислоты; б) « - » - отсутствие перехода окраски индикатора; в) * - от момента внесения культуры

Таблица 29

Влияние концентраций глюкозы и аминокислоты в составе среды на время* её защелачивания

Концентрация (г/л)		Время защелачивания среды (изменение окраски из жёлтого в фиолетовый цвет), ч ($M \pm m$)															
		<i>Vibrio cholerae non O1 P-9741</i>				<i>Shigella flexneri 1 «А» 8516</i>				<i>Proteus Vulgaris 14</i>				<i>Aeromonas hydrophila 6020-P</i>			
		Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)	Лиз	Арг	Орн	К (без АК)
глю	АК																
0,25	2,5	н	-	н	-	-	-	-	-	-	-	н	-	-	н	-	-
0,5	5	н	-	н	-	-	-	-	-	-	-	н	-	-	н	-	-
1,0	10,0	13±1,2	-	12±1,2	-	-	-	-	-	-	-	14±1,2	-	-	42±2,8	-	-
2,0	20,0	17±1,7	-	18±2,3	-	-	-	-	-	-	-	19±1,7	-	-	48±4,6	-	-
4,0	40,0	21±2,3	-	20±1,7	-	-	-	-	-	-	-	24±2,8	-	-	56±5,8	-	-
<i>К (Ср. Мёллера)</i>		13±1,2	-	13±1,2	-	-	-	-	-	-	-	15±1,7	-	-	44±4,6	-	-

Примечания – а) К (без АК) – контрольный вариант среды без аминокислоты; б) « - » - отсутствие перехода окраски индикатора; в) * - от момента внесения культуры; г) «н» - невозможность учёта из-за отсутствия предварительного закисления

цвета среды при сдвиге рН в кислую и щелочную сторону вследствие анаэробной ферментации глюкозы и декарбоксилирования аминокислот соответственно. В настоящем исследовании были использованы следующие индикаторы: комплексный (крезоловый красный - бромкрезоловый пурпурный), бромтимоловый синий, феноловый красный. По данным литературы [208, 467, 406] исследователи наиболее часто пытались использовать эти индикаторы в предложенных ранее средах аналогичного назначения.

В результате проведённого подбора индикатора в состав предварительно оптимизированной по основным параметрам (концентрации ПППД, глюкозы, аминокислот, натрия хлористого и значению рН) конструируемой среды было установлено, что для данной среды наиболее подходящим является комплексный индикатор (крезоловый красный – бромкрезоловый пурпурный), обеспечивающий наглядное изменение цвета среды в оптимальные сроки сначала от сиренево-фиолетового до жёлтого (при сдвиге рН в кислую сторону вследствие ферментации глюкозы), а в последующем от жёлтого до фиолетового (при защелачивании среды вследствие ферментации аминокислоты). Была найдена оптимальная концентрация данного индикатора в среде: бромкрезоловый пурпурный (1,6% спиртовой раствор) – 0,6 мл/л; крезоловый красный (0,1% спиртовой раствор) – 5,0 мл/л. Другие исследованные нами индикаторы (бромтимоловый синий и феноловый красный) не обеспечивали выявление сдвига рН среды в кислую сторону при ферментации глюкозы, так как давали среде исходно жёлтую окраску, изменяющуюся на синюю и красную соответственно только при защелачивании среды вследствие декарбоксилирования аминокислот.

В результате проведённой оптимизации был сформирован окончательный состав питательной среды на основе ПППД для

идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот:

- ПППД из расчёта ($0,013 \pm 0,001$) % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- глюкоза – 1,0 г;
- L-аминокислота – 10 г (варианты с аргинином, лизином, орнитином и контрольный вариант – без аминокислоты);
- бромкрезоловый пурпурный (1,6% спиртовой р-р) – 0,6 мл;
- крезоловый красный (0,1% спиртовой р-р) – 5,0 мл;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;
- рН среды – $6,45 \pm 0,1$.

Следующий этап исследований был посвящен сравнительному изучению разработанной питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот и контрольной среды Мёллера по основному биологическому показателю данных сред – их дифференцирующим свойствам. Оценку данного показателя осуществляли в отношении 28 музейных и 132 свежевыделенных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп, а также, трёх штаммов других микроорганизмов - *Shigella flexneri* 1 «А»8516, *Proteus vulgaris* 14, *Aeromonas hydrophila* 6020-Р, которые отличаются от *V.cholerae* и друг от друга по способности ферментировать аминокислоты на среде Мёллера, не имеют вариабельности этого признака внутри вида и обладают свойством ферментации глюкозы в анаэробных условиях.

Посев культур отобранных для настоящей работы штаммов с агаровых пластинок после II-ого пассажа осуществляли бактериологической петлёй № 2, внося по одной полной петле культуры в каждую из пробирок с испытуемой и контрольной средами. Посевы инкубировали под слоем вазелинового масла при 37°С. Учёт результатов осуществляли через 6-7 часов (для оценки факта закисления сред вследствие ферментации глюкозы) и через 18-48 часов (для выявления защелачивания сред при ферментации

аминокислот). Сроки учёта реакций были выбраны на основании информации о времени перехода цвета индикатора для каждого из взятых в исследование микроорганизмов, полученной в ходе выполнения предшествующих серий экспериментов по оптимизации состава сконструированной на основе ПППД среды и полностью соответствовавшей данным литературы.

Результаты сравнительного изучения опытной среды на основе ПППД и контрольной среды Мёллера по дифференцирующим свойствам в отношении музейных штаммов *V.cholerae*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris* и *Aeromonas hydrophila* представлены в таблице 30.

Таблица 30

Ферментация аминокислот музейными штаммами микроорганизмов при использовании опытной среды на основе ПППД и контрольной среды Мёллера

№ n/n	Штаммы	Опытная среда на основе ПППД				Контрольная среда Мёллера			
		Лиз	Арг	Орн	К	Лиз	Арг	Орн	К
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)
1	<i>V.cholerae classical</i> 3 штамма	+	-	+	-	+	-	+	-
2	<i>V.cholerae El Tor</i> 11 штаммов	+	-	+	-	+	-	+	-
3	<i>V.cholerae El Tor</i> RO-вар 1 штамм	+	-	+	-	+	-	+	-
4	<i>V.cholerae O139</i> 7 штаммов	+	-	+	-	+	-	+	-
5	<i>V.cholerae non O1/non</i> <i>O139</i> 6 штаммов	+	-	+	-	+	-	+	-
6	<i>Shigella flexneri</i> 1 «А» 8516	-	-	-	-	-	-	-	-
7	<i>Proteus vulgaris</i> 14	-	-	+	-	-	-	+	-
8	<i>Aeromonas hydrophila</i> 6020-Р	-	42 ч	-	-	-	42 ч	-	-

Примечания – а) «+» - положительная реакция; б) «-» - отсутствие реакции; в) К – вариант среды без аминокислоты

Анализ результатов проведённого исследования свидетельствует, что разработанная на основе ПППД питательная среда позволяет дифференцировать указанные микроорганизмы друг от друга по признаку ферментации аминокислот. Все изученные музейные штаммы микроорганизмов проявили типичную для них ферментативную активность по отношению к соответствующим аминокислотам как на опытной, так и на контрольной средах: все штаммы холерного вибриона ферментировали лизин и орнитин и не проявляли активности в отношении аргинина; штамм *Shigella flexneri* характеризовался отсутствием декарбоксилаз лизина, орнитина и дигидролазы аргинина; протей ферментировал только орнитин; штамм *Aeromonas hydrophila* – только аргинин. Сроки изменения цвета индикатора при сдвигах рН вследствие ферментации глюкозы и аминокислот на опытной и контрольной средах были одинаковы.

Аналогичные исследования были проведены при идентификации 132 свежевыделенных штаммов холерного вибриона, полученных из разных регионов России. Все исследованные штаммы характеризовались типичной для *V.cholerae* способностью ферментировать лизин и орнитин и быть индифферентными в отношении аргинина как на опытной среде, так и на контрольной среде Мёллера.

Таким образом, разработанная на основе ПППД питательная среда не уступала контрольной среде Мёллера по дифференцирующим свойствам в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов. Вместе с тем, сконструированная среда имеет ряд преимуществ перед контрольной: низкую себестоимость исходного сырья; моноосновность среды, что упрощает технологический процесс её изготовления и улучшает стандартизуемость; меньшую концентрацию питательной основы в среде. Указанные преимущества обуславливают также и экономическую эффективность разработанной на основе ПППД питательной среды для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот.

6.8 Глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний

Практика лабораторной диагностики холеры в настоящее время оснащена большим арсеналом современных методов исследования, включая серологические и молекулярно-биологические. Вместе с тем, действующие нормативные документы [169] требуют выделения чистой культуры холерного вибриона и её идентификации по биохимическим признакам, среди которых важное место занимает присущее штаммам *V.cholerae* свойство ферментировать глюкозу со сдвигом рН среды в кислую сторону вследствие накопления молочной, янтарной и уксусной кислот [5, 354, 370, 391, 451] без газообразования и отсутствие способности к ферментации лактозы, а также отсутствие продукции сероводорода. Указанные свойства холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний выявляют с помощью полиуглеводных агаризованных сред, среди которых наиболее широкое распространение получили среды, предложенные в 1911 году Ресселем [493] и в 1917-1918 гг. Клиглером [446, 447]. В настоящее время в микробиологической практике используют данные среды как в оригинальной прописи (среды лабораторного изготовления), так и их коммерческие аналоги, где вместо ферментативных мясных пептонов в качестве питательной основы применяют гидролизаты казеина, рыбной муки или каспийской кильки. Однако, исходные основы этих питательных сред и их заменители являются продуктами животного происхождения и характеризуются, с одной стороны, дороговизной, с другой - необходимостью стандартизации содержания в них углеводов (данный показатель не должен превышать значения 0,06 %, чтобы не происходило существенного закисления среды и изменения цвета индикатора вследствие ферментации сахаров самой питательной основы культивируемыми микроорганизмами), что требует подбора серий белковых гидролизатов по этому критерию.

В связи с вышеизложенным, актуальной представляется проблема разработки питательной среды указанного назначения на основе с низкой концентрацией углеводов из доступного и недорогого сырья. В качестве такой питательной основы нам представлялось целесообразным использовать разработанный белковый гидролизат – ПППД.

Основным параметром оптимизации состава данной среды является концентрация ПППД в ней. Для определения оптимума концентрации питательной основы в составе конструируемой глюкозо-лактозной агаризованной питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора колоний в качестве базовой модели была принята среда Клиглера, где вместо ферментативного пептона и мясного экстракта использовали ПППД с варьированием значений его концентраций по аминному азоту в оцениваемом диапазоне.

Отправной точкой для определения диапазона исследуемых значений концентрации питательной основы (по аминному азоту) в составе конструируемой среды (предположительно, включающего оптимум данного параметра) явилась суммарная концентрация аминного азота пептона ферментативного и мясного экстракта в среде Клиглера – 0,095%. Диапазон исследованных значений содержания ПППД, как основы в составе конструируемой питательной среды, охватывал его концентрации по аминному азоту $\pm 0,09\%$ от указанной точки с шагом в 0,005%.

Главными критериями отклика на изменение концентрации ПППД нами были выбраны несколько параметров. Во-первых, это - время закисления «столбика» (вследствие ферментации глюкозы) и скошенной части среды (которое происходит, в основном, вследствие ферментации лактозы) в пробирках, оцениваемое по переходу от тёмно-красной к жёлтой окраске индикатора. Во-вторых - время начала газообразования и продукции сероводорода (образование чёрного «кольца» или «зоны») в «столбике» среды в зависимости от используемого в работе штамма микроорганизма.

Указанные временные точки фиксировались относительно единой точки отсчёта, соответствующей моменту внесения инокулума культуры в среду.

Полученные данные (таблица 31) свидетельствуют, что с увеличением концентрации ПППД (по аминному азоту) в составе разрабатываемой среды удлиняется промежуток времени от внесения инокулума культуры до момента изменения реакции среды в «столбике» (в пробирке). Цвет изменялся от исходного – тёмно-красного до жёлтого вследствие ферментации глюкозы. Наиболее оптимальные значения времени закисления, соответствующие таковому на контрольной среде Клиглера, были выявлены при значении концентрации ПППД, равной 0,065%.

При увеличении концентрации ПППД от 0,005 до 0,12% (по аминному азоту) включительно в конструируемой среде происходило возрастание значений времени начала закисления скошенной её части (в пробирке) при росте на ней *E.coli 1015* от $5,05 \pm 0,42$ ч до $25,2 \pm 2,44$ ч. В случае же с *V.cholerae non O1/non O139 P-9741* и *P.vulgaris HX 19 (12932)* аналогичный процесс протекал при концентрациях ПППД от 0,005 % до 0,02% включительно, что объясняется наличием ферментации глюкозы и достаточно низкой буферной ёмкостью опытных образцов исследуемой среды.

В ходе проведения данной части работы (таблица 32) рассматривали зависимость начала газообразования от концентрации ПППД (по аминному азоту) на разрабатываемой среде штаммом *E.coli 1015*, а также начало продукции сероводорода штаммом *P.vulgaris HX 19 (12932)*. При этом выявили, что с увеличением концентрации питательной основы в составе среды удлиняется временной промежуток между внесением инокулума культуры *E.coli 1015* и моментом образования пузырьков газа и разрывов толщи «столбика» среды. Это, по всей видимости, возникает за счёт возрастания буферной ёмкости среды. При оптимальном значении концентрации ПППД (обеспечивающем достоверную регистрацию

Таблица 31

Влияние изменения концентрации питательной основы (ППД) в составе среды на время* её закисления

Концентрация ^Г ППД в среде, %	Время закисления среды (изменение окраски из тёмно-красного в жёлтый цвет), ч ($M \pm m$)					
	<i>Vibrio cholerae</i> non O1 P-9741		<i>Escherichia coli</i> 1015		<i>Proteus vulgaris</i> HX 19 (12932)	
	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»
1	2	3	4	5	6	7
0,005	12,5±0,52	5,0±0,45	5,05±0,42	5,05±0,42	13,4±0,75	6,2±0,44
0,01	14,2±0,44	5,6±0,42	5,6±0,38	5,6±0,38	15,4±1,04	7,5±0,72
0,015	16,0±0,50	6,0±0,53	6,1±0,53	6,1±0,53	17,2±0,75	8,1±0,66
0,02	18,0±1,40	6,8±0,65	7,4±0,64	7,2±0,58	19,8±1,58	8,6±0,72
0,025	-	6,7±0,35	8,1±0,72	7,9±0,63	22,1±2,04	8,9±0,53
0,03	-	7,2±0,55	9,5±0,81	8,4±0,72	-	9,4±0,55
0,035	-	7,4±0,51	10,5±0,40	9,8±0,73	-	11,4±0,94
0,04	-	7,5±0,54	11,0±0,39	10,2±0,72	-	12,2±1,01
0,045	-	8,9±0,55	11,2±0,42	10,6±0,42	-	12,8±1,02
0,05	-	10,1±0,94	11,4±0,90	10,9±0,51	-	13,1±1,19
0,055	-	11,2±0,92	11,3±0,62	11,0±0,70	-	13,8±1,18
0,06	-	12,8±0,86	12,1±0,75	11,7±0,78	-	14,1±1,25
0,065	-	13,5±0,65	12,5±0,55	11,9±0,84	-	14,0±1,29
0,07	-	14,2±0,45	13,1±1,22	12,1±0,64	-	14,5±1,33
0,075	-	15,1±0,64	13,8±1,26	12,4±0,76	-	15,0±1,21
0,08	-	15,8±0,72	14,2±1,33	13,8±1,01	-	15,4±1,46
0,085	-	16,4±1,22	15,0±1,32	14,2±1,21	-	15,9±1,49
0,09	-	18,5±1,31	16,4±1,42	15,4±1,35	-	16,2±1,53
0,095	-	22,1±1,82	17,1±1,60	16,8±1,48	-	16,9±1,55

Таблица 31 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
0,1	-	24,6±2,01	19,4±1,81	17,9±1,65	-	17,3±1,62
0,105	-	26,4±2,42	20,5±2,11	18,9±1,78	-	20,4±1,56
0,110	-	28,8±2,42	22,2±2,3	20,2±1,91	-	19,0±1,75
0,115	-	30,5±2,84	23,8±2,08	22,5±2,01	-	23,2±2,01
0,120	-	32,7±2,91	25,2±2,44	23,9±2,22	-	26,1±1,84
К	-	13,7±0,63	12,8±0,68	12,2±0,95	-	14,2±1,35

Примечания – а) К – контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры

Таблица 32

Влияние изменения концентрации ПППД в составе среды на время* начала газообразования и продукции H₂S

Концентрация ПППД в среде, %	Время начала газообразования, продукции H ₂ S, ч (M ± m)	
	<i>Escherichia coli</i> 1015 Образование газа в «столбике»	<i>Proteus vulgaris</i> HX19 (12932) Образование H ₂ S
1	2	3
0,005	3,0±0,25	-
0,01	3,5±0,15	-
0,015	4,9±0,35	-
0,02	5,3±0,31	-
0,025	5,6±0,40	-
0,03	6,2±0,53	-
0,035	7,1±0,55	-
0,04	7,9±0,61	25,2±2,05
0,045	8,2±0,70	22,4±1,83
0,05	8,8±0,67	19,9±1,75

Таблица 32 (окончание)

1	2	3
0,055	9,3±0,48	16,2±1,54
0,06	9,7±0,34	14,4±1,15
0,065	10,4±0,33	12,5±0,54
0,07	11,0±0,52	12,8±0,82
0,075	11,5±0,82	13,1±1,21
0,08	11,9±0,94	13,4±1,25
0,085	12,3±1,01	13,2±1,28
0,09	13,4±1,12	15,1±1,43
0,095	14,5±1,29	15,6±1,40
0,1	15,2±1,40	17,1±1,64
0,105	16,1±1,55	18,8±1,72
0,110	17,3±1,61	19,2±1,83
0,115	18,4±1,73	21,5±2,22
0,120	19,2±1,89	22,3±2,28
К	13,5±0,70	15,3±0,95

Примечания – а) К– контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры; г) концентрация ПППД в среде – в % по аминному азоту.

«столбика» конструируемой среды во временной точке, аналогичной таковой для контрольной среды Клиглера) - 0,065 % по аминному азоту время начала газообразования у штамма *E.coli 1015* составило $10,4 \pm 0,33$ ч, что позволяет зарегистрировать указанный феномен на опытной среде к моменту изменения цвета индикатора в «столбике».

При изучении зависимости начала продукции сероводорода штаммом *P.vulgaris HX 19 (12932)* от концентрации ПППД в конструируемой среде обнаружили, что образование чёрного преципитата сульфида железа в виде «кольца» или «зоны» начиналось при концентрации ПППД, равной 0,04 % (через $25,2 \pm 2,5$ ч от внесения инокулума) и было наиболее ранним и выраженным при концентрации питательной основы - 0,065% (уже через $12,5 \pm 0,54$ ч). Вероятно, на начальном этапе это происходит из-за увеличения концентрации питательной основы, и, следовательно, количества серосодержащих аминокислот. В ходе дальнейшего повышения концентрации ПППД (выше оптимального значения – 0,065% по аминному азоту) отмечается увеличение временного промежутка между внесением инокулума культуры в среду и образованием черного преципитата сульфида железа. Это, по всей видимости, происходит за счёт накопления щелочных продуктов при декарбосилировании аминокислот используемой питательной основы, что приводит к увеличению времени начала регистрации образования сероводорода.

Как видно из данных, представленных в таблицах 31 и 32, оптимум концентрации ПППД в конструируемой глюкозо-лактозной агаризованной питательной среде для идентификации холерного вибриона находится в точке 0,065 % по аминному азоту. Время учёта результатов при данном значении содержания ПППД в разрабатываемой питательной среде полностью соответствует таковому при использовании контрольной среды Клиглера.

Оптимальную концентрацию глюкозы в составе конструируемой среды определяли относительно найденного в предыдущей серии экспериментов

частного оптимума содержания ПППД в ней (0,065 % по аминному азоту) согласно метода Гаусса-Зейделя [435]. Для определения оптимума концентрации глюкозы в составе конструируемой глюкозо-лактозной агаризованной питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора колоний исследовали концентрации указанного углевода в составе среды в диапазоне значений от 0 до 1,0% с шагом 0,05% (в него вошло значение концентрации глюкозы в среде Клиглера). Критериями отклика на изменение значений исследуемого параметра оптимизации, как и в предыдущих опытах, нами были выбраны показатели времени закисления «столбика» и скошенной части среды в пробирках оцениваемые по переходу от тёмно-красной к жёлтой окраске индикатора; а также показатели времени образования чёрного преципитата сульфида железа в виде «кольца» или «зоны» в столбике среды (в пробирках).

Результаты исследования изменений времени закисления «столбика» и скошенной части в зависимости от концентрации глюкозы на разрабатываемой среде представлены в таблице 33. Анализ полученных в этой части исследования данных свидетельствует, что с увеличением концентрации глюкозы в составе конструируемой среды укорачивался промежуток времени от внесения инокулума до момента изменения реакции среды в «столбике» (в пробирке). Цвет изменялся от исходного – тёмно-красного до жёлтого, что свидетельствовало об образовании кислых продуктов при ферментации глюкозы и лактозы (в случае с *E.coli 1015* при нулевой концентрации глюкозы в среде).

Нами было отмечено, что при увеличении концентрации глюкозы от 0,15 % до 1,0 % включительно происходило закисление скошенной части вариантов разрабатываемой среды при культивировании на них *V.cholerae non O1/non O139 P-9741* и *P.vulgaris HX 19 (12932)*. Время закисления укорачивалось при увеличении концентрации вышеупомянутого углевода в составе среды. Данный факт можно объяснить низкой буферной ёмкостью

Таблица 33

Влияние изменения концентрации глюкозы (от 0 до 1%) в составе разрабатываемой среды на время* её закисления

Концентрация ^Г глюкозы в среде, %	Время закисления среды (изменение окраски из тёмно-красного в жёлтый цвет), ч (M ± m)					
	Vibrio cholerae non O1 P-9741		Escherichia coli 1015		Proteus vulgaris HX 19 (12932)	
	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»
1	2	3	4	5	6	7
0	-	-	13,4±1,05	12,2±1,13	-	-
0,05	-	12,9±0,84	12,7±0,92	10,8±0,52	-	13,0±1,19
0,1	-	10,5±0,53	12,1±1,03	9,7±0,84	-	11,2±1,08
0,15	17,6±1,62	9,2±0,73	11,2±1,08	9,5±0,79	17,8±1,45	10,9±0,92
0,2	15,2±1,40	8,5±0,63	10,7±0,91	9,3±0,81	12,6±1,03	9,3±0,74
0,25	14,3±1,30	8,1±0,71	9,8±0,33	8,6±0,72	11,8±0,71	9,0±0,81
0,3	12,3±1,15	7,8±0,32	8,7±0,56	8,3±0,69	10,5±0,88	8,7±0,74
0,35	10,2±0,82	7,4±0,56	8,4±0,41	7,9±0,61	9,9±0,75	8,3±0,51
0,4	9,3±0,71	7,2±0,64	7,9±0,21	7,3±0,59	9,4±0,81	7,6±0,52
0,45	9,0±0,75	7,1±0,35	7,2±0,48	7,4±0,68	8,7±0,71	8,0±0,71
0,5	8,8±0,53	6,8±0,53	6,8±0,35	7,1±0,58	8,3±0,66	7,4±0,45
0,55	8,3±0,62	6,4±0,45	6,6±0,42	6,3±0,35	7,8±0,64	6,9±0,32
0,6	8,1±0,61	6,1±0,18	6,3±0,11	5,9±0,31	7,4±0,69	6,6±0,41
0,65	7,9±0,42	5,9±0,22	6,5±0,53	6,1±0,41	7,2±0,63	6,2±0,38
0,7	7,7±0,42	5,7±0,47	6,7±0,51	5,8±0,25	6,7±0,45	6,4±0,49
0,75	8,0±0,48	5,5±0,32	6,6±0,59	6,0±0,47	6,1±0,51	5,8±0,31
0,8	7,4±0,64	5,2±0,28	6,3±0,22	5,5±0,43	5,9±0,39	6,0±0,40
0,85	7,6±0,68	5,6±0,44	5,9±0,35	5,3±0,39	5,6±0,41	5,6±0,25
0,9	7,1±0,63	5,1±0,38	5,5±0,48	5,4±0,42	5,4±0,43	5,3±0,33
0,95	6,8±0,52	5,0±0,18	5,6±0,31	4,9±0,31	5,5±0,45	5,0±0,21

Таблица 33 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
1,0	6,5±0,48	4,7±0,35	5,2±0,45	4,5±0,39	5,2±0,41	4,8±0,12
К	-	13,7±0,63	12,8±0,68	12,2±0,95	-	14,2±1,35

Примечания – а) К– контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры.

разрабатываемой среды при фиксированном значении концентрации ПППД (0,065 % по аминному азоту) и увеличением концентрации кислых продуктов, которые образуются при утилизации глюкозы. Наиболее оптимальные значения времени закисления, совпадающие с таковыми на контрольной среде Клиглера, были выявлены при значении концентрации глюкозы, равной 0,1%.

В процессе проведения данной части работы мы также рассматривали (таблица 34) зависимость начала газообразования при культивировании *E.coli 1015* и продукции сероводорода в процессе выращивания в разрабатываемой среде *P.vulgaris HX 19 (12932)*.

Таблица 34

Влияние изменения концентрации глюкозы (от 0 до 1%) в составе разрабатываемой среды на время* начала газообразования и продукции H₂S

Концентрация глюкозы в среде, %	Время начала газообразования и продукции H ₂ S, ч (M ± m)	
	<i>Escherichia coli 1015</i>	<i>Proteus vulgaris HX19 (12932)</i>
	Образование газа в «столбике»	Образование H ₂ S
1	2	3
0	19,5±1,72	-
0,05	14,3±1,21	26,8±2,02
0,1	10,5±0,23	13,1±1,12
0,15	9,2±0,81	12,5±1,01
0,2	8,5±0,64	12,0±1,11
0,25	8,3±0,71	11,7±0,94
0,3	7,9±0,65	11,5±1,09
0,35	7,4±0,58	11,1±0,92
0,4	6,9±0,44	10,5±0,84
0,45	6,7±0,33	9,8±0,66
0,5	6,4±0,42	9,7±0,64
0,55	6,2±0,51	10,2±0,78
0,6	7,2±0,38	9,5±0,54
0,65	6,6±0,41	9,7±0,61

Таблица 34 (окончание)

1	2	3
0,7	7,3±0,55	9,2±0,49
0,75	7,2±0,43	8,7±0,32
0,8	5,2±0,31	8,4±0,63
0,85	4,7±0,28	8,2±0,70
0,9	3,9±0,19	8,5±0,68
0,95	3,5±0,22	7,9±0,51
1,0	3,2±0,27	6,8±0,44
K	13,5±0,70	15,3±0,95

Примечания – а) K– контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры.

При этом выявили, что образование газа в «столбике» *E.coli 1015* на варианте среды без глюкозы можно объяснить наличием лактозы (содержащейся, как и в базовой модели - среде Клиглера), которая утилизируется данным микроорганизмом с образованием кислоты и газа в анаэробных условиях. Также обнаружили, что с увеличением концентрации глюкозы в конструируемой среде укорачивался временной промежуток между внесением культуры *E.coli 1015* до момента образования пузырьков газа и разрывов толщи «столбика» среды. Наиболее оптимальное значение данного временного промежутка ($10,5\pm 0,23$ ч у *E.coli 1015*) зафиксировали на том варианте разрабатываемой среды, где концентрация глюкозы была равной 0,1 %.

При изучении зависимости начала продукции сероводорода штаммом *P.vulgaris HX 19 (12932)* от концентрации глюкозы в конструируемой среде обнаружили, что образование чёрного преципитата сульфида железа в виде «кольца» или «зоны» начиналось при концентрации данного углевода, равной 0,05 % ($26,8\pm 2,02$ ч). С дальнейшим увеличением этого параметра отмечали постепенное сокращение временного промежутка между внесением культуры используемого тест - штамма до момента начала образования сероводорода. Так, при концентрации глюкозы, равной 1,0 %, значение

длительности данного промежутка составило $6,8 \pm 0,44$ ч. Время начала продукции сероводорода ($13,1 \pm 1,12$ ч) штаммом *P. vulgaris* HX 19 (12932) на разрабатываемой среде, соответствующее таковому на контрольной среде Клиглера, зафиксировали на том варианте среды, где концентрация глюкозы составляла 0,1 %.

Таким образом, результаты второго этапа исследований по оптимизации состава глюкозо–лактозной агаризованной питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора колоний показали, что концентрация глюкозы, равная 0,1 % (1,0 г/л) является оптимальной. Это значение совпадает с таковым в контрольной среде Клиглера.

Для определения оптимума концентрации лактозы в составе конструируемой среды на основе ПППД в качестве базовой модели была принята среда Клиглера, где концентрация данного углевода составляет 1,0 %, что и было принято нами за отправную точку, предположительно включающую оптимум данного параметра. Диапазон исследованных значений содержания лактозы в составе разрабатываемой питательной среды охватывал концентрации от 0% до 3,0% с шагом в 0,1%. Критериями отклика на изменение значений исследуемого параметра оптимизации, как и в предыдущих опытах, нами были выбраны показатели времени закисления «столбика» и скошенной части среды в пробирках, оцениваемые по переходу от тёмно-красной к жёлтой окраске индикатора; а так же показатель времени образования сероводорода, оцениваемый по появлению чёрного преципитата сульфида железа в виде «кольца» или «зоны» в столбике среды (в пробирках).

Результаты исследования изменений времени закисления «столбика» и скошенной части в зависимости от концентрации лактозы (в диапазоне от 0 до 3,0 % включительно) на разрабатываемой среде представлены в таблицах 35, 36.

Таблица 35

Влияние изменения концентрации лактозы (от 0 до 1 %) в составе разрабатываемой среды на время* её закисления

Концентрация лактозы в среде, %	Время закисления среды (изменение окраски из тёмно-красного в жёлтый цвет), ч ($M \pm m$)					
	<i>Vibrio cholerae non O1 P-9741</i>		<i>Escherichia coli 1015</i>		<i>Proteus vulgaris HX 19 (12932)</i>	
	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»
0	-	9,6±0,65	18,1±1,65	16,5±1,53	-	10,9±0,90
0,1	-	9,8±0,53	17,9±1,63	16,2±1,51	-	9,8±0,75
0,2	-	9,5±0,44	16,9±1,44	15,3±1,33	-	10,1±0,84
0,3	-	9,7±0,35	15,8±1,32	14,1±1,12	-	11,3±0,95
0,4	-	10,2±0,78	15,2±1,27	13,4±1,22	-	10,7±0,88
0,5	-	10,0±0,23	14,9±1,23	13,1±1,25	-	9,9±0,63
0,6	-	10,6±0,55	14,4±1,35	13,2±1,19	-	10,2±0,97
0,7	-	9,6±0,44	14,1±1,29	12,9±1,01	-	9,7±0,82
0,8	-	9,9±0,35	13,9±1,21	12,7±1,03	-	10,8±0,86
0,9	-	9,5±0,58	13,1±1,19	11,2±0,97	-	11,2±1,01
1,0	-	10,4±0,52	12,2±0,83	10,1±0,75	-	11,5±1,05
К	-	13,7±0,63	12,8±0,68	12,2±0,95	-	14,2±1,35

Примечания – а) К– контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры.

Таблица 36

Влияние изменения концентрации лактозы (от 1 до 3 %) в составе разрабатываемой среды на время* её закисления

Концентрация лактозы в среде, %	Время закисления среды (изменение окраски из тёмно-красного в жёлтый цвет), ч ($M \pm m$)					
	<i>Vibrio cholerae non O1 P-9741</i>		<i>Escherichia coli 1015</i>		<i>Proteus vulgaris HX 19 (12932)</i>	
	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»	Скошенная часть	«Столбик»
1	2	3	4	5	6	7
1,0	-	10,4±0,52	12,2±0,83	10,1±0,75	-	11,5±1,05
1,1	-	10,2±0,48	12,4±0,91	9,9±0,71	-	13,7±1,11
1,2	-	10,3±0,32	11,9±1,01	10,3±0,85	-	12,8±1,07
1,3	-	9,9±0,79	12,0±0,99	9,8±0,75	-	13,1±0,91
1,4	-	10,0±0,91	12,3±0,84	10,4±0,98	-	12,9±0,92
1,5	-	10,4±0,82	12,5±0,88	9,7±0,78	-	13,6±1,12
1,6	-	9,8±0,72	12,1±1,11	10,2±0,94	-	12,6±1,01
1,7	-	9,7±0,69	11,9±0,95	10,1±0,90	-	13,4±1,22
1,8	-	9,5±0,71	12,2±0,78	10,4±0,82	-	12,9±0,95
1,9	-	10,1±0,51	12,4±0,87	9,9±0,53	-	13,8±1,18
2,0	-	9,8±0,69	12,7±0,84	10,9±1,01	-	12,9±1,09

Таблица 36 (окончание)

1	2	3	4	5	6	7
2,1	-	9,7±0,55	13,8±1,22	12,2±1,05	-	12,8±1,20
2,2	-	9,5±0,81	14,7±1,31	13,1±1,22	-	13,7±1,25
2,3	-	10,1±0,88	15,7±1,40	14,7±1,34	-	14,9±1,37
2,4	-	10,3±0,56	16,2±1,51	15,8±1,38	-	15,7±1,48
2,5	-	10,5±0,62	18,7±1,65	17,4±1,62	-	16,8±1,61
2,6	-	9,9±0,71	20,1±1,89	18,9±1,74	-	18,1±1,72
2,7	-	10,4±0,87	22,4±2,05	20,6±1,92	-	19,4±1,83
2,8	-	10,6±0,90	24,5±2,23	21,8±2,06	-	22,3±2,11
2,9	-	10,1±0,41	26,8±2,42	23,4±2,25	-	24,7±2,33
3,0	-	9,8±0,73	29,1±2,81	25,7±2,47	-	26,2±2,45
К	-	10,3±0,64	12,5±0,75	10,4±0,67	-	13,6±0,96

Примечания – а) К– контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в)
* - от момента внесения культуры.

Анализ полученных в этой части исследования данных свидетельствует, что с увеличением концентрации исследуемого ингредиента в указанном диапазоне в составе конструируемой среды промежуток времени от внесения инокулума тест – штамма *V.cholerae non O1/ non O139 P-9741* до момента изменения таковым реакции среды в «столбике» (в пробирке) практически не изменялся.

При росте *E.coli 1015* на вариантах разрабатываемой питательной среды с концентрацией лактозы от 0 до 1,0 % включительно наблюдали тенденцию укорачивания временного промежутка от внесения инокулума до момента изменения реакции среды в «столбике» (в пробирке) от 16,5±1,53 ч до 10,1±0,75 ч. С последующим изменением выбранного параметра от (1,1 % до 2,0 %) значение вышеуказанного промежутка времени оставалось практически на постоянном уровне. В ходе дальнейшего увеличения концентрации лактозы (от 2,1 до 3,0 % включительно) регистрировали удлинение данного отрезка времени от 12,2±1,05 ч до 25,7±2,47 ч.

В эксперименте с использованием *P.vulgaris HX 19 (12932)* этот процесс протекал следующим образом. Так, при культивировании этого штамма на вариантах разрабатываемой среды с концентрацией указанного выше углевода от 0 до 2,2 % величина промежутка времени, за которое

происходит закисление «столбика» среды (в пробирке), изменялась незначительно. Но, с последующим (до 3,0% включительно) увеличением выбранного нами параметра (концентрации лактозы), отмечали постепенное возрастание значения времени начала закисления «столбика» среды от $14,9 \pm 1,37$ ч до $26,2 \pm 2,45$ ч. Наиболее оптимальные значения данного временного промежутка, соответствующие таковым на контрольной среде Клиглера ($10,1 \pm 0,75$ ч у *E.coli 1015* и $11,5 \pm 1,05$ ч у *P.vulgaris HX 19 (12932)*), зафиксировали на том варианте разрабатываемой среды, где концентрация лактозы была равной 1,0 %.

Нами было отмечено, что при увеличении концентрации лактозы от 0 до 3,0 % включительно не происходило закисления скошенной части вариантов разрабатываемой среды при культивировании на них *V.cholerae non O1/non O139 P-9741* и *P.vulgaris HX 19 (12932)*. Данный факт можно объяснить тем, что эти два штамма не утилизируют лактозу.

При использовании *E.coli 1015* в настоящей части исследования выявили, что с изменением выбранного параметра в разрабатываемой среде от 0 до 1,0 % включительно время начала закисления скошенной части среды укорачивалось от $18,1 \pm 1,65$ ч до $12,2 \pm 0,83$ ч. С последующим увеличением концентрации лактозы (от 1,1 % до 3,0 % включительно) время начала закисления скошенной части среды увеличивалось от $13,8 \pm 1,22$ ч до $29,1 \pm 2,81$ ч. Наиболее оптимальное значение времени начала закисления ($12,2 \pm 0,83$ ч) отметили на том варианте среды, где концентрация упомянутого выше углевода составляла 1,0 %.

В процессе проведения данной части работы мы также рассматривали (таблицы 37 и 38) зависимость времени начала газообразования от концентрации лактозы на разрабатываемой среде штаммом *E.coli 1015* и продукции сероводорода штаммом *P.vulgaris HX 19 (12932)*. При этом выявили, что образование газа в «столбике» среды штаммом *E.coli 1015* на варианте среды без лактозы можно объяснить наличием глюкозы, которая

утилизируется данным микроорганизмом с образованием кислоты и газа в анаэробных условиях.

Таблица 37

Влияние изменения концентрации лактозы (от 0 до 1%) в составе разрабатываемой среды на время* начала газообразования и продукции H₂S

Концентрация лактозы в среде, %	Время начала газообразования, продукции H ₂ S, ч (M ± m)	
	<i>Escherichia coli</i> 1015	<i>Proteus vulgaris</i> HX19 (12932)
	Образование газа в «столбике»	Образование H ₂ S
0	18,4±1,78	12,9±1,01
0,1	17,7±1,64	13,4±1,18
0,2	16,2±1,49	13,0±0,91
0,3	15,7±1,41	12,5±0,88
0,4	14,4±1,27	12,9±0,95
0,5	13,1±1,19	13,0±0,74
0,6	12,9±1,08	13,1±1,22
0,7	12,6±0,97	14,0±1,21
0,8	12,2±0,88	13,8±1,15
0,9	11,4±0,75	13,7±1,11
1,0	10,6±0,38	13,3±1,10
К	10,5±0,70	13,5±0,95

Примечания – а) К– контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры.

Таблица 38

Влияние изменения концентрации лактозы (от 1 до 3%) в составе разрабатываемой среды на время* начала газообразования и продукции H₂S

Концентрация лактозы в среде, %	Время начала газообразования, продукции H ₂ S, ч (M ± m)	
	<i>Escherichia coli</i> 1015	<i>Proteus vulgaris</i> HX19 (12932)
	Образование газа в «столбике»	Образование H ₂ S
1,0	10,6± 0,38	13,3±1,10
1,1	10,5±0,85	13,4±1,08
1,2	10,8±0,64	13,7±0,92
1,3	10,2±0,73	13,6±1,06
1,4	10,4±0,82	13,5±0,89
1,5	10,0±0,74	14,4±1,31
1,6	10,7±0,68	14,2±1,03
1,7	10,3±0,91	13,1±0,81
1,8	10,6±0,50	14,1±1,25

Таблица 38 (окончание)

1,9	10,1±0,49	14,3±1,14
2,0	10,2±0,64	14,1±1,11
2,1	12,5±1,02	14,5±1,21
2,2	13,4±0,98	15,3±1,33
2,3	15,0±1,32	16,8±1,53
2,4	16,2±1,41	17,9±1,62
2,5	17,5±1,54	18,5±1,71
2,6	20,1±1,92	20,9±1,96
2,7	20,7±1,83	21,3±2,02
2,8	22,2±2,09	23,3±2,21
2,9	23,9±2,19	26,2±2,38
3,0	24,5±2,25	27,1±2,51
К	10,5±0,70	13,5±0,95

Примечания – а) К– контрольная среда Клиглера; б) « - » - отсутствие реакции; в) * - от момента внесения культуры.

Также обнаружили, что с увеличением концентрации лактозы от 0,1 % до 1,0 % в конструируемой среде укорачивался временной промежуток между внесением культуры *E.coli 1015* до момента образования пузырьков газа и разрывов толщи «столбика» среды от 16,2±1,51 ч до 10,1±0,75 ч соответственно. Нами было отмечено, что увеличение концентрации лактозы от 1,1 до 2,0 % включительно не вызывало изменений времени начала газообразования. При дальнейшем изменении выбранного параметра (от 2,1 % до 3,0 % включительно) регистрировали возрастание значений времени начала газообразования от 12,5±1,02 ч до 24,5±2,24 ч.

При исследовании зависимости начала продукции сероводорода штаммом *P.vulgaris HX 19 (12932)* от концентрации упомянутого выше углевода обнаружили, что образование чёрного преципитата сульфида железа в виде «кольца» или «зоны» начиналось ещё при отсутствии лактозы в среде. В ходе увеличения концентрации лактозы в разрабатываемой среде от 0,1 % до 2,0 % включительно выявили, что значение временного промежутка между внесением инокула культуры и образованием преципитата практически не изменялось. Но с дальнейшим увеличением концентрации лактозы в разрабатываемой среде (от 2,1 % до 3,0 %

включительно) мы наблюдали увеличение времени начала образования сероводорода от $14,5 \pm 1,21$ ч до $27,1 \pm 2,51$ ч.

Таким образом, результаты третьего этапа исследований по оптимизации состава глюкозо – лактозной агаризованной питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора колоний показали, что концентрация лактозы, равная 1,0 % (10 г/л) является оптимальной. Это значение совпадает с таковым в контрольной среде Клиглера.

В результате проведённой оптимизации был сформирован окончательный состав глюкозо - лактозной агаризованной питательной среды на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний (из расчёта на 1,0 л):

- ПППД – 0,065 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 5,0 г;
- D – глюкоза кристаллическая – 1,0 г;
- Альфа – D - лактоза кристаллическая – 10 г;
- натрий сернистоокислый безводный – 0,4 г;
- натрий серноватистоокислый 5 – водный – 0,16 г;
- железо (II) серноокисное 7 – водное - 0,5 г;
- феноловый красный (0,2 % раствор в 50 % этиловом спирте) – 12 мл;
- агар-агар бактериологический – 11,5 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,1$.

Было проведено сравнительное изучение разработанной питательной среды и контрольной среды Клиглера по основному биологическому показателю данных сред – их дифференцирующим свойствам. Оценку данного показателя осуществляли в отношении 28 музейных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп, а также двух штаммов других микроорганизмов: *Escherichia coli* 1015, *Proteus vulgaris* HX 19 (12932).

Результаты сравнительного изучения сконструированной среды и контрольной среды Клиглера по дифференцирующим свойствам в отношении указанных музейных штаммов представлены в таблице 39. Анализ результатов проведённого исследования свидетельствует, что разработанная среда, как и контрольная среда Клиглера, позволяет дифференцировать все использованные штаммы *V.cholerae* (проявившие типичное для данного вида свойство – способность ферментировать глюкозу с образованием кислых продуктов без газа в «столбике» среды, а так же отсутствие ферментации лактозы и продукции сероводорода) от заведомо отличающихся от них штаммов *E.coli 1015* и *P.vulgaris HX 19 (12932)*. Штамм *E.coli 1015* ферментирует глюкозу (с образованием кислоты и газа) и лактозу, характеризуется отсутствием способности продуцировать сероводород. Штамм *P.vulgaris HX 19 (12932)* ферментирует глюкозу, не способен ферментировать лактозу, образует сероводород в «столбике» среды. Аналогичные исследования были проведены при идентификации 134 штаммов холерного вибриона, выделенных из воды и от людей в разных регионах России. Все исследованные штаммы *V.cholerae* проявляли типичные для них признаки: способность ферментировать глюкозу с образованием кислоты без газа (в «столбике» среды), отсутствие способности к ферментации лактозы, отсутствие продукции сероводорода.

Таким образом, разработанная глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона на этапе отбора подозрительных колоний не уступала контрольной среде Клиглера по дифференцирующим свойствам в отношении всех исследованных штаммов микроорганизмов.

Таблица 39

Результаты сравнительного изучения разработанной на основе ПППД глюкозо-лактозной среды и контрольной среды Клигlera по дифференцирующим свойствам

Штаммы	Разработанная среда на основе ПППД				Контрольная среда Клигlera			
	Скошенная часть	«Столбик»	Образование газа в «столбике»	Образование H ₂ S	Скошенная часть	«Столбик»	Образование газа в «столбике»	Образование H ₂ S
<i>V.cholerae classical</i> 3 штамма	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>V.cholerae El Tor</i> 11 штаммов	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>V.cholerae El Tor RO-</i> <i>вариант</i> 1 штамм	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>V.cholerae O139</i> 7 штаммов	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>V.cholerae non O1/ non</i> <i>O139</i> 6 штаммов	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> 1 штамм	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>P. vulgaris</i> 1 штамм	-	+	+	+	-	+	+	+

Примечания – а) «+» - положительная реакция; б) «-» - отсутствие реакции.

6.9 Результаты апробации разработанного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона в ходе тактико-специального учения СПЭБ

Целью работы явилась апробация созданного на основе ПППД комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона в ходе опытно-исследовательского тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ на тему: «Выдвижение, развёртывание и организация работы СПЭБ на базе мобильного комплекса (МК СПЭБ) в автономных условиях по индикации и идентификации холерных вибрионов».

В настоящем исследовании были использованы разработанные на основе ПППД питательные среды, входящие в состав нового комплекса:

- Щелочной агар;
- Жидкая накопительная среда в концентрированном (аналог основного раствора пептона) и разведенном (аналог 1% пептонной воды) вариантах;
- Бульон для культивирования холерного вибриона;
- Питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку расщепления глюкозы в аэробных и анаэробных условиях;
- Питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот;
- Агаризованная питательная среда для идентификации холерного вибриона по признакам ферментации глюкозы и лактозы.

Контрольными средами были выбраны «Агар щелочной сухой», «Пептон основной сухой», «Питательная среда для первичной идентификации энтеробактерий - агар Клиглера сухой» производства ФГУП НПО «Микроген», приготовленные по инструкциям производителя. В связи с отсутствием коммерческих аналогов в качестве контрольных были также использованы среды лабораторного изготовления: Мёллера [467] и Хью-

Лейфсона [430]. Все контрольные среды были предварительно протестированы по основным биологическим показателям на соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06 [144].

При подготовке ТСУ СПЭБ, проведённого в период с 26 по 30 июля 2010 года, специалистами института была разработана оригинальная легенда, согласно которой имел место занос холеры на территорию Южного федерального округа Российской Федерации (в г.Ростов-на-Дону) гражданкой Х., прибывшей из Индии, где она находилась в командировке. Был введён в действие режим ЧС, реализованы схемы оповещения и сбора личного состава СПЭБ и осуществлена мобилизация бригады с целью проведения мероприятий по локализации и ликвидации возникшей вспышки холеры. В ТСУ приняли участие 46 членов СПЭБ и сотрудников института, были задействованы восемь единиц автотранспорта, в том числе четыре мобильных лаборатории на базе шасси автомобиля КАМАЗ 43118 и прицепа СЗАП 8305: «Индикационная лаборатория», «Бактериологическая лаборатория», «Блок поддержки бактериологических исследований» и «Универсальный штабной жилой модуль». После совершения марша и прибытия колонны в пункт дислокации полевого лагеря СПЭБ было проведено развёртывание подразделений бригады на базе указанных мобильных лабораторий для работы в автономном режиме. Электроснабжение полевого лагеря СПЭБ осуществлялось с помощью четырёх штатных дизельных электрогенераторов мощностью от 9,0 до 12,0 кВт/ч. Вода для обеспечения функционирования мобильных лабораторий и хозяйственно-бытовых нужд была резервирована во встроенных ёмкостях каждого модуля, заполненных через быстроразъёмные соединения.

Личным составом СПЭБ согласно требованиям СП 3.1.1.2521-09 [255] проведено обследование эпидемического очага, разработан оперативный план противоэпидемических мероприятий. Сотрудниками бригады было организовано выявление и контроль исполнения медицинского наблюдения

за 30 лицами, контактировавшими с больными и вибрионосителями, отбор точечных проб из сети пунктов отбора проб воды р.р. Дон и Темерник.

Исследование 20 поступивших учебных проб, в том числе, 10 проб из реальных объектов окружающей среды (вода поверхностных водоёмов и стоков) и 10 проб (семь из которых были искусственно контаминированы токсигенным штаммом *V.cholerae El Tor 5879* до конечной концентрации в пробе от 10^3 до 10^7 микробных клеток / мл), имитирующих, согласно легенде, клинический материал от больных, вибрионосителей и лиц, контактировавших с ними, осуществляли в соответствии с требованиями МУК 4.2.2218-07 [6] с использованием всех современных методов, рекомендованных практическим руководством по лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней [170]. Посев материала с целью биологического обогащения и последующего выделения штаммов *V.cholerae* проводили параллельно на опытные (Щелочной агар и Жидкая накопительная среда на основе ПППД) и контрольные (приготовленные по инструкции производителя «Пептон основной сухой», 1 % пептонная вода из него и «Агар щелочной сухой») питательные среды. Идентификацию подозрительных колоний и выделенных культур проводили также параллельно с использованием опытных (Питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку расщепления глюкозы в аэробных и анаэробных условиях; Питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот; Агаризованная питательная среда на основе ПППД для идентификации холерного вибриона по признакам ферментации глюкозы и лактозы) и контрольных (агар Клигlera, среда Хью-Лейфсона, среда Мёллера) дифференциально-диагностических сред.

Исследование поступивших в ходе ТСУ учебных проб было проведено на базе мобильных лабораторий СПЭБ «Индикационная лаборатория» и «Бактериологическая лаборатория». Использование разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред для диагностики холеры

позволило выделить и идентифицировать семь токсигенных штаммов *V.cholerae El Tor* из 10 проб, имитирующих клинический материал от больных, вибрионосителей и контактных, а также один атоксигенный штамм *V.cholerae El Tor* из 10 проб реальных объектов окружающей среды. При параллельном применении контрольных сред из проб, имитирующих клинический материал, были изолированы и идентифицированы как *V.cholerae El Tor* (токсигенные) только пять штаммов, а в пробах объектов окружающей среды холерный вибрион не был обнаружен.

На средах разработанного комплекса холерный вибрион был выделен из всех семи искусственно контаминированных штаммом *V.cholerae El Tor* 5879 проб (с конечной концентрацией данного микроорганизма 10^3 , 10^5 и 10^7 микробных клеток / мл), в то время как с помощью контрольного комплекса сред возбудитель холеры был изолирован только из проб, содержавших указанный штамм *V.cholerae* в концентрациях 10^5 и 10^7 микробных клеток / мл. Этот факт свидетельствует о более высокой чувствительности опытных сред на основе ПППД (Щелочного агара и Жидкой накопительной среды) по сравнению с контрольными средами аналогичного назначения (приготовленными по инструкции производителя «Агаром щелочным сухим», «Пептоном основным сухим» и 1 % пептонной водой из него).

Выделение в ходе ТСУ атоксигенного штамма *V.cholerae El Tor* из реальной пробы воды открытого водоёма только с помощью сред разработанного комплекса подтверждает полученные ранее в результате многолетнего мониторинга водных объектов данные [186] о преимуществе этих сред перед используемыми в микробиологической практике.

Применение входящих в состав разработанного комплекса цветных дифференциально-диагностических питательных сред на основе ПППД (Питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку расщепления глюкозы в аэробных и анаэробных условиях; Питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот; Агаризованная питательная среда для идентификации

холерного вибриона по признакам ферментации глюкозы и лактозы) для идентификации изолированных в процессе настоящего ТСУ штаммов холерного вибриона показало, что по дифференцирующим свойствам и срокам ферментации углеводов и аминокислот данные питательные среды не отличались от аналогичных контрольных сред (Хью-Лейфсона, Мёллера, Клиглера).

Комплексная оценка результатов исследования поступивших проб (в том числе, полученных при использовании разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона) в развёрнутых мобильных лабораториях позволила своевременно дать адекватную оценку сложившейся ситуации по заносу холеры на территорию Южного федерального округа и откорректировать оперативный план противоэпидемических мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию эпидемического очага.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе представлены результаты анализа материалов отечественной и зарубежной литературы, а также экспериментальные данные, позволяющие значительно расширить представления об использовании дрожжей хлебопекарных в качестве современной основы для производства питательных сред медицинского назначения. Лабораторная практика имеет в своем арсенале тысячи методов исследования и питательных сред для микробиологической работы [400]. Вместе с тем, на рынке медицинских изделий продолжает сохраняться конкуренция, обусловленная их совершенствованием. Анализ материалов, представленных в изученной нами научной литературе, позволяет говорить о том, что в биомедицинской отрасли видное место занимают дрожжи [384, 404]. По генотипическим признакам дрожжи занимают промежуточное положение между растениями и микробами, что отражается на их фенотипическом разнообразии [224, 416]. Среди представителей одного вида много гибридных штаммов и рас [429]. Хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* обладают широкими возможностями модификации синтеза ферментов, необходимых для адаптации, что позволяет постоянно совершенствовать приёмы управления их выращиванием в производстве [24, 374, 455]. Большое внимание уделяют разработке методов инженерной модификации генома, позволяющих создавать новые варианты дрожжевых белков и штаммы *S.cerevisiae* - их суперпроизводители [321, 372, 352]. С 1927 по 2008 гг. было запатентовано более 337 штаммов, предназначенных для нужд дрожжевой индустрии [416]. Подбор штаммов дрожжей хлебопекарных позволяет обеспечить наиболее эффективное и экономически выгодное достижение целей конкретного производства. Из такого сырья получают дрожжевые препараты разного состава, в том числе, – азотосодержащие: аминокислоты, пептиды, белки, нуклеиновые кислоты и витамины. По некоторым данным, 500 г сухих хлебопекарных дрожжей по

содержанию белка, эквивалентны 1 кг свиного мяса, и экономичность использования этого микробиологического сырья как источника питательных веществ очевидна [314, 351]. В результате анализа вышеперечисленных аргументов, наш выбор сырья для создания инновационной питательной основы сред для холерного вибриона и чумного микроба остановился на дрожжах хлебопекарных *S.cerevisiae*. Исходным продуктом для получения нового белкового гидролизата являлись выпускаемые отечественными предприятиями «Дрожжи хлебопекарные прессованные» [75].

Как известно, замена традиционной продукции происходит не стихийно, а при соблюдении правил, главным из которых считается сохранение эквивалентности по чётко обозначаемому набору свойств [12]. В Ростовском-на-Дону противочумном институте разработка панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) в качестве основы сред для диагностики опасных инфекционных болезней ведётся с 1999 года. Мировая практика свидетельствует о том, что оптимальным вариантом этих основ являются пептоны, которые изготавливают из мяса, субпродуктов, казеина, рыбы. Это требовало проведения в нашей работе сравнения разнообразных пептонов коммерческого производства с экспериментальным белковым гидролизатом. Состав и количественное содержание азотистых продуктов в препарате зависит не только от сырья, но и технологии его обработки - экстракцией, ферментативным расщеплением (в том числе, методом аутолиза) или с помощью кислот и щелочей. Существует мнение [249], согласно которому есть отставание в использовании современных знаний в области микробиологии и биохимии коммерческими структурами. В частности, это имеет отношение к практическому применению процесса аутолиза [458, 515, 518]. Для гидролитической активности *S.cerevisiae* характерно то, что активность внутриклеточных протеолитических ферментов в 10-20 раз выше активности внеклеточных протеаз [39]. Гибель части клеток при таких обстоятельствах приводит к их дезинтеграции, разрушению и выходу во внешнюю среду веществ. Изготовление

коммерческих дрожжевых аутолизатов и экстрактов имеет существенные недостатки: низкий выход конечного продукта, неопределённость состава ферментолизата, технические трудности при разделении жидкой и твёрдой фазы [514]. Изложенные обстоятельства подчеркивают важность и значимость проводимого в последнее время усовершенствования технологии получения сред на основе аутолизата хлебопекарных дрожжей, в том числе для культивирования чумного микроба [6, 516]. С учетом современных тенденций в области изготовления питательных основ, нами был избран путь направленного ферментативного гидролиза хлебопекарных дрожжей, ранее обоснованный как наиболее приемлемый для получения белковых гидролизатов, характеризующихся высокой эффективностью в качестве главных компонентов бактериологических сред [265].

Гидролиз ферментами особенно ценен вследствие специфичности. Выбранный нами фермент животного происхождения трипсин (trypsin-lysine/arginine specific-endopeptidase (EC 3.4.21.4)), входящий в состав использованных препаратов панкреатина крупного рогатого скота сухого, представляет собой пептидазу, быстро гидролизующую пептидные связи лишь в том случае, если карбонильная группа расщепляемой амидной связи принадлежит одной из основных аминокислот - лизину или аргинину. В процессе изготовления ПППД прессованные хлебопекарные дрожжи подвергали воздействию препаратами панкреатина крупного рогатого скота сухого. Использовали препараты, принадлежащие одной фармакологической группе (АО9ААО2). Ферментативная активность была стандартизована в соответствии с международной системой единиц. Это упрощало процедуру гидролиза и выбора оптимальной дозы ферментного препарата для получения питательной основы сред заданного качества [144].

На первом этапе исследования были подобраны оптимальные для изготовления ПППД коммерческие марки определённых рас прессованных хлебопекарных дрожжей *S.cerevisiae*: «Особые» Ростовского-на-Дону дрожжевого завода (ТУ 9182-023-00371185-98) и «Дрожжи хлебопекарные

прессованные» Черкесского дрожжевого завода (ГОСТ 171-81). В качестве перспективных, по результатам исследования, следует рассматривать дрожжи хлебопекарные «Экстра», производства ООО «Воронежские дрожжи» (ТУ 9182-001-59559671-2003), марки «Градус» и «Хлебное дерево» Ростовского-на-Дону дрожжевого завода (ГОСТ 171-81), а также продукцию Санкт-Петербургского дрожжевого завода (ТУ 9182-005-00353595-2001).

Водную суспензию дрожжей обрабатывали панкреатином крупного рогатого скота сухим (ОСТ 49167-92) производства ООО «Мясокомбинат Ростовский». Использовали также препарат «Панкреатин» (Tabulettae Pancreatini 25I.u.) производства ОАО «Биосинтез», г. Пенза.

Критериями оценки при изучении различных марок дрожжей хлебопекарных прессованных в качестве сырья для получения ПППД служили: однородность водной суспензии, уровень пенообразования, длительность ферментативного гидролиза, отношение аминного азота к общему в конечном продукте гидролиза, биологические показатели после изучения роста тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба на агаризованных средах, содержащих в качестве основы тестируемые гидролизаты в одинаковой (по аминному азоту) концентрации.

Анализ кривых гидролиза дрожжей выявил, что характерная константа нарастания скорости (по аминному азоту) на протяжении первых восьми часов была при использовании марки «Особые». У других дрожжей имело место отставание, связанное с ригидностью клеточных стенок.

Поиск оптимума плотности суспензии дрожжей был направлен на нахождение баланса между скоростью гидролиза, итоговым показателем аминного азота в конечном продукте и расчётным выходом из полученного количества гидролизата агаризованной и жидкой сред. Оптимальной плотностью суспензии прессованных хлебопекарных дрожжей в дистиллированной воде, установленной в ходе серии экспериментов, явилось значение 0,2 кг дрожжей / 1 кг суспензии (эквивалентное 1 кг дрожжей на 4 л воды). При данной плотности регистрируется наименьшая длительность

гидролиза и наилучшие расчётные показатели выхода агаризованной и жидкой питательных сред из полученного количества гидролизата.

Необходимость предварительного ингибирования собственных дрожжевых ферментов в суспензии пекарских дрожжей до момента внесения внешнего фермента – панкреатина диктуется возможностью параллельного протекания в гидролизуемой смеси панкреатического переваривания субстрата и его аутолиза, что делает данный технологический процесс практически неуправляемым и приводит к появлению несбалансированного по пептидному составу конечного продукта, ухудшающего основные биологические показатели изготовленных из него питательных сред. В связи с этим нами были испытаны методы ингибирования собственных дрожжевых ферментов, обеспечивающих аутолиз: щелочение суспензии с помощью 20%-ного раствора гидроокиси натрия до значений рН выше 8,0; прогревание изготовленной суспензии при 56°C; кипячение суспензии 18-20 минут; сочетание прогревания со щелочением. Полученные результаты демонстрируют преимущество метода предварительного щелочения суспензии до значения рН 8,1- 8,5. Однако, поскольку оптимальным для действия трипсина был рН около 8,2, мы предпочли периодическую коррекцию этого показателя 20%-ным раствором гидроокиси натрия. Так как в первые шесть часов скорость реакции наиболее высокая, а буферность гидролизуемой смеси низкая (т.к. в ней присутствуют преимущественно белки и высокополимерные пептиды, а не свободные аминокислоты и олигомерные пептиды, образующиеся при гидролизе белков и полипептидов) коррекцию рН необходимо проводить с интервалом в 20 минут. В последующем этот интервал увеличивается до 1 ч (6-ой - 12-ый час реакции); 12 ч (12-ый – 48-ой час реакции); 24 ч (от 48-ого часа до окончания гидролиза).

Было установлено, что оптимальным значением рН панкреатического гидролиза суспензии прессованных пекарских дрожжей следует считать значение 8,3, так как именно при этих условиях регистрируется наиболее

высокая скорость гидролиза и наилучшие качества конечного продукта, о чём свидетельствуют результаты приведённых физико-химических (аминный азот) и бактериологических исследований.

Наименьшая длительность процесса панкреатического гидролиза дрожжей хлебопекарных прессованных, а также наиболее высокое содержание аминного азота в конечном продукте и лучшие биологические показатели приготовленных из него агаризованных питательных сред в отношении тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба были зарегистрированы при температуре гидролизуемой суспензии дрожжей 45°C.

Конечным этапом технологического процесса получения панкреатического перевара пекарских дрожжей явилось осветление. В практике выполнения данной работы сравнивали метод центрифугирования (как наиболее быстрый) и отстаивания (как наименее затратный). Сравнительное изучение использованных методов осветления ПППД проводили по следующим критериям: длительности периода полного осветления, характеру осадка и надосадочной жидкости, образованию осадка в осветлённом гидролизате после стерилизации автоклавированием, наличию осадка в приготовленных из него средах, биологическим показателям агаризованных питательных сред на основе полученных гидролизатов в отношении тест-штаммов *V.cholerae non O1 P-9741* и *Y.pestis EV 1290*. Полученные данные позволяют отдать приоритет методу осветления ПППД путём отстаивания на холоде, несмотря на его значительную длительность, поскольку он позволяет получить продукт, не образующий осадка при автоклавировании и приготовлении питательных сред, а также обеспечивает более высокие значения биологических показателей агаризованных питательных сред на его основе.

На основании результатов проведённого исследования разработана технологическая схема изготовления ПППД, включающая пять основных стадий технологического процесса:

1. Получение суспензии пекарских дрожжей

2. Получение неосветлённого панкреатического перевара пекарских дрожжей

3. Получение осветлённого панкреатического перевара пекарских дрожжей

3. Получение готового целевого продукта – ПППД

5. Фасовка, герметизация, стерилизация, этикетировка и упаковка готовой продукции.

Разработанная технологическая схема легла в основу оформленной на препарат нормативной документации.

Стандартность созданного белкового гидролизата, в первую очередь, обеспечивает ГОСТ или ТУ (в зависимости от используемой марки) дрожжей хлебопекарных прессованных и коммерческие гарантии препарата панкреатина, представляющего собой натуральный ферментный дозированный препарат. Разработанный метод изготовления ПППД позволил рассматривать его как изобретение – получен патент на изобретение «Способ получения белкового гидролизата» (Патент РФ № 2375441).

ПППД характеризуется следующими физико-химическими показателями:

- прозрачность и цветность – препарат должен быть прозрачным, коричневого или светло-коричневого цвета;

- рН – $(8,2 \pm 0,3)$;

- аминный азот - $(0,285 \pm 0,065)$ %;

- общий азот - $(0,93 \pm 0,21)$ %;

- содержание хлорида натрия - $(0,46 \pm 0,14)$ %;

- углеводы - $(0,04 \pm 0,015)$ %;

- свободный триптофан – $(0,107 \pm 0,004)$ %;

- нуклеиновые кислоты – $(0,002 \pm 0,00005)$ %.

Будучи введенным в состав питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба в качестве питательной основы, ПППД обеспечивает соответствие последних требованиям МУ 3.3.2.2124-06 по биологическим показателям.

При планировании нашей научно-исследовательской работы были сделаны расчеты вероятных затрат на нее. Оптимистический прогноз экономической целесообразности использования данной научной разработки для создания нового препарата на основе гидролизата пекарских дрожжей в дальнейшем оправдался, в первую очередь, за счёт процедуры технологического процесса. Использование коммерческого панкреатина даёт важное преимущество - стандартность препарата по активности трипсина. Это позволяет дозировать его и гарантирует получение в переваре неизменного количества определённых пептидов, аминокислот, витаминов. Такое разнообразие состава даёт возможность использовать его при изготовлении сред, пригодных для выращивания микроорганизмов с различными потребностями, а также сред многоцелевого назначения.

В качестве препаратов сравнения для оценки панкреатического перевара пекарских дрожжей как основы питательных сред для холерного вибриона и чумного микроба нами были выбраны девять наиболее широко применяемых при производстве различных питательных сред в России и за рубежом белковых гидролизатов, преимущественно, из сырья животного происхождения: гидролизат мяса по Хоттингеру, пептон Мартена (первые два гидролизата лабораторного изготовления), пептон ферментативный (производитель - ООО НПО «Порт-Петровск», г.Курск), гидролизат казеина солянокислый (ФГУП НПО «Микроген»), гидролизат казеина панкреатический (ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии, г.Оболенск), гидролизат каспийской кильки панкреатический – сухой питательный бульон (ФГУП НПО «Микроген»), бакто-пептон («Becton Dickinson», США), казаминовые кислоты – сернокислый гидролизат казеина высокой степени расщепления («Becton Dickinson», США), бакто-триптон

(«Becton Dickinson», США). Варианты среды, содержавшие в качестве питательных основ исследуемые белковые гидролизаты в различных концентрациях, исследовали на соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06 в отношении тест-штаммов холерного вибриона и чумного микроба. Полное соответствие варианта среды требованиям указанного документа по всем оцениваемым биологическим показателям в отношении каждого из микроорганизмов рассматривали как «позитивный отклик». Совокупность значений концентрации гидролизата в составе варианта среды, при которых регистрировали «позитивный отклик» в отношении тест-штамма *V.cholerae* или *Y.pestis*, обозначали как «диапазон концентраций, обеспечивающих позитивный отклик». Если значения концентрации гидролизата в указанных диапазонах для каждого из микроорганизмов совпадали, то определяли «интервал универсальности». Чем шире «интервал универсальности», тем больше степень соответствия исследуемого гидролизата питательным потребностям обоих микроорганизмов и лучше стандартизуемость универсальной среды на его основе.

Наиболее широкий «диапазон концентраций, обеспечивающих позитивный отклик» среди 10 протестированных белковых гидролизатов был зарегистрирован при использовании ПППД – 12 исследованных значений концентрации гидролизата дали положительный результат в отношении тест-штамма холерного вибриона и 21 значение концентрации – в отношении тест-штамма чумного микроба.

Наибольшая величина «интервала универсальности» была зарегистрирована также у ПППД – девять значений концентрации гидролизата (от 0,03 до 0,07% по аминному азоту). Это позволяет с достаточным «запасом прочности» применять ПППД в качестве моноосновы универсальной среды для диагностики чумы и холеры. При этом по основным биологическим показателям в отношении тест-штаммов чумного микроба и холерного вибриона такая среда не уступает специализированным для данных микроорганизмов средам.

Таким образом, разработанный белковый гидролизат – ПППД является наиболее эффективным и экономически выгодным среди протестированных в ходе настоящей работы отечественных и зарубежных аналогов в аспекте создания на его основе как отдельных агаризованных сред для возбудителей чумы и холеры, так и универсальной питательной среды для обоих микроорганизмов.

Здесь будет уместным остановиться на вопросе влияния на метаболические процессы микроорганизмов характера гидролиза питательных веществ. Играет роль не только количество в них легко усвояемых молекул низкой молекулярной массы, но и состав компонентов питательной среды. Для ауксотрофов часто необходимы определённые аминокислоты, тогда как в качестве факторов роста многих бактерий выступают пептиды 700-800 D. В этой связи при гидролизе белка становится важным показателем степени расщепления, который в основах питательных сред должен быть выше 15% [265]. Отмечено [140], что при ферментативном гидролизе казеина (нередко являющегося питательной основой в средах для выращивания возбудителей опасных инфекционных болезней) пептиды составляют около 80% белкового состава. Наш препарат белкового гидролизата примерно на четверть состоит из несвязанных аминокислот, и такая степень гидролиза удовлетворяет физиологические потребности, как холерных, так и чумных микробов. Такими свойствами обладают пептоны – предпочтительно ферментативные белковые гидролизаты, составляющие основы питательных сред с аминокислотной азотистой составляющей. К этой группе можно отнести ПППД, способный, по нашему мнению, заменить традиционные питательные основы. Наши опыты сравнения доказывают преимущество ПППД перед зарубежными аналогами, широко используемыми исследователями, что даёт надежды на возможность импортозамещения в области обеспечения питательными средами лабораторной диагностики чумы и холеры, а также научных

исследований по изучению возбудителей этих опасных инфекционных болезней.

Продемонстрированные преимущества ПППД перед используемыми в практике отечественными и зарубежными белковыми гидролизатами в аспекте обеспечения питательных потребностей чумного микроба послужили фундаментом для конструирования на основе данного препарата агаризованных питательных сред для культивирования *Y.pestis* при 28°C и 37°C. В результате проведенных исследований по подбору ингредиентов и оптимизации их концентраций был сформирован состав агаризованной питательной среды на основе ПППД для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C:

- ПППД – 0,08% по аминному азоту;
- натрий хлористый – 3,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 5,0 г;
- агар микробиологический – 14,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – 7,2±0,1.

Анализ результатов сравнительного изучения основных биологических показателей сконструированной питательной среды и контрольных сред свидетельствует, что опытная среда по всем изученным показателям не уступала контрольной среде ЧПС (ФБУН ГНЦ ПМБ) в отношении каждого из взятых в исследование 11 штаммов чумного микроба и полностью соответствовала требованиям МУ 3.3.2.2124-06. Вместе с тем, по показателям чувствительности и прорастания опытная среда на порядок превосходила традиционный агар Хоттингера в отношении слабовирулентного штамма *Y.pestis 21 КБ* и двух вирулентных штаммов *Y.pestis И-2442* и *231*.

Таким образом, на основании результатов проведённых лабораторных испытаний, можно сделать заключение, что разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при

28°C может являться полноценной альтернативой используемым в лабораторной практике питательным средам: ЧПС (ФБУН ГНЦ ПМБ) и агару Хоттингера. Обращает на себя внимание то обстоятельство, что сконструированная на основе ПППД среда удовлетворяет питательным потребностям штаммов чумного микроба, изолированных из различных природных очагов, и отличающихся друг от друга по вирулентности.

Оптимальной температурой для роста и размножения *Y. pestis* является 28°C, поэтому чумные бактерии на искусственных питательных средах выращивают преимущественно при этой температуре. Такой подход оправдан при выделении возбудителя чумы из объектов окружающей среды, так как в этом случае определяющими являются сроки появления на питательных средах видимого роста *Y. pestis* и специфическая, характерная только для данной температуры культивирования, морфология колоний чумного микроба. Однако, культивирование возбудителя чумы при 37°C – температуре тела теплокровных животных и человека, способствует формированию его фенотипа, близкого к таковому при инфекционном процессе в восприимчивом к чуме макроорганизме. При этой температуре резко возрастает продукция ряда антигенов чумного микроба. Кроме того, современные чумные иммуноглобулиновые диагностикумы направлены, преимущественно, на выявление капсульного антигена (фракции I) *Y. pestis*, оптимальной температурой синтеза которого является именно 37°C. Отсутствие доступных коммерческих и экспериментальных питательных сред для этой температуры культивирования ограничивает возможность применения для идентификации выделенных культур чумного микроба метода флюоресцирующих антител (МФА), реакции агломерации объёмной (РАО), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА). Изложенные обстоятельства послужили аргументированной предпосылкой для проведения следующей серии экспериментов по конструированию агаризованной питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C, которая отличается от предложенных ранее сред аналогичного

назначения тем, что в качестве её питательной основы используют только один компонент – ПППД, в то время как при конструировании других питательных сред для данной температуры культивирования *Y.pestis* применяли различные комбинации белковых гидролизатов (например, триптического перевара мяса по Хоттингеру и гидролизата казеина). Кроме того, конструируемая среда за счёт использования ПППД в качестве моноосновы характеризуется значительно более низкой по сравнению с существующими аналогами себестоимостью и простой технологией изготовления.

Сконструированная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C, согласно результатов проведённого подбора ингредиентов и их количественной оптимизации, имела следующий состав:

- ПППД – 0,13 % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- магний сернокислый 7-водный – 0,6 г;
- железо (II) сернокислое 7-водное – 0,01 г;
- натрий сернистокислый безводный – 0,6 г;
- кальций хлористый 6-водный – 0,3 г;
- D-маннит – 1,0 г;
- агар микробиологический – 13,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л; рН среды – 7,1±0,1.

Анализ результатов сравнительного изучения основных биологических показателей разработанной на основе ПППД питательной среды для культивирования чумного микроба при 37°C и контрольных сред свидетельствует, что опытная среда характеризовалась чувствительностью 10 м.к. в отношении шести из 10 изученных штаммов, в то время как контрольные среды ЛХАТ и ДК-37 – только четырёх, а СО и LB – трёх из 10 культур. Наименьшей чувствительностью в отношении всех использованных штаммов чумного микроба при температуре культивирования 37°C

характеризовался агар Хоттингера: рост в виде единичных колоний был зарегистрирован только из посевных доз 100 м.к. и выше. Чувствительность опытной среды и лучших среди контрольных сред - ЛХАТ и ДК-37 в отношении четырёх использованных в исследовании вакцинных и двух авирулентных штаммов *Y.pestis* была идентичной и составила 10 м.к. (для вакцинных штаммов) и 100 м.к. (для авирулентных). Вместе с тем, по данному показателю в отношении слабовирулентного штамма *Y.pestis 21 КБ* и вирулентного *Y.pestis 753* разработанная среда на порядок превосходила контрольные среды ЛХАТ и ДК-37 и на два-три порядка – среды СО, LB и агар Хоттингера.

Показатель прорастания опытной среды достоверно превосходил таковой контрольных сред ЛХАТ и ДК-37 в отношении девяти из 10, а контрольных сред СО и LB - всех взятых в работу штаммов чумного микроба. Самые низкие значения данного показателя были зарегистрированы на агаре Хоттингера, где из посевной дозы 100 м.к. выросли только три штамма из 10 использованных в исследовании.

По скорости роста использованных штаммов *Y.pestis* в условиях 37°C разработанная на основе ПППД среда превосходила все использованные в исследовании контрольные среды. Так, при посевной дозе 100 м.к. на опытной среде уже через 48 ч формировались колонии чумного микроба диаметром 0,3-0,8 мм, которые можно было идентифицировать методами МФА и РАО, на контрольной среде ЛХАТ диаметр колоний к этому сроку не превышал 0,4 мм, а на остальных контрольных средах через данный промежуток времени от начала культивирования видимого роста штаммов не было.

Через 72 ч культивирования при 37°C диаметр колоний шести из 10 штаммов *Y.pestis* на опытной среде превосходил аналогичный показатель контрольных сред не менее чем в 1,4 раза. На агаре Хоттингера из посевной дозы 100 м.к. при данной температуре культивирования через 72 часа

выросли только три вакцинных штамма чумного микроба, а диаметр их колоний не превышал 0,7 мм.

По показателю выхода биомассы с единицы объёма среды (среднему для всех взятых в исследование штаммов) разработанная питательная среда на основе ПППД для культивирования чумного микроба при 37°C превосходила контрольные среды: ЛХАТ – в 2,1 раза; ДК-37 – в 3,3 раза; СО – в 4,8 раза; LB – в 5,4 раза; агар Хоттингера – в 8,1 раз.

Было также установлено, что культуры чумного микроба (кроме Fra1 штамма *Y.pestis Otten*), выращенные на опытной среде характеризовались более высокими титрами капсульного антигена (фракции I) в серологических тестах РАО и РНГА по сравнению с культурами, полученными на всех контрольных средах.

Таким образом, на основании результатов проведённых лабораторных испытаний, можно сделать заключение, что разработанная на основе ПППД агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C по всем изученным биологическим показателям превосходит все использованные контрольные среды.

Разработанная агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37°C была запатентована как составляющая способа определения заражённости продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях ЧС [243].

Две разработанные на основе ПППД агаризованные питательные среды (для культивирования и выделения чумного микроба при 28°C; для культивирования чумного микроба при 37 °C) были апробированы в ходе тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ по проведению специфической индикации патогенных биологических агентов (ПБА). Об эффективности сконструированных сред свидетельствует выделение с их помощью культуры чумного микроба из обеих учебных проб с разной степенью их контаминации вакцинным штаммом *Y.pestis EV 1290* при двух температурах инкубации посевов - 28°C и 37°C, в то время как на контрольном агаре Хоттингера

возбудитель чумы был изолирован только из пробы № 1 с более высокой концентрацией чумного микроба (при 37°C - в более поздние, чем на опытной среде, сроки). Культуры, изолированные на разработанной агаризованной питательной среде для культивирования чумного микроба при 37 °С в ходе ТСУ, характеризовались более высоким уровнем продукции капсульного антигена (фракции I), чем выделенные на контрольном агаре Хоттингера. Это было подтверждено результатами МФА и РАО.

Дальнейшие исследования предусматривали конструирование на основе ППД комплекса сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона. Азотистый обмен *V.cholerae* связан с их мощной протеолитической системой, которая есть практически у всех штаммов в самых разнообразных условиях существования. В одних случаях она обеспечивает его продуктами питания, в других – способствует адгезии к стенкам кишечника. В этой связи понятно предпочтение, которое отдано пептонным основам сред при лабораторной диагностике холеры (МУК 4.2.2218-07). В составе большинства из используемых в настоящее время жидких и плотных питательных сред для культивирования, выделения и изучения свойств *V.cholerae* - традиционное дорогостоящее сырье животного и растительного происхождения (мясо, субпродукты, казеин, соя, подсолнечник и т.д.). Данные виды исходного сырья имеют различное качество, в ряде случаев содержат балластные примеси, характеризуются сложностью и трудоемкостью технологического процесса переработки и изготовления из них пептонов и триптонов, среды на их основе достаточно сложно стандартизуемы и не всегда удовлетворяют поставленным целям их применения. Используемые в практике мясные и казеиновые основы питательных сред для идентификации холерного вибриона по признакам ферментации углеводов, многоатомных спиртов и аминокислот характеризуются, с одной стороны, дороговизной, с другой - повышенными требованиями к содержанию в них углеводов (данный показатель не должен превышать значения 0,06%, чтобы не происходило существенного

закисления среды и изменения цвета индикатора вследствие ферментации сахаров самой питательной основы культивируемыми микроорганизмами).

Использование стандартных синтетических питательных сред с известным химическим составом ограничено, с одной стороны, высокой стоимостью составляющих их ингредиентов (аминокислот, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, витаминов), с другой – особенностями питательных потребностей различных штаммов *V.cholerae*.

Принимая во внимание, что разработанный нами белковый гидролизат ПППД в составе сред для культивирования *V.cholerae* по своим биологическим показателям превосходит используемые в практике казеиновые гидролизаты и не уступает мясным ферментативным пептонам, существенно дешевле последних, характеризуется стабильностью биохимических и серологических свойств культур при пассажах через содержащие его среды, а также низким содержанием углеводов представлялось перспективным создание на его основе комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона.

В ходе проведенного исследования на основе ПППД был создан новый комплекс питательных сред для лабораторной диагностики холеры и всестороннего изучения различных штаммов холерного вибриона. Разработанный комплекс включает:

- Щелочной агар для культивирования и выделения холерного вибриона;
- Жидкую накопительную питательную среду для культивирования и выделения холерного вибриона в концентрированном (аналог основного раствора пептона) и разведенном (аналог 1% пептонной воды) вариантах;
- Бульон для культивирования холерного вибриона;
- Питательную среду для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот;

- Агаризованную питательную среду для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях;

- Глюкозо-лактозную агаризованную питательную среду для идентификации холерного вибриона на этапе отбора колоний.

Среди 16 наименований питательных сред, необходимых для проведения лабораторной диагностики холеры, наиболее высока количественная потребность в щелочном агаре. Так, для обеспечения работы СПЭБ по локализации и ликвидации эпидемического очага холеры в течение двух месяцев (при исследовании, в среднем, 500 проб в сутки) требуется 4320 л готового щелочного агара. Особая актуальность и востребованность обладающего высокой чувствительностью, экономически выгодного щелочного агара обусловили приоритетность исследований по конструированию этой базовой агаризованной питательной среды для культивирования и выделения холерного вибриона на основе ПППД. В ходе выполнения настоящей работы был сконструирован щелочной агар, в котором в качестве питательной моноосновы впервые использован препарат ПППД. Данная среда имеет следующий состав: (из расчёта на 1,0 л среды):

- ПППД – 0,05 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 4,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 6,0 г;
- агар-агар микробиологический – 12,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

Разработанная среда достоверно превосходила контрольный щелочной агар производства ФГУП НПО «Микроген» по показателю прорастания и диаметру колоний в отношении группы из четырёх штаммов *V.cholerae classical O1*.

Наиболее выраженные преимущества разработанной питательной среды перед контрольной были зарегистрированы в отношении группы из

восьми штаммов *V.cholerae* O139 как по чувствительности, которая более чем на порядок превышала аналогичный показатель контрольной среды, так и по показателям прорастания и диаметра колоний. Эти преимущества новой питательной среды приобретают особую значимость в связи с эпидемической опасностью штаммов холерного вибриона серовара O139 «Бенгал» и высокой частотой их обнаружения в последние десятилетия.

Результаты использования группы из 11 штаммов *V.cholerae* El Tor для оценки биологических показателей изучаемых сред свидетельствуют, что на опытной среде среднее значение диаметра колоний данных культур было в 1,55 раз выше, чем на контрольной среде при практически идентичных остальных показателях.

Полученные значения изученных биологических показателей сконструированной агаризованной питательной среды в отношении тест-штаммов холерного вибриона (*V.cholerae* classical O1 P-1, *V.cholerae* El Tor O1 M-878 и *V.cholerae* non O1/non O139 P-9741), используемых для контроля качества питательных сред, продемонстрировали её полное соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06.

Таким образом, щелочной агар на основе ПППД не только соответствует критериям качества, регламентированным действующими методическими указаниями, но и превосходит используемый в практике аналог – коммерческий щелочной агар по ряду биологических показателей в отношении трёх из четырёх исследованных групп штаммов *V.cholerae*.

Как известно, в схему лабораторной диагностики холеры включен этап биологического обогащения исследуемой пробы с использованием специальных жидких накопительных сред (основного раствора пептона и 1% пептонной воды), создающих преимущества для холерного вибриона перед сопутствующими микроорганизмами за счет ограниченной шестью часами длительности культивирования, пока микробные популяции находятся в фазе логарифмического размножения (вследствие более короткой длительности одной генерации у *V.cholerae* по сравнению с микробами-контаминантами

пробы), способности клеток холерного вибриона концентрироваться на поверхности среды и устойчивости к щелочному рН.

Нами была сконструирована новая жидкая накопительная питательная среда на основе ПППД для культивирования и выделения холерного вибриона в концентрированном (аналог основного раствора пептона) и разведенном (аналог 1% пептонной воды) вариантах, имеющая следующий состав:

- ПППД – 0,2 % (по аминному азоту);
 - натрий хлористый – 50,0 г;
 - калий азотнокислый – 1,0 г;
 - натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный – 5,0 г;
 - вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л (в концентрированном варианте), до 10,0 л (в разведенном варианте);
- рН готовой среды – $8,2 \pm 0,2$.

Результаты сравнительного изучения разработанной жидкой накопительной питательной среды на основе ПППД и контрольной жидкой накопительной среды – 1% пептонной воды, приготовленной из «Пептона основного сухого» производства ФГУП НПО «Микроген» наглядно продемонстрировали достоверно более высокое среднее значение показателя чувствительности разработанной среды по сравнению с контрольной в отношении трех из четырех взятых в исследование групп штаммов: *V.cholerae classical O1*, *V.cholerae El Tor O1* и *V.cholerae O139*. В четвертой группе штаммов (*V.cholerae non O1/ non O139*) средние значения данного показателя опытной и контрольной сред были идентичными. По показателю числа выросших колоний при высеве шестичасовых культур на агаровые пластинки из исходной посевной дозы 10 м.к. разработанная среда в 17,2 раза превосходила контрольную в отношении группы из восьми штаммов *V.cholerae O139*. В отношении трех других исследованных групп штаммов преимущества опытной среды имели место, но были не столь выражены.

Аналогичная тенденция сохранялась при увеличении посевной дозы до 100 м.к.

Таким образом, разработанная нами на основе ПППД жидкая накопительная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона по результатам сравнительного тестирования с использованием 28 музейных штаммов *V.cholerae* различных биоваров и серогрупп превосходила используемый в практике аналог (1% пептонную воду, приготовленную из «Пептона основного сухого» производства ФГУП НПО «Микроген») по основным биологическим показателям.

За шесть лет апробации разработанного на основе ПППД комплекса сред «Щелочной агар - Жидкая накопительная среда» при мониторинге воды поверхностных водоемов и стоков на территории г.Ростова-на-Дону с его помощью были выделены 18 культур *V.cholerae* O1 (16 – из воды поверхностных водоемов, две – из сточных вод) и 438 культур *V.cholerae non O1/ non O139* (407 – из воды поверхностных водоемов, 31 – из сточных вод), в то время как на контрольном комплексе сред «Агар щелочной сухой – Пептон основной сухой» производства ФГУП НПО «Микроген» была изолирована только одна культура *V.cholerae* O1 (из сточных вод, которая была выделена и на опытном комплексе сред) и 164 культуры холерного вибриона не O1 / не O139 серогрупп (146 – из проб воды поверхностных водоемов, 18 – из сточных вод). Следует отметить, что 85% всех изолированных в Ростовской области за шесть лет (2000-2005 гг.) культур *V.cholerae* O1 было выявлено только при использовании сред, сконструированных на основе ПППД, в процессе их лабораторных испытаний. Благодаря использованию разработанного комплекса сред в августе 2001 года из сточных вод на территории г.Ростова-на-Дону был выделен токсигенный, эпидемически опасный штамм *V.cholerae* O1, сходный по генотипу (по данным VNTR – анализа) со штаммами, вызвавшими вспышку холеры в г.Казани месяцем раньше. Это позволило своевременно провести необходимый комплекс санитарно-противоэпидемических

(профилактических) мероприятий и предотвратить вспышку инфекции среди людей в г. Ростове-на-Дону.

Результаты проведенной в ходе мониторинга объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона апробации разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред «Щелочной агар – Жидкая накопительная среда» убедительно свидетельствуют о его преимуществах перед используемыми в микробиологической практике питательными средами в отношении возможности выявления в воде поверхностных водоемов и сточных водах штаммов холерного вибриона как O1, так и не O1 / не O139 серогрупп.

Принимая во внимание высокую чувствительность и значительно более низкую себестоимость разработанных на основе ПППД питательных сред, их внедрение в практику лабораторной диагностики холеры существенно повысит эффективность и снизит затраты на осуществление ежегодного мониторинга объектов окружающей среды.

Апробации разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред «Щелочной агар – Жидкая накопительная среда» в ходе исследования материала от людей на базе бактериологической лаборатории МБУЗ «Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко», г.Ростов-на-Дону, предшествовали модельные опыты по сравнительному изучению возможности выделения на опытных и контрольных средах штаммов холерного вибриона из искусственных смесей с микробами-контаминантами. В ходе проведенного исследования были смоделированы пробы, близкие по составу микрофлоры к ректальным мазкам вибрионосителя (с минимальным количеством микробных клеток холерного вибриона – 10 м.к. и различной концентрацией кишечной палочки и протей, имитирующей разные степени дисбактериоза). Было установлено, что на средах опытного комплекса холерный вибрион удавалось изолировать в эксперименте из смесей, содержащих 10 м.к./мл *V.cholerae* и от 1×10^4 до 1×10^8 м.к./мл *E.coli* и *P.vulgaris*. На контрольном комплексе сред выделение *V.cholerae* было

возможным при концентрации в смеси микробов-контаминантов, не превышающей 1×10^7 м.к./мл. Полученные данные свидетельствуют о более высокой чувствительности опытных сред по сравнению с контрольными, что создаёт предпосылки их эффективного использования при исследовании материала от людей на наличие холерного вибриона, в том числе и на вибрионосительство.

В 747 пробах материала от людей холерный вибрион не был обнаружен как на опытных, так и на контрольных средах. Вместе с тем, результаты модельных опытов по выделению холерного вибриона из смесей, имитирующих клинический материал (которые показали преимущество сред на основе ПППД перед традиционными 1% пептонной водой и щелочным агаром), создают предпосылки возможности эффективного использования разработанных сред для исследования материала от людей.

В качестве недорогой адекватной альтернативы традиционным мясо-пептонным бульонам была создана новая рецептура бульона для культивирования холерного вибриона на основе ПППД:

- ПППД – из расчёта $(0,07 \pm 0,005)$ % по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-ти водный – 6,0 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;

pH среды $7,8 \pm 0,2$.

Результаты сравнительного изучения разработанного бульона для культивирования холерного вибриона на основе ПППД и контрольной среды – бульона Мартена свидетельствуют, что по основным биологическим показателям разработанный бульон не уступает контрольному в отношении всех 28 изученных музейных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп.

Разработанный на основе ПППД бульон был исследован также в аспекте возможности его применения для оценки продукции холерного энтеротоксина (СТ) *in vitro* с тестированием полученных из исследованных

штаммов *V.cholerae* супернатантов в тесте кожной проницаемости [394] и культуре клеток СНО-К1[179, 182]. При исследовании 29 штаммов холерного вибриона, выделенных от людей во время вспышки холеры в г.Казани летом 2001 г., и трех токсигенных штаммов *V.cholerae El Tor*, изолированных из воды поверхностных водоемов и стоков на территории г.Ростова-на-Дону в 2000-2001 гг., было установлено что все взятые в исследование штаммы продуцировали СТ *in vitro*, наличие которого регистрировали в тесте кожной проницаемости и культуре клеток СНО-К1 при их культивировании как в разработанном бульоне, так и в контрольных средах – бульоне Мартена и среде АКІ. По величине титров СТ в указанных тестах опытная среда не уступала бульону Мартена и лишь незначительно отставала по этому показателю от одной из лучших в мире сред накопления СТ, состоящей из дорогих импортных ингредиентов – среде АКІ.

Исследование гемолитической активности 28 использованных штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп в пробе Грейга [141] показало отсутствие расхождения в результатах, полученных при использовании разработанного на основе ПППД бульона и бульона Мартена.

Таким образом, сконструированный на основе ПППД бульон по основным биологическим показателям не уступает контрольной среде – традиционно используемому для культивирования и изучения свойств холерного вибриона бульону Мартена. Разработанный бульон обеспечивал продукцию СТ *in vitro* и возможность оценки гемолитической активности в пробе Грейга всех исследованных штаммов холерного вибриона на уровне контрольного бульона Мартена.

Принимая во внимание, что разработанный нами белковый гидролизат ПППД в составе сред для культивирования *V.cholerae* по своим биологическим показателям превосходит используемые в практике казеиновые гидролизаты и не уступает мясным ферментативным пептонам, существенно дешевле последних, характеризуется стабильностью

биохимических свойств культур при пассажах через содержащие его среды, а также низким содержанием углеводов – $(0,04 \pm 0,015)\%$, представлялось перспективным конструирование на его основе цветных питательных сред для идентификации холерного вибриона по биохимическим признакам ферментации аминокислот и углеводов. Результатом развития данного направления в ходе настоящей работы явилось создание трех питательных сред на основе ПППД для идентификации холерного вибриона.

1. Агаризованная питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях включала:

- ПППД – $0,013\%$ (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 5,0 г;
- калий фосфорнокислый двузамещённый 3-водный – 0,4 г;
- Д-глюкоза кристаллическая – 10,0 г;
- бромтимоловый синий водорастворимый – 0,03 г (или его 1% водный раствор – 3 мл);
- агар-агар бактериологический – 3,0 г;
- вода дистиллированная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,2$.

2. Питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот имела следующий состав:

- ПППД из расчёта $(0,013 \pm 0,001)\%$ по аминному азоту;
- натрий хлористый – 5,0 г;
- глюкоза – 1,0 г;
- L-аминокислота – 10 г (варианты с аргинином, лизином, орнитином и контрольный вариант – без аминокислоты);
- бромкрезоловый пурпурный (1,6% спиртовой р-р) – 0,6 мл;
- крезоловый красный (0,1% спиртовой р-р) – 5,0 мл;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;

pH среды – $6,45 \pm 0,1$.

3. Глюкозо-лактозная агаризованная питательная среда для идентификации холерного вибриона на этапе отбора колоний в своем оптимальном варианте содержала:

- ПППД – 0,065 % (по аминному азоту);
- натрий хлористый – 5,0 г;
- D – глюкоза кристаллическая – 1,0 г;
- Альфа – D - лактоза кристаллическая – 10 г;
- натрий сернистокислый безводный – 0,4 г;
- натрий серноватистокислый 5 – водный – 0,16 г;
- железо (II) сернокислое 7 – водное - 0,5 г;
- феноловый красный (0,2 % раствор в 50 % этиловом спирте) – 12 мл;
- агар-агар бактериологический – 11,5 г;
- вода дистиллированная или очищенная – до 1,0 л;

pH готовой среды – $7,8 \pm 0,1$.

Результаты сравнительного изучения трех разработанных на основе ПППД питательных сред для идентификации холерного вибриона и контрольных сред (Хью-Лейфсона, Меллера и Клиггера соответственно) показали их полную идентичность по дифференцирующим свойствам в отношении изученных штаммов холерного вибриона и других микроорганизмов. Сконструированные на основе ПППД дифференциальные среды, имея значительные преимущества по себестоимости, не уступали используемым в практике средам аналогичного назначения по изученным биологическим показателям.

Новый комплекс питательных сред на основе ПППД для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона прошел успешную апробацию и в ходе опытно-исследовательского тактико-специального учения (ТСУ) СПЭБ на тему: «Выдвижение, развёртывание и организация работы СПЭБ на базе мобильного комплекса (МК СПЭБ) в автономных условиях по индикации и идентификации холерных вибрионов», состоявшегося 26-30 июля 2010 г. На средах разработанного комплекса

холерный вибрион был выделен из всех семи искусственно контаминированных штаммом *V.cholerae El Tor 5879* проб (с конечной концентрацией данного микроорганизма 10^3 , 10^5 и 10^7 микробных клеток / мл), в то время как с помощью контрольного комплекса сред возбудитель холеры был изолирован только из проб, содержащих указанный штамм *V.cholerae* в концентрациях 10^5 и 10^7 микробных клеток / мл. Этот факт свидетельствует о более высокой чувствительности опытных сред на основе ПППД (Щелочного агара и Жидкой накопительной среды) по сравнению с контрольными средами аналогичного назначения (приготовленными по инструкции производителя «Агаром щелочным сухим», «Пептоном основным сухим» и 1 % пептонной водой из него).

Выделение в ходе ТСУ атоксигенного штамма *V.cholerae El Tor* из реальной пробы воды открытого водоёма только с помощью сред разработанного комплекса подтверждает полученные ранее в результате многолетнего мониторинга водных объектов данные [186] о преимуществе этих сред перед используемыми в микробиологической практике.

Применение входящих в состав разработанного комплекса цветных дифференциально-диагностических питательных сред на основе ПППД для идентификации изолированных в процессе настоящего ТСУ штаммов холерного вибриона показало, что по дифференцирующим свойствам и срокам ферментации углеводов и аминокислот данные питательные среды не отличались от аналогичных контрольных сред (Хью-Лейфсона, Мёллера, Клиглера).

Комплексная оценка результатов исследования поступивших проб (в том числе, полученных при использовании разработанного на основе ПППД комплекса питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона) в развёрнутых мобильных лабораториях позволила своевременно дать адекватную оценку сложившейся ситуации по заносу холеры (согласно легенде учений) на территорию Южного федерального округа и откорректировать оперативный

план противоэпидемических мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию эпидемического очага.

Многообразие метаболических процессов большинства представителей микробного мира, требует особого внимания при лабораторном исследовании с использованием питательных сред, и это показали наши опыты по подбору рецептур, обеспечивающих жизнедеятельность холерного вибриона и чумного микроба. Анализ наших результатов и данных, приведённых в специальной литературе, позволяет нам утверждать, что открывается новое перспективное направление в производстве питательных сред. Важным аспектом его развития следует считать не только создание достойной экономически выгодной альтернативы традиционным мясным, казеиновым и рыбным белковым гидролизатам, но также упрощение технологического процесса изготовления, стандартизации и контроля качества дрожжевых питательных сред. Продолжением и расширением нашего научного направления станет изучение возможности использования ПППД в качестве основы селективно-дифференциальных питательных сред для холерного вибриона, чумного микроба и других возбудителей опасных инфекционных болезней. Автоматизация микробиологических исследований все шире внедряется в лабораторную практику [335]. На вооружении специалистов – постоянно совершенствующиеся модели бактериологических анализаторов и ферментеров, которые требуют использования дорогостоящих, преимущественно зарубежных, питательных сред специального назначения. В этом плане перед отечественными производителями питательных сред стоят задачи импортозамещения в области обеспечения функционирования автоматизированных систем в микробиологии [333]. В соответствии с этой генеральной линией другим перспективным направлением наших исследований представляется разработка на основе ПППД сред для автоматических устройств, а также хромогенных сред, которые были бы конкурентоспособны и могли внести

свой вклад в борьбу с угрожающими человечеству опасными инфекционными болезнями.

ВЫВОДЫ

1. Разработана новая экономически выгодная и конкурентоспособная универсальная питательная основа сред для холерного вибриона и чумного микроба – панкреатический перевар пекарских дрожжей (ПППД).

2. Панкреатический перевар пекарских дрожжей (ПППД) является адекватной альтернативой традиционным мясным, казеиновым и рыбным белковым гидролизатам, способной обеспечить питательные потребности различных штаммов холерного вибриона и чумного микроба.

3. Панкреатический перевар пекарских дрожжей (ПППД) может служить полноценной моноосновой при конструировании питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона и чумного микроба.

4. Панкреатический перевар пекарских дрожжей (ПППД) превосходит по биологическим показателям используемые в практике средоварения белковые гидролизаты отечественного и зарубежного производства, в том числе и в аспекте создания на его основе универсальной питательной среды для холерного вибриона и чумного микроба.

5. На основе панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) создан новый комплекс питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона, превосходящий существующие аналоги по ряду биологических показателей в отношении штаммов *V.cholerae* различных биоваров и серогрупп. Разработанный комплекс питательных сред для холерного вибриона является эффективным инструментом для решения многих научных и практических задач.

6. Продемонстрирована возможность использования панкреатического перевара пекарских дрожжей (ПППД) в качестве единственного азотсодержащего компонента (моноосновы) питательных сред, предназначенных для культивирования чумного микроба как при 28 °С, так и при 37 °С.

7. Сконструированная на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей (ППД) агаризованная питательная среда для культивирования чумного микроба при 37 °С превосходит все ранее предложенные среды аналогичного назначения по скорости роста, выходу биомассы с единицы объема среды и накоплению капсульного антигена (фракции I) *Y.pestis*.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ И ТЕРМИНОВ

АПК – аминокислотно-пептидный концентрат

АТФ – аденозинтрифосфат

БВК – белково-витаминный концентрат

ВАК – Высшая аттестационная комиссия министерства образования и науки

ГНЦ ПМБ – Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии

ДК-37 – питательная среда на основе гидролизата казеина и дрожжевого экстракта

ЛПС – липополисахарид

ЛХАТ – питательная среда, аббревиатура соответствует названию лаборатории, где она была разработана «Лаборатория химии антигенов и токсинов»

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

МУ – методические указания

МФА – метод флюоресцирующих антител

НАД – никотинамиддинуклеотид

НИР – научно-исследовательская работа

НПО – научно-производственное объединение

ОРХ – основной раствор Хоттингера

ПБА – патогенные биологические агенты

ПППД – панкреатический перевар пекарских дрожжей

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РА – реакция агглютинации

РАМН – Российская академия медицинских наук

РАО – реакция агломерации объемной

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

- СО – питательная среда на основе аутолизата селезенки и гидролизата белка отрубей
- СПЭБ – специализированная противэпидемическая бригада
- СЭДХ – среда элективно-дифференциальная для выделения холерного вибриона
- ТСУ – тактико-специальное учение
- ТУ – технические условия
- ФБУН – Федеральное бюджетное учреждение науки
- ФГУП – Федеральное государственное унитарное предприятие
- ФКУЗ – Федеральное казенное учреждение здравоохранения
- ЧПС – чумная питательная среда
- ЭДОС – белковая основа питательных сред
- Eh – окислительно-восстановительная емкость
- СНО – овариальные клетки китайского хомячка
- СТ – холерный энтеротоксин
- ctx A – ген субъединицы А холерного токсина
- ctx B – ген субъединицы В холерного токсина
- СТХф – профаг холерного вибриона
- FI – капсульный антиген (фракция I) чумного микроба
- GlpA – колонизирующий фактор холерного вибриона
- LB – питательная среда на основе бакто-триптона и дрожжевого экстракта
- MetR – генетический регулятор метаболизма холерного вибриона
- TCBS – элективно-дифференциальная питательная среда для выделения холерного вибриона
- ToxR – регуляторный ген энтеротоксина холерного вибриона
- T2SS – тип секреции холерного вибриона, осуществляющий транзит полимерного питательного субстрата из внешней среды

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Н.Г. Использование сред из аутолизатов пекарских дрожжей для культивирования холерного вибриона и получения токсина / Н.Г. Авдеева, И.А. Дятлов, О.М. Космоенко // Матер. научно-практич. конф., посвящ. 100-летию образования противочумн. службы России.- Саратов, 1997.- Ч.2.- С.241-242.
2. Авторское свидетельство 1081843 СССР, МКИ А23J1/14. Способ получения белкового гидролизата из подсолнечного шрота / В.Н Милютин., В.А Копылов., Е.А. Рожков и др. Опубл.Б.И. – 1986.-№41. – С.267.
3. Агапова, З.А. Стандартизация пептона как основной части питательных сред и биопрепаратов / З.А. Агапова, А.П. Гиллер, А.П. Простяков и др. // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания. - Махачкала,1975.-С.114-117.
4. Агафонова, В.В. Использование стандартных методических подходов для определения эпидемической значимости холерных вибрионов / В.В. Агафонова, Н.Р. Телесманич, Ю.М. Ломов и др. // Клин. лаб. диагн.- 2013.- №5.- С.42 – 46.
5. Адамов, А.К. Холерные вибрионы / А.К. Адамов, М.С. Наумшина - Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та,1984.- 328с.
6. Адгамов, Р.Р. Вариабельность фрагмента гена *inv*, кодирующего функционально-значимый домен инвазина *Yersinia pseudotuberculosis* / Р.Р. Адгамов, Н.Ф. Тимченко, А.В. Алленов и др. // Мол. генетика, 2010.- №1.- С.16-21.
7. Азаргинава, Ф.С. – Изв. Иркут.противочум.ин-та Сибири и Дальн.Вост., 1954.- Т.12.- С.122.
8. Александровская, Н.Б. Биохимическая характеристика дрожжевых аутолизатов / Н.Б. Александровская. Автореф. дис. Рига, 1956.- С.6-14.

9. Алиев, А.М. Сравнительное изучение различных белковых основ для производства бактериологических питательных сред / А.М. Алиев, Л.С. Костенко, П.Ш. Гашимова и др. // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюз. раб. совещания.- Махачкала, 1975.- С. 31-33.

10. Альпер-Юльчевская, Б.А. Питательные среды из пивных и хлебных дрожжей / Б.А. Альпер-Юльчевская // Лаборат. практика, 1940. - №10. – С.1-2.

11. Ананичев, А.В. Гидролиз дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* и *Candida lipolytica* с помощью комплексных ферментативных препаратов / А.В. Ананичев, М.О. Рожанский, В.М. Беликов // Прикл. биохим. и микробиол., 1970. – Вып. VI. - №6. – С.272.

12. Антонов, В.С. Эквивалентность и взаимозаменяемость медицинских изделий / В.С. Антонов // Клин. лаб. диагн.- 2013.- №11.- С.58-61.

13. Антонычева, М.В. Питательные среды для культивирования чумного микроба на основе сухого автолизата пекарских дрожжей, полученного по усовершенствованной технологии / М.В. Антонычева. Автореф. дис... канд. мед. наук.- Саратов. 2012.- 24 с.

14. Аристовский, В.М. Учебник медицинской микробиологии / В.М. Аристовский, И.Е. Минкевич, С.М. Фрид - М.: Медгиз, 1945.-492с.

15. Артёменко, В.Д. Сравнительное изучение физико-химических свойств пептонов, используемых в производстве сухого щелочного агара / В.Д. Артеменко // Журн.микробиол.- 1977.- № 2.- С.125-129.

16. Арыкпаева, У.Т. Особенности питания возбудителя чумы из разных природных очагов в условиях культивирования при 37°C / У.Т. Арыкпаева. Автореф. дис...канд. мед. наук.- Саратов,1980.- 22с.

17. АС 492544 СССР, МКИ с12 н 1/ 06. Среда для выращивания патогенных микроорганизмов/ В.Н. Милютин, Н.Ф. Касаткин (СССР).- № 2009414/31 - 16. Опубликовано 1975 г. Бюл. № 43.

18. АС 738398 СССР, МКИ с12 н1/06. Среда для выращивания чумного микроба / В.Л. Пустовалов, В.Н. Таранова, Л.В. Попкова, В.К. Трухачёва (СССР).- № 2579512/28-13. Опубликовано 1981 г. Бюл. № 21.

19. Ахапкина, И.Г. Питательные среды как искусственная среда роста и развития микроорганизмов / И.Г. Ахапкина, Л.П. Блинкова // Журн. микробиологии.- 2001.- № 6. - С. 99 – 104.

20. Бабёнышев, Б.В. Скрининг штаммов холерного вибриона по скорости роста в микробном анализаторе «Бактрак 4300» / Б.В. Бабёнышев, В.Н. Савельев, Г.М. Грижебовский и др. //Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2010.- Вып. 23.- С.89 – 93.

21. Базанова, Л.П. Изменчивость и агрегативность возбудителя чумы как способ его сохранения в организме *Citellophilus tesquorum altaicus* (Siphonaptera) / Л.П. Базанова, А.Я. Никитин, М.П. Маевский, Ю.М. Капустин // Пробл. особо опасных инф.- Саратов,2004.- Вып.2(88).- С.29 – 33.

22. Бактериологические питательные среды, приготовление и контроль.- Минск,1983.- 38с.

23. Баскина, Л.А. Изучение дрожжевых питательных сред для приготовления кишечных вакцин / Л.А. Баскина, Н.Г. Щербина, В.Г. Здродовская // Бюл. по обмену опытом институтов эпидемиологии и микробиологии, 1947. - №5/23. – С.19-30.

24. Баснакьян, И.Л. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И.Л. Баснакьян. - М.: Медицина, 1992.- 192с.

25. Бахлезина, С.И. Дефицит кислорода увеличивает инвазивную активность и устойчивость к тепловому стрессу *Yersinia pseudotuberculosis* /

С.И. Бахлезина, Ф.Н. Шубин, Т.Ф. Соловьёва // Журн. микробиологии.- 2009.- № 3.- С.18-23.

26. Бахрах, Е.Э. Влияние температуры выращивания на химический состав чумного микроба / Е.Э. Бахрах, В.Д. Егорова, А.Ф. Филиппов // Журн. микробиологии.- 1963.- № 11.- С.29 – 32.

27. Бахрах, Е.Э. Распределение белка и полисахарида в клетках чумного микроба, выросших при 28° и 37°С / Е.Э. Бахрах, В.Д. Егорова, Е.П. Денисова // Журн. микробиологии.- 1964.- № 10.- С. 135 -139.

28. Бахрах, Е.Э. Влияние окислительно- восстановительного состояния питательной среды на рост чумного микроба в условиях аэрации / Е.Э. Бахрах, Ф.К. Дроздовская, Л.И. Глушко // В кн.: Производство бак. препаратов для проф. и диагн. особо опасн. инфекций.- Саратов, 1966.- С. 3 - 9.

29. Бебуришвили, Е.М. Использование непищевого сырья для культивирования L - форм чумного микроба / Е.М. Бебуришвили, Г.С. Дунаев, Л.К. Жога // Особо опасн. инф. на Кавказе.- Ставрополь.1985.- Вып.2.- С.43 – 45.

30. Безопасность работы с микроорганизмами I-II группы патогенности (опасности). Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118 – 13. – М.,2014. – 150с.

31. Бейер, А.П. Влияние температуры культивирования на популяционную структуру штаммов чумного микроба по кальцийзависимости / А.П. Бейер, Г.М. Грижебовский, Ю.М. Евченко, Г.Д. Брюханова // Современ. аспекты природной очаговости, эпидем. и профилактик. особо опасн. инф. болезней: Тез. докл.- Ставрополь,1993.- С. 172 - 174.

32. Белки / Под ред. Г.Нейрата и К.Бейли. - Т.Ш. ч. II. Биохимия белковых веществ: перевод с англ. - М.: Иностранная литература, 1959. - 706 с.

33. Бендас, Л.Г. Ферментативные гидролизаты кормовых дрожжей – основа бактериологических питательных сред / Л.Г. Бендас. Автореф. дис.на соиск.учён.степени канд.биол.наук (096), М., 1971. – С.3-12.
34. Бендас, Л.Г. Кормовые дрожжи как исходное сырьё питательных сред для культивирования микробов / Л.Г. Бендас, Н.В. Сидорчук // Лабораторное дело, 1970. - №1. – С.43-45.
35. Берри, Д. Биология дрожжей / Д. Берри: перевод с англ. - М.:Мир, 1985. - 96 с.
36. Билялов, З.А. Количественное содержание фракции 1 у штаммов чумного микроба в зависимости от температуры и сроков хранения / З.А. Билялов //Тез. X научн. конф. противочумн. учрежд. Средней Азии и Казахстана.- Алма-Ата, 1979.- Вып.1.- С.17 – 19.
37. Бланков, Б.И. О заменителях питательных сред / Б.И. Бланков, Н.И. Грязнов // Методические материалы для городских и районных санитарно – бактериологических лабораторий.- М., Свердловск, 1942.- 29с.
38. Блинкова, Л.П. Обнаружение некультивируемых форм бактерий в лиофилизированных препаратах пробиотиков / Л.П. Блинкова, Ю.Д. Пахомов, О.В. Дмитриева // Журн. микробиологии.- 2013.- № 3.- С.83-88.
39. Богатырёва, Т.Г. Значение кислотообразующих микроорганизмов в технологии хлебобулочных изделий из пшеничной муки / Т.Г. Богатырева // Хлебопекарное производство, 2011.- №1.- С.46-53 // Internet. - <http://www.panor.ru/upload/iblock/363/pnzxadsru/pdf>
40. Богданова, М.И. Питательные потребности и ауксотрофные мутанты холерного вибриона / М.И. Богданова. Автореф. дис... канд. мед. наук.- Саратов, 1969.-16с.
41. Бойко, А.В. Оценка профессиональной подготовленности персонала, допускаемого к работе с патогенными биологическими агентами I-II групп / А.В. Бойко, Т.А. Малыкова, Л.А. Тихомирова и др. // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 2011.- Вып.2(108).- С.12-15.

42. Большая советская энциклопедия. Второе издание/ Под ред. С.И. Вавилова. – Т.5.- Бобовые.- М.: Издат-во «Большая советская энциклопедия»,1950.- С.324 - 325.

43. Бондаренко, Н.Е. Использование стимуляторов роста при составлении производственных питательных сред / Н.Е. Бондаренко, В.В. Ткаченко, Б.А. Никаноров и др. // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала, 1975.- С.164 - 165.

44. Борисенко, Е.Г. Изготовление питательных сред из биомассы углеводородокисляющих дрожжей / Е.Г. Борисенко // Прикл. биохим. и микробиол., 1967. – Т.3. – Вып.2. – С.221-224.

45. Борисенко, Е.Г. Конструирование питательных сред из кислотных гидролизатов белково-витаминных препаратов / Е.Г. Борисенко // Лабораторное дело, 1967. - №8. – С.498-501.

46. Борисенко, Е.Г. Культивирование микроорганизмов на питательных средах, приготовленных из продуктов микробиологического синтеза / Е.Г. Борисенко // Лабораторное дело, 1968. - №3. – С.184-185.

47. Боровикова, Т.П. Вопросы оптимизации питательных сред в производстве чумной живой и холерной вакцин / Т.П. Боровикова, А.Ф. Филиппов, Н.Г. Тихонов// Сб.: Пробл. спец. проф. чумы и холеры.- Саратов, 1985.- С. 80 - 88.

48. Бравова, Г.Б. Способ получения осветлённого экстракта автолизированных дрожжей / Г.Б. Бравова, А.Г. Иванова, Э.А. Шишкова и др. // Патент РФ № 2084171. Дата публикации 20.07.1997 г.

49. Бренёва, Н.В. Клональная структура популяций *Yersinia pestis* в экспериментальных почвенных экосистемах / Н.В. Бренёва, А.С. Марамович В.Т. Климов // Журн. микробиологии.- 2007.- № 1.- С.12 - 17.

50. Брюханова, Г.Д. Актуальные аспекты эпидемиологии и микробиологии чумы в современных условиях / Г.Д. Брюханова. Автореф. дис... док. мед. наук.- Ставрополь, 2004.-47с.

51. Буровая, Ф.И. Изучение влияния условий гидролиза эритроцитарной массы (отходов производства) на состав гидролизатов / Ф.И. Буровая, Н.И. Шапиро, М.И. Стулова, Т.М. Колотинская // Сб. тр.: Разработка и стандартизация бактериологических питательных сред.- М., 1980.- С.93 - 99.

52. Буряков, Б.Г. Опыт экспериментально-производственного выпуска белково-витаминной дрожжевой питательной основы (пептона Д) / Б.Г. Буряков, Г.Д. Харабаджахян, С.А. Угрюмов и др. // Тез. обл. конф. «Проблемы мед. и санитарной микробиол. города».- Ростов-на-Дону, 1987.- С.91 - 92.

53. Бухарин, О.В. Инфекция - модельная система ассоциативного симбиоза / О.В. Бухарин // Журн. микробиологии.- 2009.- № 1. - С. 83 - 86.

54. Быстрый, Н.Ф. / Н.Ф. Быстрый, А.В. Элькина, Н.С. Солодовников и др. // В кн.: Вопр.биохим.и физиол.микроорганизмов. Саратов, 1977.- Вып.5.- С.123.

55. Варгина, А.Г. Тип питательных сред и особенности аминокислотного обмена брюшнотифозных бактерий / А.Г. Варгина, З.И. Ершова, Л.Г. Жданова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. рабочего совещания. - Махачкала,1975.- С. 130 – 133.

56. Вариабельность возбудителя чумы и проблемы его диагностики: Сборник научн. статей / Под ред. Ю.М.Ломова.- Ростов-на-Дону, 2009.-534с.

57. Варфоломеев, С.Д. Микроводоросли – источник биотоплива. пищевых кормов и лекарственных продуктов / С.Д. Варфоломеев, Л.А. Вассерман // Биотехнология.- 2011.- № 2.- С.9 – 33.

58. Васильева, Г.И. Изменение «латентной» вирулентности у вакцинного штамма *Yersinia pestis* при размножении внутри макрофагов / Г.И. Васильева, Е.П. Дорошенко, А.К. Киселева // Журн. микробиологии.- 1988.- № 9.- С.63 – 65.

59. Васильева, З.И. Сухая универсальная питательная среда для эпизоотологического обследования природных очагов чумы (УДС) / М.П. Маевский, А.А. Болдина, А.Г. Вылков // Разработка и производство препаратов мед. биотехнологии: Тез. докл. конф. – Махачкала, 1990.- Ч.2.- С.4 – 5.

60. Вейнблат, В.И. Антигены *Yersinia pestis* (Биохимические и иммунологические аспекты) / В.И. Вейнблат. Автореферат дис.... док. мед. наук.- Саратов, 1974.- 36с.

61. Вейнблат, В.И. Влияние условий культивирования на синтез чумным микробом «мышинного» токсина, липополисахарида, капсульного и основного соматического антигенов / В.И. Вейнблат, Е.Э. Бахрах // Азерб. мед. журнал.-1970.- № 1.- С.59-63.

62. Вейнблат, В.И. Синтетическая питательная среда для выращивания чумных микробов при 28°C и 37°C / В.И. Вейнблат, И.А. Кузьмиченко, А.А. Синичкина, Н.П. Борисова // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1972.- Вып.4.-С.123-127.

63. Видяева, Н.А. Образование биоплёнки у штаммов *Yersinia pestis*, выделенных в астраханской области / Н.А. Видяева, Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева и др. // Журн. микробиологии.- 2010.-№3.- С.3 – 7.

64. Водопьянов, С.О. Влияние сигнала«37°C-низкий рН» на клетки чумного микроба / С.О. Водопьянов // Микробиол. журнал.- 1990.- Т.52.-№ 5.- С.88 – 92.

65. Водопьянов, С.О. / С.О. Водопьянов, И.П. Олейников // Разработка и производство препаратов медицинской биотехнологии.- Махачкала, 1990.- Ч.2.- С.20.

66. Волох, О.В. Изучение биокинетических особенностей и оптимизация условий культивирования холерных вибрионов - продуцентов протективных антигенов, перспективных для внедрения в производство / О.В. Волох, И.А. Шепелёв, С.П. Заднова и др. // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2008.- Вып.1(95).- С.52 - 55.

67. Воробьева, Л.И. Стрессопротективное и перекрёстное действие внеклеточного реактивирующего фактора микроорганизмов доменов бактерий, архей и эукариот и эукариот / Л.И. Воробьева, Е.Ю. Ходжаев, Т.М. Новикова и др. // Микробиология. Сентябрь-Октябрь. - 2013. - Том 82, №5. - С. 588 – 594.

68. Габричевский, Г.Н. / Г.Н. Габричевский. Медицинская бактериология. Четвёртое издание. - М., 1909.- 560с.

69. Гальцева, Г.В. Технология производственного изготовления модифицированной сухой среды Хью-Лейфсона / Г.В. Гальцева, Н.И. Гриднева, Л.Г. Воронежская и др. // В сб. Технология производства сухих диагностических питательных сред. Махачкала, 1974.- Вып. 5.-С.97-100.

70. Гармазова, А.Д. О сохраняемости возбудителей некоторых особо опасных инфекций в воде / А.Д. Гармазова, М.А. Константинова, Г.В. Якубовская Г.В. и др. // Докл. Иркутск. противочумн. ин-та.- Чита, 1961.- Вып.2.- С. 39 – 40.

71. Головнева, С.И. Изучение возможности применения различных растительных основ в питательных средах для культивирования бруцеллёзного микроба / С.И. Головнева, Г.И. Лямкин, Л.С. Кутунина и др. // Сан. охрана территор. гос.-в – участ-в СНГ: пробл. биол. безопасн. и противодействия биотерроризму в соврем. услов.: Матер. VIМежгос. научн.-практ. Конф. гос-в-участ. СНГ.- Волгоград, 2005.- С.220 - 221.

72. Гончарова, М.Н. Динамика размножения чумного микроба ЕВ на разных питательных средах в зависимости от температуры культивирования / М.Н. Гончарова, Г.Ф. Иванова // В сб.: Особо опасные инфекции на Кавказе.- Ставрополь, 1985.- С.92 - 95.

73. Горобец, О.Б. Влияние микроводорослей на жизнеспособность микроорганизмов в естественной и искусственной среде обитания / О.Б. Горобец, Л.П. Блинкова, А.П. Батуро // Журн. микробиологии.- 2001.- № 1. - С.104 - 108.

74. Горяев, А.А. Штаммы *Vibrio cholerae* биовара эльтор с изменённой продукцией холерного токсина: получение и молекулярно-генетический анализ / А.А. Горяев // Автореф. дис... канд. биол. наук.- Саратов. 2009.- 24с.

75. ГОСТ 171- 81. Дрожжи хлебопекарные прессованные. Технические условия. Pressed bakery yeast specification. Москва. Издательство стандартов, 2004// Internet.- <http://standartGost.ru>>g/ГОСТ_171-81.

76. ГОСТ 27543-87.Изделия кондитерские. Аппаратура, материалы, реактивы, питательные среды для микробиологических анализов// Internet.- http://docload.spb.ru/pages_gost/26853.hotm.

77. Грачёва, И.В. Современное состояние классификации некоторых патогенных представителей родов *Bacillus*, *Brucella*, *Burkholderia*, *Francisella*, *Vibrio*, *Yersinia* / И.В. Грачева, Т.Б. Караваева, Т.К. Меркулова, О.П. Плотников // Пробл. особо опасных инф.- 2009.- Вып.1(99).- С.42 – 69.

78. Гремякова, Т.А. Поиск компонентов питательных сред, влияющих на выход биомассы чумного микроба при культивировании / Т.А. Гремякова, О.К. Шулюпин , Е.В. Мицевич, В.Б. Фролов // VI Всерос. съезд микробиол., эпидемиол. и паразитол.: Тез. докл.- М., 1991.- Т.2.- С. 61 - 62.

79. Грубер, И.М. Специфическая активность селективной питательной среды для выращивания бактерий рода *Naemophilus* / И.М. Грубер, В.А. Мельникова, О.А. Шостак, Л.С. Черкасова // Эпидемиол. и инф. болезни.- 2005.- № 3.- С. 15-17.

80. Грязнов, Н.И. Дрожжевые питательные среды для приготовления вакцин / Н.И. Грязнов // Науч.сессия, посв.25-летию Свердл.ин-та микр.и эпид. Тезисы докладов, 1945. – С.28.

81. Губарев, Е.М. Биохимия чумного микроба / Е.М. Губарев, Н.Н. Ивановский - М.: Медгиз, 1958.- 144с.
82. Гюлушанян, К.С. Использование питательной среды на основе кукурузного экстракта в производстве чумной вакцины ЕВ / К.С. Гюлушанян Автореф. дис... канд. биол. наук.- Саратов, 1994.- 24 с.
83. Дейкина, В.Г. О содержании витаминов группы В в кормовых дрожжах различных предприятий // В.Г. Дейкина, Г.И. Помелова, Н.С. Соболева // Гидролизная и лесохимическая промышленность, 1984. - №1. – С.11-12.
84. Джапаридзе, М.Н. / М.Н. Джапаридзе, Н.В. Урюпина, Т.В. Кондрашкова // Проблемы ООИ, 1971.- Вып.3. – С.29.
85. Дмитриевская, Н.А. К вопросу о применении различных питательных сред в целях массового культивирования группы микробов в-лей крысиного и мышиноного тифа / Н.А. Дмитриевская, М.Ф. Чеботаревич // Арх. биол. наук, 1929. - №XXIX. – Вып. III. – С.385-406.
86. Дмитриевская, Н.А. Опыт применения прессованных дрожжей в деле приготовления вакцин против коли-тифозных инфекций / Н.А. Дмитриевская, М.Ф. Чеботаревич // Гиг.и эпидемиол., 1930. - №4-5. – С.42-43.
87. Джапаридзе, М.Н. Влияние условий выращивания на каталазную активность чумного и псевдотуберкулёзного микробов / М.Н. Джапаридзе // В кн.: Тр. ин-та «Микроб».- Саратов, 1960.- Вып. 4.- С.148 - 151.
88. Диагностика особо опасн. и малоизвестн. инфекций (Лабораторные методы исследования).- Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовского ун-та,1970.- 270с.
89. Долгов, В.В. К дискуссии по статье А.В.Эммануэля и соавт. «Практика разработки и внедрения систем менеджмента качества в медицинских учреждениях» / В.В. Долгов //Клин. лаб. диагностика.-2013.- № 4.- С.52 - 53.
90. Домарадский, И.В. Чума: современное состояние, гипотезы, проблемы / И.В. Домарадский - Саратов,1993.- 130с.

91. Домарадский, И.В. Чума / И.В. Домарадский - М.: Медицина, 1998.- 173с.
92. Домарадский, И.В. Использование соевых бобов для приготовления кислотного гидролизата / И.В. Домарадский, Н.З. Трофименко, Н.И. Носкова // Бюл. по обмену опытом: Производство бак. препаратов.- Иркутск, 1961.- Вып.1.- С.7 - 8.
93. Домарадский, И.В. Биохимия и генетика возбудителя чумы / И.В. Домарадский, Е.П. Голубинский, С.А. Лебедева, Ю.Г. Сучков - М.: Медицина, 1974.- 167с.
94. Домарадская, Т.И. Изучение состава культуральной жидкости штамма ЕВ, выращенного при температуре 28° и 37°С / Т.И. Домарадская // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1979.- Вып.5(69).- С.43 – 46.
95. Домотенко, Л.В. Питательные среды для диагностики чумы / Л.В. Домотенко, Я.В. Подкопаев, М.В. Храмов, И.А. Дятлов // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2009.- Вып.4(102).- С.60 - 65.
96. Донецкая, Э.Г. Клиническая микробиология: руководство / Э.Г. Донецкая - М.: Гэотар-Медиа, 2011.- 480 с.
97. Донская, Т.Н. К вопросу о лабораторной диагностике в современных условиях / Т.Н. Донская, А.С. Васенин, И.А. Касьян и др. // Холера: Матер. пробл. комиссии Межвед. науч. совета по сан.-эпид. охране тер. Российской Федерации.- Ростов-на-Дону, 1995.-С.147-148.
98. Дробышева, Т.М. Влияние температуры, среды и сроков хранения на изменчивость чумного микроба ЕВ 8355 / Т.М. Дробышева, А.И. Леошина // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1978.- Вып. 3.- С. 13 – 16.
99. Дроздовская, Ф.К. Влияние глюкозы на рост чумного микроба в условиях аэрации / Ф.К. Дроздовская, Н.К. Муравьева, А.Н. Крайнова // Сб. науч. работ учрежд.: особо опасн. и природноочаг. инфекции.- Москва, 1962.- С.265 – 270.
100. Дуванова, О.В. Влияние температуры культивирования на активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы холерных вибрионов / О.В.

Дуванова, Б.Н. Мишанькин // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. совещания спец. Роспотребнадзора .- Ростов-на-Дону, 2013.- Вып.26.- С. 188 - 191.

101. Дунаев, Г.С. Выделение Л-форм чумного микроба от диких грызунов в природном очаге / Г.С. Дунаев, Л.Ф. Зыкин, И.И. Черченко и др. // Журн. микробиологии. - 1982.- № 8.- С. 50 – 54.

102. Дятлов, И.А. Разработка технологии производства дрожжевого аутолизата как основы конструирования питательных сред для возбудителей особо опасных инфекций / И.А. Дятлов, Н.Г. Авдеева, О.М. Космоенко // Сб.: Разработка и производство диагностических сухих питательных сред и микросистем: Матер. междунардн. научно-практич. конференции. - Махачкала,1998.- С.18 – 19.

103. Елинов, Н.П. Химическая микробиология / Н.П. Елинов - М.: Высшая школа, 1989.- 448с.

104. Ерошенко, Г.А. Основное направление современных исследований биологии холерных вибрионов / Г.А. Ерошенко // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2008.- Вып. 1(95).- С.37 – 41.

105. Ерошенко, Г.А. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов не О1/ не О139 серогруппы, выделенных от больных в Астрахани в 1976- 2003 гг. / Г.А. Ерошенко, Л.М. Куклева, Н.Ю. Шавина, В.В. Кутырев // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2006.- Вып. 2(92).- С.41-44.

106. Ерошин, В.К. Медико-биологические исследования углеводородных дрожжей / В.К. Ерошин, Э.Г. Дедюхина - М.: Наука, 1972, 71с.

107. Ефимова, Н.П. Использование биомассы клостридий перфрингенс в производстве питательных сред для культивирования некоторых патогенных бактерий / Н.П. Ефимова, Г.Н. Новосёлова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала, 1975.-С.156 - 158.

108. Желтенков, А.И. О влиянии содержания посевов культур *Bacterium pestis* при температуре 28° и 37°С на антигенную структуру полученных агаровых фильтратов / А.И. Желтенков, С.В. Анохина // Тр. института «Микроб».- Саратов,1951.- Вып.1.- С.120-129.

109. Заднова, С.П. Штаммы *Vibrio cholerae* с изменённой экспрессией генов вирулентности / С.П. Заднова. Автореф. дис... док. биол. наук. Саратов, 2009.- 45с.

110. Зацепина, В.И. Влияние разных температурных режимов выращивания бактерий чумы на продукцию капсульного антигена (Ф1) / В.И. Зацепина, Л.А. Зайцев // Мат. межгос. науч.-практич. конф. «Актуал. вопр. проф. чумы и др. инф. заболеваний».- Ставрополь,1994.- С.47 – 48.

111. Збарский, Б.И. Биологическая химия / Б.И. Збарский, И.И. Иванов, С.Р. Мардашев - М.: Медгиз, 1960.- 490с.

112. Зиатдинов, В.Б. Холера в Казани / В.Б. Зиатдинов // Мат. Всероссийской научно-практич. конф., посвящ. 80-летию создания гос. эпид. службы России.- М.,2002.- Ч.2.- С.418 - 427.

113. Зыков, Е.Ф. Изучение влияния факторов внешней среды на репаративные свойства холерных вибрионов / Е.Ф. Зыков, А.В. Кунгуров, С.Н. Ившин, Ф.В. Ляпустин // Диагностика забол. Биотехнология: Мат. Всерос. научн.- практич. конф., посвящ 80-лет. со дня основания ФГУ «48 ЦНИИ МО». Киров, 2008.- Вып.1.-С.179 - 181.

114. Зюзина, В.П. Сравнительное изучение токсичности ЛПС из культур *Yersinia pestis*, выращенных при 28° и 37°С / В.П. Зюзина, Г.В. Демидова, И.А. Беспалова и др. // Мат. VIII Всерос. съезда эпидемиол., микробиол. и паразитол.- Москва, 2002.-Т.1.- С.176.

115. Иванова, Г.Ф. Изучение жизнеспособности микробных клеток штамма ЕВ в динамике роста в бульоне при температуре культивирования 21° и 27°С / Г.Ф. Иванова, Д.А. Будыка, А.И. Тинкер и др. // Диагн., леч. и проф. опасных инф. заболеваний. Биотехнология. Ветеринария: Мат. юбилейн. научн. конф.- Киров,1998.- С.299 – 300.

116. Иванова, Н.Г. Осветлённый экстракт автолизированных дрожжей – высококачественный препарат для приготовления питательных сред / Н.Г. Иванова, О.А. Сухих, Э.А. Шишкова, Г.Б. Бравова // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тестсистем. Матер.3-ей Междунар.науч.-практ.конф. Махачкала, 2001. – С.12-13.

117. Иванова, С.М. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов О1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды и от людей на территории Российской Федерации в 2012 году // С.М. Иванова, Г.В. Титов, В.Е. Безсмертный и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. совещания спец. Роспотребнадзора.- Ростов-на-Дону, 2013.- Вып.26.- С. 21 - 23.

118. Иммунологические методы диагностики инфекционных болезней (учебное пособие для врачей-бактериологов) / Составители: Т.Ю. Загоскина, А.А. Вейде, Т.М. Долгова и др.- Иркутск, 2011.- 78с.

119. Инструкция по организации и проведению противохолерных мероприятий.-М., 1995 - С.61-71.

120. Исаев, Н.Д. Влияние условий среды на координированное переключение генов патогенности и персистенции у холерного вибриона / Н.Д. Исаев, С.П. Заднова, Н.И. Смирнова //Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. матер. пробл. комиссии.- Ростов-на –Дону, 2006.- Вып.19.- С.69 - 71.

121. Исламова, Ф.И. Включение геотермальной воды в состав питательной среды для микобактерий / Ф.И. Исламова, Р.А. Нуратинов, Г.М. Абдурахманов // Журн. микробиологии.- 2008.- № 3.- С. 89 - 91.

122. Каграманов, В.С. Сравнительное исследование роста чумного микроба на средах с различными углеводами и органическими кислотами / В.С. Каграманов // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1976.-Вып.3.- С.12 - 14.

123. Кажал, Н. Из истории борьбы против микробов и вирусов / Н. Кажал, Р. Ифтимович - Бухарест: Научное изд-во, 1968.- 402с.

124. Калягина, С.Ю. Создание питательной среды из отходов мясного сырья и оценка её свойств / С.Ю. Калягина // Журн. микробиологии.- 2008.- № 3. - С.91 - 94.

125. Канчух, А.А. Изучение живой противочумной вакцины, приготовленной на средах с кукурузным экстрактом // А.А. Канчух, В.Н. Сагатовский, Н.Е. Сурнина, А.Д. Месунина // Микробиология и иммунология особо опасн. инф.- Саратов, 1964.- С. 102 - 108.

126. Канчух, А.А. Рост чумного микроба и холерного вибриона на средах, изготовленных из гидролизатов казеина с различной глубиной расщепления / А.А. Канчух, Н.Ф. Касаткин, Н.Г. Оганесова и др. // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 1972.- Вып. 4.- С. 118 – 122.

127. Канчух, А.А. Соотношение аминокислот в гидролизатах в процессе расщепления казеина для питательных сред / А.А. Канчух, И.В. Домарадский, Н.Ф. Касаткин и др. // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 1972.- Вып.4 - С. 66 - 72.

128. Канчух, А.А. Утилизация аминокислот холерными вибрионами при размножении в накопительной дрожжевой среде / А.А. Канчух, М.А. Хазан, Л.Б. Милютина, М.С. Дрожжевкина, В.Н. Милютин // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол., 1980. - №7. – С.117-118.

129. Карпекина, Т.А. Ауторегуляция автолитических процессов и интенсификация автолиза дрожжей / Т.А. Карпекина. Автореф. дис.... канд. биол. наук.- М.,2003.- 23с. // Internet. - <http://www.dslib.net/biotechnology/>

130. Карпузиди, К.С. Изучение основных биологических свойств чумного микроба при выращивании и длительном хранении его на средах, содержащих стимулятор роста (лизат микробов-«кормушек») / К.С. Карпузиди, А.М. Хохлова // Тр. Ростовского-на-Дону гос. н.-и. противочум. ин-та.- Ростов-на-Дону,1956.- Т.10.- С.60 - 63.

131. Карташёва, Л Д. Гидролизат белка пшеничных отрубей – новая основа микробиологических питательных сред и его характеристика / Л.Д.

Карташева, О.В. Шеремет // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1994.- Вып. 5. - С. 130 – 138.

132. Касаткин, Н.Ф. Опыт лиофильного высушивания полуфабрикатов и питательных сред / Н.Ф. Касаткин, И.В. Домарадский, А.В. Сеницин и др. // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1971.- Вып. 5.- С.174 - 177.

133. Касаткин, Н.Ф. Кукурузный бульон для выращивания возбудителя чумы / Н.Ф. Касаткин, Н.Г. Ованесова, В.И. Тынянова // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1972.- Вып.4.- С.154-166.

134. Касаткин, Н.Ф. Внедрение в производство сухих агаровых сред на единой казеиново-кукурузной основе / Н.Ф. Касаткин, А.А. Канчух, Н.Л. Кириллова и др. // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля.- Махачкала, 1975.- С.76 – 79.

135. Каталог сухих микробиологических сред / Под ред. М.М. Меджидова - Махачкала, 1992.- 29с.

136. Катунина, Л.С. Разработка новой питательной среды для диагностики чумы / Л.С. Катунина, А.А. Курилова, Т.В. Таран и др. // Теор. основы эпидемиологии. Совр. эпидем. и проф. аспекты инф. и массовых неинф. забол.: Тр. Всерос. научн. конф., посвящ. 210-год. основ. ВМА.- С.-Пб., 2008. - Ч.1.- С.209-210.

137. Кемпист, М.П. О свойствах дрожжевых сред для культур мышинового и крысиного тифа / М.П. Кемпист // Лабораторная практика, 1934. - №8. – С.16-19.

138. Кикалишвили В.Н. Технология питательных сред в производстве бактериальных препаратов / В.Н. Кикалишвили - Тбилиси, Государственное издательство «Сабчота Сакартвело», 1963. – С.13-41.

139. Ковчик, Н.А. Усовершенствование сухого витаминного препарата ЭКД / Н.А. Ковчик, И.И. Литвиненко // Разработка и стандартизация бактериологических питательных сред.- М., 1980.- С. 120 – 123.

140. Козлов, Ю.А. Питательные среды в медицинской микробиологии / Ю.А. Козлов.- М.: Медгиз, 1950.- 252с.

141. Колманян, М. Рост бактерий кишечной группы на дрожжевых средах / М. Колманян, Е. Костарева, А. Лившиц, Н. Гейман // Труды Азербайджанского института микробиологии и эпидемиологии, Баку, 1938. - №VI. – т.I. – С.61.

142. Кондрашкова, Т.В. Казеиновая среда для выращивания чумного микроба / Т.В. Кондрашкова, Л.И. Кузнецова, С.А. Узенцов, Л.С. Курилова // В кн.: Профилактика особо опасных инфекций.- Саратов.1976.- Вып. 1.- С.115 - 117.

143. Коновалов, С.А. Биохимия дрожжей / С.А. Коновалов - М.: Пищевая промышленность, 1980.- 271с.

144. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителя чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцелллёза, легионеллёза: МУ 3.3.2.2124-06.- М., 2007.- 35с.

145. Коняева, О.А. Опыт использования питательных сред на основе сои (бобов) и патоки рафинадной для восстановления жизнеспособности чумного микроба / О.А. Коняева, О.Н. Мухортова, А.С. Катунина и др. // Современные аспекты эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными заболеваниями на Юге России: Материалы науч.- практ. конф. - Ставрополь, 2007.- Ч.1.- С. 189 - 190.

146. Коробкова, Е.И. Живая противочумная вакцина / Е.И. Коробкова - М.: Медгиз,1956.-207с.

147. Коробкова, Е.И. Микробиология и эпидемиология холеры / Е.И. Коробкова - М.: 1959.-304с.

148. Коробова, О.В. Пробл. спец. проф. чумы и холеры / О.В. Коробова, Т.М. Тараненко, В.И. Коробов - Саратов, 1985.- С.10-14.

149. Костюковский, В.М. Разработка методов лабораторной диагностики Л-форм чумного микроба / В.М. Костюковский. Автореф. дис.... канд. мед. наук.- Саратов, 1989.-20с.

150. Красикова, М.Л. К вопросу об использовании непищевого сырья при изготовлении питательных сред для выращивания чумного микроба / М.Л. Красикова // Разработка новых и усовершенствование существующих

сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Мат. 1-го Всесоюз. раб. совещания.- Махачкала, 1975.- С.18- 19.

151. Красовская, Е.И. Принципы экономической оценки разработанных микробиологических питательных сред и других медицинских биологических препаратов / Е.И. Красовская, Л.Н. Запорожцев // Сб. науч. тр.: Разработка и стандартизация бактериологических питательных сред.- М.,1980. - С. 21 – 25.

152. Крестьянова, И.Н. Ферментные препараты для изучения белковых гидролизатов и смесей аминокислот, не содержащих пептидов / И.Н. Крестьянова, Л.И. Васильева, Е.К. Денякина // Прикладная биохимия и микробиология.- 1985.- Том 21.- №1.- С.48 – 57.

153. Крушельницкий, Р.В. Использование отходов производства гидролизатов пекарских дрожжей для приготовления белковой питательной среды / Р.В. Крушельницкий, М.В. Антонычева, С.Р. Нижегородцев и др. // Междунар. мед.-сан. правила и реализация глобал. стратегии борьбы с инф. бол. в гос.-участн. СНГ: Матер. VIII Межгос. научн.-практич. конф. гос.-в-уч. СНГ. - Саратов, 2007. - С. 236 - 237.

154. Крылов, Н.И. Закономерности в соотношении азотсодержащих компонентов в биохимии дрожжей / Н.И. Крылов, Э.Г. Дедюхина, В.К. Ерошин // Прикладная биохимия и микробиология.- 1985.- Т.IXX.- Вып.4.- С.486-489.

155. Крылова, Н.И. Закономерности в соотношении азотсодержащих компонентов в биомассе дрожжей / Н.И. Крылова, Э.Г. Дедюхина, В.К. Ерошин // Прикл. биохим.и микробиол., 1985. – т.19. - №4. – С.486-489.

156. Кудряшева, А.А. Биологически активные добавки в пищевых продуктах нового поколения / А.А. Кудряшова, Л.В. Драчёва // Пищевая промышленность.-1996.- № 6.- С.96 - 97.

157. Кузнецов, В.И. Разработка технологии и внедрение в практику сухих сред для выделения, идентификации и культивирования возбудителей

особо опасных инфекций / В.И. Кузнецов, О.Г. Татарникова, Л.С. Липаева и др. // Матер. научн.-практич. конф., посвящ. 100-летию образ. противочумн. службы России.- Саратов, 1997.- Т.2.- С.188 - 189.

158. Кузьмиченко, И.А. Питательные среды для культивирования возбудителей холеры, чумы, псевдотуберкулёза, приготовленные с использованием ферментного комплекса холерного вибриона – протеовибрина / И.А. Кузьмиченко, О.В. Громова, М.Н. Киреев и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. матер. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2008.- Вып.21.- С.126-127.

159. Кулаковская, Е.В. Действие целлобиозлипида В на клетки *Saccharomyces cerevisiae*: выход ионов калия и подавление накопления полифосфатов / Е.В. Кулаковская, А.Ю. Иванов, Т.В. Кулаковская и др. // Микробиология. - 2008.- Т.77.- № 3.- С.331 - 335.

160. Куликалова, Е.С. Фитопланктон некоторых водоёмов г. Иркутска в связи с обнаружением в них микроорганизмов рода *Vibrio* / Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович, Г.И. Кобанова, В.С. Вишняков // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2010.- Вып.23.- С.29 – 31.

161. Курилова, А.А. Изучение возможности использования питательной среды на основе картофельного гидролизата для культивирования сибирезвенного микроба / А.А. Курилова // Сан. охрана территор. гос-в-участ-в СНГ: пробл. биол. безопасн. и противодействия биотерроризму в соврем. услов.: Матер. VI Межгос. научн.-практ. конф. гос-в-участ.-в СНГ., Волгоград, 2005.- С.254 - 256.

162. Курилова, А.А. Разработка питательных сред на основе сырья растительного происхождения для культивирования возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы / А.А. Курилова. Автореф. дис... канд. биол. наук.- Ставрополь, 2009.- 19с.

163. Кутырев, В.В. Классификация и молекулярно-генетические исследования *Yersinia pestis* / В.В. Кутырев, О.А. Проценко // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1998.- С.11 - 22.

164. Кутырев, В.В. Эпидемически опасные штаммы холерного вибриона: молекулярно-генетические аспекты их происхождения и эволюции / В.В. Кутырев, Н.И. Смирнова // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2004.- Вып. 2(88).- С.5 - 9.

165. Кутырев, В.В. Возбудитель чумы: ультраструктура и локализация в переносчике / В.В. Кутырев, Н.П. Коннов, Ю.П. Волков. - М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2007.- 224с.

166. Кутырев, В.В. Чума на о. Мадагаскар / В.В. Кутырев, Н.В. Попов, Г.В. Ерошенко, Т.К. Меркулова //, 2011.- Вып.2(108).- С.5 - 11.

167. Куцемакина, А.З. Казеиновый гидролизатный агар как чувствительная среда для выращивания чумного микроба / А.З. Куцемакина, Е.С. Бирюкова // Тр. Арм. противочумн. станции.- Ереван, 1963.- Вып.2.- С.217 - 222.

168. Лабинская, А.С. Тесты, реактивы, питательные среды для культивирования и идентификации патогенных бактерий / А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова // Руководство по медицинской микробиологии. Книга II.- М.: БИНОМ, 2010.- С.994 - 1129.

169. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания. МУ 4.2.2218-07.- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.- 87с.

170. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Под ред. Г.Г.Онищенко, В.В.Кутырева.- Изд.2-е, переработанное и доп.- М.: ЗАО «Шико», 2013.- 560с.

171. Ларина, В.С. О жизнеспособности элементарных тел L-форм чумного микроба раннего этапа L-трансформации и их реверсии на почвенных микроорганизмах / В.С. Ларина, В.М. Степанов, А.М. Айкимбаев

// Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Мат. межгос. науч.- практ. конф.- Алма-Ата, 1992.- Ч.1.- С.110 - 113.

172. Ларина, В.С. О сущности гипотезы сохранения чумного микроба в скрытой форме в сложном симбиозе с новым хозяином - почвенным микроорганизмом / В.С. Ларина, В.М. Степанов, А.М. Айкимбаев // Организация эпиднадзора при чуме и меры её профилактики: Мат. межгос. науч.- практ. конф.- Алма-Ата, 1992.- Ч.1.- С.129 – 132.

173. Лебедева, С.А. Особенности свойств бактерий чумы «полёвочьей» разновидности / С.А. Лебедева, В.С. Иванова, А.Л. Трухачёв, А.С. Чернявская // Актуал. аспекты природно-очагов. бол.: Мат. межрегион. науч.- практ. конф., посвящ. 80-лет. Омского НИИПИ.- Омск, 2001.- С.166 – 168.

174. Лебедева, С.А. Влияние компонентов капсульного антигена F1 чумного микроба на протективность вакцинного штамма *Yersinia pestis* EV76 (линия НИИЭГ) / С.А. Лебедева, Л.В. Коссе, И.В. Морозова и др. // Иммунология.- 2007.- Т.28, № 6.- С.352 – 357.

175. Ленинджер, А. Биохимия: Молекулярные основы структуры и функции клеток / А. Ленинджер. - М.: Мир, 1976.- 957с.

176. Либинзон, А.Е. Методические рекомендации по выявлению нехолерогенных вибрионов эльтор экспресс-методом *in vitro* / А.Е. Либинзон, И.С. Шестиалтынова, А.А. Левкович, Е.М. Квасов.- Ростов-на-Дону, 1986 - Утв. Зам. министра здрав. СССР, 1986.- 5с.

177. Линникова, Л.В. Подбор оптимальной среды культивирования для изучения фосфатазной активности чумного микроба / Л.В. Линникова, И.В. Домарадский, Н.Ф. Касаткин // Физиология и генетика микроорганизмов: Мат. конф. микробиологов Сев. Кавказа.- Ростов-на-Дону, 1969.- С.94 - 96.

178. Лобанов, В.В. Плазмокоагулирующие, фибринолитические и протеолитические свойства патогенных и непатогенных холерных вибрионов / В.В. Лобанов // В кн.: Актуальные вопросы микробиологии.- М., 1970.- С.80 -81.

179. Лобанов, В.В. Актуальные проблемы изучения продукции и биологических свойств холерного токсина / В.В. Лобанов. Автореф. дис. ...док. мед. наук. - Ростов-на-Дону, 1994.- 37с.

1 80. Лобанов, В.В. Проблемы колонизации кишечника холерными вибрионами / В.В. Лобанов // Эпидемиол. и инф. болезни.- 2009.- № 3.- С. 37 – 39.

181. Лобанов, В.В. Получение холерного токсина на среде из очищенного дрожжевого экстракта в различных условиях культивирования / В.В. Лобанов, В.Н. Милютин, В.А. Копылов и др. // Пробл. особо опасных инф., Саратов, 1979.- Вып. 5.- С. 24 - 27.

182. Лобанов В.В. Изучение токсинопродукции при культивировании холерных вибрионов на новых питательных средах / В.В. Лобанов, Е.В. Рожков // Микробиол. лаб. диагн. и спец. проф. карантин. инф.- Саратов, 1989.- С. 117 – 123.

183. Лобанов, А.Н. О межпопуляционных взаимоотношениях между водными бактериями-сапрофитами и холерными вибрионами, выделенными в этом же водном биотопе / А.Н. Лобанов, В.В. Сухов, Е.А. Жукова, С.Т. Савченко // Холера и патогенные для человека вибрионы: Информ. проблемн. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2000.- Вып. 13.- С.96 – 97.

184. Ломов, Ю.М. Значение морфологии колоний Л-форм холерных и НАГ-вибрионов в лабораторной диагностике холеры / Ю.М. Ломов, В.А. Копылов, О.В. Прозоровский и др. // Лаб. дело.- 1977.- № 11.- С. 680 – 683.

185. Ломов, Ю.М. Специализированные противоэпидемические бригады как составная часть Всероссийской службы медицины катастроф / Ю.М. Ломов, Б.Н. Мишанькин, Э.А. Москвитина и др. // Эпидемиол. и инф. Болезни.- 1998.- № 6.- С.11-16.

186. Мазрухо, Б.Л. Мониторинг водных объектов окружающей среды г.Ростова-на-Дону на наличие холерных вибрионов / Б.Л. Мазрухо, В.Д. Кругликов, Е.П. Авдеева и др. // Холера и патогенные для человека

вибрионы: Сб. матер. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2007.- Вып.20.- С.128-129.

187. Майский, В.П. Некоторые особенности метаболизма чумного микроба / В.П. Майский // Журн. микробиологии.- 1983.- № 11.- С. 108 - 109.

188. Майский, В.П. Рост чумного микроба на питательных средах, приготовленных на основе кукурузного экстракта / В.П. Майский, А.А. Крылова, Т.А. Быкова // Особо опасн. инф. на Кавказе: Тез. докл.- Ставрополь, 1987.- С.33 - 35.

189. Мартенс, Л.А. Питательные среды из кислотного гидролизата рыбкостной муки и их применение для культивирования возбудителя чумы / Л.А. Мартенс. Автореф. дис...канд. биол. наук.- Саратов, 1964.-19с.

190. Мартиневский, И.Л. Характер питательных потребностей у различных представителей рода *Yersinia* в зависимости от температурных условий выращивания / И.Л. Мартиневский // Матер.VII научн. конф. противочумн. учрежд. Средней Азии и Казахстана.- Алма-Ата, 1971.- С.29 – 31.

191. Мартиневский, И.Л. Влияние температурных и некоторых других условий выращивания на количество pgm^+ клеток у различных штаммов чумного микроба / И.Л. Мартиневский, Л.Ф. Павличенко // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1978.- Вып.1.- С.5 - 8.

192. Матвеев, В.Е. Изучение влияния режимов гидролиза белково-витаминных концентратов на состав гидролизатов и их эффективность при синтезе лизина / В.Е. Матвеев, З.М. Зайцева, В.С. Роговер и др. // Прикладная биохимия и микробиология.- 1985.- Т.XX1.- Вып.4.- С.520 - 527.

193. Меджидов, М.М. Использование непищевого сырья в производстве микробиологических питательных сред / М.М. Меджидов, З.З. Султанов. – Махачкала: Дагестанское книжное издательство, 1986.- 72с.

194. Меджидов, М. М. Разработка и усовершенствование селективных питательных сред для бактериологической диагностики сальмонеллёзной

инфекции / М.М. Меджидов, А.А. Аджиева, Ш.М. Меджидов, М.А. Адилова // Клиническая лабораторная диагностика.- 2005.- № 6. - С.50 - 52.

195. Меджидов, Ш.М. Разработка основы питательного бульона типа Миддл Брука для культивирования микобактерий туберкулёза / Ш.М. Меджидов, З.У. Темиргалиева // Журн. микробиологии.- 2007.- № 4. - С.113 - 114.

196. Медико-биологические исследования углеводородных дрожжей / Под ред. А.А. Покровского.- М.: Наука, 1972.- 468с.

197. Мейнел, Дж. Экспериментальная микробиология / Дж. Мейнел, Э. Мейнел.- М.: Мир, 1967.- С. 46 - 83.

198. Мельникова, В.А. Влияние стрессов на образование некультивируемых форм микроорганизмов, и их восстановление / В.А. Мельникова, Н.А. Михайлова, Н.О. Варганова // Журн. микробиологии.- 2012.- № 2.- С. 109 – 116.

199. Методика составления ведомственных целевых программ Роспотребнадзора и расчётов затрат на их реализацию: Методические рекомендации. МР 5.1.2132-06.- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006.- 38с.

200. Методические рекомендации к контролю питательных сред по биологическим показателям.- М., 1980.- 80с.

201. Методические указания по приготовлению и применению дрожжевых питательных сред для диагностики холеры / Составители: В.Н. Милютин, Л.Б. Елисова, Т.И. Харитоновна и др. Утв. Зам. министра здравоохранения СССР.- Ростов-на-Дону, 1975.- 7с.

202. Методические указания по организации и проведению эпидемиологического надзора в природных очагах чумы Российской Федерации. МУ 3.1.1098-2002.- М.: Минздрав России, 2002.- 112с.

203. Методы контроля бактериологических питательных сред: методические указания: МУК 4.2.2316- 08. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.- 67с

204. Методы контроля бактериологических питательных сред. Методические указания МУК 4.2.2316-08.- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии, 2008.- 67с.

205. Методы общей бактериологии. В трёх томах / Под ред. Ф.Герхардт и др.- М.: Мир, 1983.- 536с.

206. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов / Под ред. В.Н. Милютина.- Ростов-на-Дону: Ростовское книжн. изд-во, 1981. - 176с.

207. Мецлер, Д. Биохимия. Т.2. Химические реакции в живой клетке: перевод с англ. / Д. Мецлер / Под ред. А.Е. Браунштейна, Л.М. Гиномана, Е.С. Северина. - М.: Мир, 1980.- 606с.

208. Микробиология и лабораторная диагностика холеры (краткое руководство) / Под ред. М.С. Дрожжевкиной и В.Н. Милютина.- Ростов-на-Дону: Ростовское книжн. изд-во.- 1975.- 136с.

209. Милютин, В.Н. Использование питательных сред из углеводородных дрожжей для обнаружения холерных вибрионов / В.Н. Милютин, Л.Б. Елисова, А.С. Фомичёва и др. // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1975.- Вып. 6.- С.65 - 68.

210. Милютин, В.Н. Новая питательная среда из углеводородокисляющих дрожжей для выращивания патогенных микробов / В.Н. Милютин, Н.Ф. Касаткин, Л.Б. Елисова и др. // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1975. - №6. – С.30-34.

211. Милютин, В.Н. Разработка сухой основы питательных сред из кормовых углеводородокисляющих дрожжей для бактериологических целей. Сообщ.1. Способ очистки водного экстракта кормовых дрожжей и получение экстракта в сухом виде / В.Н. Милютин, В.А. Копылов, А.Б. Габрилович и др. // Разработка и стандартизация микробиологических питательных сред для диагностики инфекционных заболеваний и производство медико-биологических препаратов: Тез. координац. совещ.- Махачкала, 1982.- С. 117 - 118.

212. Михайлова, Р.С. О систематическом положении штаммов *P. pestis*, выделенных в 1962 году в Армении / Р.С. Михайлова // Тр. Армянской ПЧС.- Ереван, 1964.- Вып.3.- С.51 - 56.

213. Мишанькин, Б.Н. Интегральный характер вирулентности *Yersinia pestis* / Б.Н. Мишанькин // Журн. микробиологии.- 1987.- № 2.- С. 102 - 108.

214. Мишанькин, Б.Н. Возможный путь реализации сигнала повышенной температуры культивирования у чумного микроба / Б.Н. Мишанькин, Л.А. Шевченко, Н.В. Коробейник, Г.Г. Диханов // Микробиол. журн.- 1984.- Т.46.- № 6.- С.42 – 47.

215. Мишанькин, Б.Н. Маннитол-дегидрогеназная активность холерных мибрионов / Б.Н. Мишанькин, Г.Т. Атарова, О.В. Дуванова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. мат. проблемной комиссии.- Ростов-на-Дону, 2005.- Вып. № 18. – С.64 - 66.

216. Мишанькин, Б.Н. Способность *OmpT+* штаммов холерных вибрионов гидролизовать антимикробный пептид протаминсульфат / Б.Н. Мишанькин, Е.В. Шипко, Г.Т. Атарова и др. // Актуальн. вопр. инфекционной патол.: Юбилей. науч.-практич. конф., посвящ. 100-лет. Рост. НИИ микробиол. и паразитол. (Ростов-на-Дону, 23 – 24 сентября 2009г.). - Ростов-на-Дону, 2009.- С. 423 – 426.

217. Мишанькин, Б.Н. Транзиторная гиперинфекциозность у холерного вибриона / Б.Н. Мишанькин, Л.В. Романова, О.В. Дуванова и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. Проблемной комиссии.- Ростов-на-Дону, 2010.- Вып. № 23. – С.77 - 81.

218. Москвитина, Э.А. Расчёт стандартных значений экономического ущерба, наносимого одним случаем холеры, с учётом комплекса противохолерных мероприятий / Э.А. Москвитина, Ю.М. Ломов, В.Д. Кругликов и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. Проблемной комиссии.- Ростов-на-Дону, 2009.- Вып. № 22. – С.23 - 25.

219. Москвитина, Э.А. Холера в период седьмой пандемии: особенности эпидемиологии и профилактики / Э.А. Москвитина, А.Б.

Мазрухо, О.Л. Адаменко О.Л. и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. Проблемной комиссии.- Ростов-на-Дону, 2012.- Вып.№25 – С.17-22.

220. Мохов, Д.А. Опыт применения жидкой питательной среды на основе панкреатического гидролизата казеина для культивирования штаммов-продуцентов Ф1 антигена чумного микроба / Д.А. Мохов, И.В. Маракулин, А.А. Асяев, А.Л. Ковтун // Диагност., лечение и профилактика опасн. инфекц. забол. Биотехнология. Ветеринария: Мат. юбил. науч. конф.- Киров, 1998.- С.318.

221. Найдёнова, Е.В. Опыт использования геномного анализа в условиях мобильного комплекса СПЭБ / Е.В. Найдёнова, С.А. Портенко, Е.С. Казакова и др. // Пробл. особо опасных инф.- 2014.- вып.2.- с.113-114.

222. Наумов, А.В. Метаболические аспекты вирулентности чумного микроба / А.В. Наумов, Ю.И. Кондрашин // Тез. докл. Всесоюзн. конф.: Иммунол. и иммунопроф. чумы и холеры.- Саратов, 1980.- С.3-6.

223. Неклюдов, А.Д. Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами / А.Д. Неклюдов, С.М. Навашин // Прикладная биохимия и микробиология, 1985.- Т.ХХ1.- Вып.1.- С. 3-17.

224. Нестерова, Г.Ф. Дрожжи / Г.Ф. Нестерова, Я.О. Соом, К.С. Петровский, М.А. Самсонов - Б.М.Э.- М.: Советская энциклопедия.- 1977.- С. 485 – 489.

225. Нетрева, Т.М. Питательная среда из эмбрионального белка для выращивания возбудителя чумы / Т.М. Нетрева, В.И. Вейнблат, Т.П. Боровикова, Л.С. Зимарина // Генет., микробиол. и совершенствование методов лаб. диагн. ООИ.- Саратов, 1991.- С.145 – 149.

226. Никанорова, Б.А. Производственные питательные среды на основе ферментативных гидролизатов, полученных с использованием протеолитически активных дрожжевых автолизатов вместо панкреатина / Б.А. Никанорова, Л.А. Коротева // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных

сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала, 1975.-С. 160 - 162.

227. Николаев, Н.И. Чума / Н.И. Николаев.- М.: Медгиз, 1968.- 240с.

228. Николаев, Н.И. Рост чумного микроба на среде из кислотного гидролизата рыбкостной муки / Н.И. Николаев, Е.Э. Бахрах, Л.А. Мартенс, Б.Ю. Петрова // Специфическая проф. особо опасн. инф.- М.,1964.- С.275 - 279.

229. Никульшин, С.В. Изучение ассоциации почвенных амёб с бактериями-возбудителями чумы и псевдотуберкулёза в эксперименте / С.В. Никульшин, Т.Г. Онацкая, Л.М. Луканина, А.И. Бондаренко // Журн. микробиологии.-1992.- № 9 - 10.- С.2-5.

230. Новаковская, С.С. Справочник технолога дрожжевого производства / С.С. Новаковская.- М.: Пищевая промышленность, 1973.- 288с.

231. Носкова, Л.И. Сухая казеиновая среда для выращивания холерного вибриона / Л.И. Носкова // Докл.Ирк.ПЧИ, Иркутск, 1962.- № 4.- С.78-81.

232. Носов, А.М. Использование клеточных технологий для промышленного получения биологически активных веществ растительного происхождения / А.М. Носов // Биотехнология.- 2010.- № 5.- С.8 – 28.

233. Овсова, Л.М. Влияние различных аминокислот и солей аммония в составе синтетической питательной среды на продукцию холерного энтеротоксина / Л.М. Овсова, А.Б. Мазрухо, Ю.М. Ломов и др. // Журн. микробиол., 2003.- №3. – С.16-21.

234. Овчаров, А.К. Гидролиз сухих дрожжей *Candida guilliermondii* ферментами *Aspergillus niger* / А.К. Овчаров, М.О. Рожанский, А.И. Семиолов А.И. // Прикл.биохим.и микробиол., 1971. - №VII. – С.19-23.

235. Оганесянц, Л.В. Способ получения автолизата дрожжей / Л.В. Оганесянц, В.П. Бакулин, Б.Б. Рейтблат // Патент Российской Федерации № 2375440. 2009 . Бюл. № 56.

236. Олли, В.Д. Труды ин-та «Микроб» / В.Д. Олли, Л.С. Петрова.- Саратов, 1958.- № 2.- С.360-370.

237. Онищенко, Г.Г. Совершенствование Федерального эпидемиологического надзора, обеспечение биологической безопасности населения Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, Л.М. Симкалова // Журн. микробиологии.- 2013.- №5.- С.27-35.

238. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж.Хоулта, Н.Крига, П.Снита// 9-е изд. Том 1. - М.: Мир, 1997.- 430с.

239. Осин, А.В. Разработка алгоритма MLST-типирования пандемических и предпандемических штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор / А.В. Осин, Я.М. Краснов, Н.Т. Гусева, Н.И. Смирнова // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2011.- Вып. 1(107).- С.58 – 61.

240. Падкина, М.В. Синтез гетерологичных интерферонов в клетках дрожжей *Pichia pastoris* / М.В. Падкина, Л.В. Парфёнова, А.Е. Градобоева, Е.В. Самбук // Прикладная биохимия и микробиология.- 2010.- Т.46.- № 9.- С.448 - 455.

241. Панасовец, О.П. Обоснование возможности применения новой жидкой питательной среды накопления для выделения сальмонелл из водных объектов / О.П. Панасовец, А.И. Нетрусов, С.В. Головина // Журн. микробиологии.- 2007.- № 4. - С.56 - 58.

242. Пат. 2270246 Российская Федерация. МПК С12N1/16, С12N1/06, С12P13 /04. Способ получения экстракта автолизированных дрожжей / Н.Г. Иванова, Г.Б. Бравова, М.Е. Цельнер, Э.А. Шишкова (Россия); заявлено 09.07.; опубл. 20.02.2006. Бюл.№2.

243. Пат 2350656 Российская Федерация. МПК С12Q1/00, С12Q1/68, G01N 33/569. Способ определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях чрезвычайных ситуаций / И.Я Черепихина, О.П. Фецайлова, В.В. Балахнова и др. (Россия); заявлено 14.02.2006; опубл. 27.03 2007. Бюл. №9.

244. Пат 2392310 Российская Федерация. МПК C12N1/20, C12Q1/04. Среда обогащения для выделения холерного вибриона / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, К.К. Рожков, И.М. Алутин (Россия); заявлено 15.09.2008; опубл. 20.06 2010. Бюл. №17.
245. Перепелица, Л.Г. Использование шрота хлопка в производстве сухих диагностических питательных сред / Л.Г. Перепелица, С.М. Чайковская, С.И. Резван, Н.Х. Юлдашев // Актуал. вопр. разработки препаратов мед. биотехнол.: Тез. конф. 26-27 мая 1988.-Ч.1.- Махачкала,1988.- С.16 - 17.
246. Петрунькина, А.М. Практическая биохимия. 3-е изд. / А.М. Петрунькина - М.: Медгиз, Лен. отд., 1961.- 428с.
247. Платонов, М.Е. Молекулярное типирование *Yersinia pestis* / М.Е. Платонов, В.В. Евсеева, С.В. Дентовская, А.П. Анисимов // Мол. генетика.- 2013.-№ 2.- С. 3 – 12.
248. Покровский, А.А. Медико-биологические исследования углеводородных дрожжей / А.А. Покровский.- М., Наука, 1972. – 75с.
249. Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич.- СПб.: ЭЛБИ - СПб.- 2008.- 352с.
250. Попов, Ю.А. Разработка комплексного алгоритма генотипирования и методов оценки генетического разнообразия природных штаммов возбудителя чумы и холеры / Ю.А. Попов, Г.Ф. Ерошенко, Е.Г. Булгакова, Н.И. Смирнова // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2009.- Вып.4(102).- С. 5 – 10.
251. Попов, Н.В. Формирование современных представлений о механизме энзоотии чумы / Н.В. Попов, Е.И. Кошель, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 2011.- Вып. 3(109).- С.5 - 8.
252. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального

уровней: методические указания МУК 4.2.2870- 1.- М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.- 83с.

253. Постановление Правительства Российской Федерации от 18 декабря 1995 г. «О государственном контроле за медицинскими иммунобиологическими препаратами» (с изменениями и дополнениями от 5 апреля 1999 г.).

254. Прокофьева, Т.И. Подбор питательных сред для выращивания холерного вибриона / Т.И. Прокофьева // Материалы по обмену опытом.- М., 1960.- № 2 (58).- С.10-17.

255. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: СП 3.1.1.2521-09.- М., 2010.

256. Пустовалов, В.Л. Вопросы профилактики природно-очаговых инфекций / В.Л. Пустовалов, Г.И. Васильева, А.К. Киселёва.- Саратов, 1983.- С.16-21.

257. Ралль, Ю.М. Лекции по эпизоотологии чумы / Ю.М. Ралль. - Ставрополь, 1958.- 243с.

258. Раскин, Б.М. Питательные среды, состояние и перспективы разработок / Б.М. Раскин // Сб. тр.: Разработка и стандарт. бактериологич. питат. сред.- М.,1980.- С.3 -9.

259. Рожков, Е.В. Новая сухая среда культивирования для изучения антигенов холерного вибриона / Е.В. Рожков, В.В. Лобанов // Актуальн. вопр. разработки препаратов медицинской биотехнол.: Тез. конф. 26-27 мая 1988.- Ч.1.- Махачкала, 1988.- С. 195.

260. Рожков, Е.В. Азотистая питательная основа из изолята белка шрота семян подсолнечника / Е.В. Рожков, В.А. Копылов, А.В. Гончаров и др. // Акт. вопр. разработки препаратов мед. биотехнол.: Тез. конф.- Махачкала, 1988.- С.20 - 21.

261. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 / Под ред. А.С.Лабинской, Е.Г.Волиной.- М.:БИНОМ, 2008.- 1080с.
262. Ряпис, Л.А. Сапронозы: классификация и номенклатура / Л.А. Ряпис // Эпидемиол. и инф. болезни.- 2006.- № 3.- С. 8 - 11.
263. Савельев, В.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль Тор / В.Н. Савельев, И.В. Савельева, Б.В. Бабёнышев, А.Н. Куличенко // Эпидемиол. и инф. болезни.- 2012.- № 5.- С. 31 - 35.
264. Садиков, В.С. К проблеме комплексной утилизации дрожжей / В.С. Садиков, Н.П. Сеницин // Труды Всес.НИ Витам.ин-та Наркомпищепрома СССР. Белковый сборник, 1936. – Г-1. – Вып.1. – С.32-37.
265. Самойлова, Л.В. Чума / Л.В. Самойлова, Т.Н. Донская, В.И. Вейнблат и др. // Лабораторная диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней.- Т.1.- Саратов, 1998.- С. 3 - 49.
266. Самыгин, В.М. Характеристика штаммов возбудителя чумы из Волго-Уральского очага Правобережной поймы реки Урала / В.М. Самыгин. Автореф. дис. ... канд. мед. наук.- Саратов, 1982.- 16с.
267. Саямов, Р.М. Штамм вибриона Эль-Тор серотипа Огава - продуцент холерного энтеротоксина / Р.М. Саямов, В.П. Авроров, Т.А. Ханумьян // Журн. микробиологии. - 1983.- № 3.- С.40 - 42.
268. Саяпина, Л.В. Изучение диагностической ценности новой питательной среды для выделения холерного вибриона электроно-дифференциальной сухой (СЭДХ) / Л.В. Саяпина, Т.И. Анисимова, И.В. Шестопалова, И.В. Грачёва // Пробл. особо опасных инф. – Саратов, 1994.- Вып. 4.- С. 113 – 121.
269. Саяпина, Л.В. Обеспечение препаратами, предназначенными для профилактики и диагностики холеры / Л.В. Саяпина, И.В. Касина, И.С. Барулина // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. проблемной комиссии.- Ростов-на-Дону, 2009.- вып.22.- с.138-140.

270. Седова, Н.Н. Опыт использования грибных гидролизатов кормовых дрожжей в качестве основы питательных сред для изучения энтерококков / Н.Н. Седова, Л.Г. Бендас // Лабораторное дело, 1970. - №1. – С.45-46.
271. Серебряков, В.А. К вопросу о применении дрожжевых сред / В.А. Серебряков, И.Я. Авербух // Лабораторная практика, 1941. - №4. – С.12.
272. Скурихин, И.М. Всё о пище с точки зрения химика: учебн. пособие / И.М. Скурихин, А.П. Нечаев.- М.: Высшая школа, 1991.- 288с.
273. Смирнова, Г.А. Состояние и перспективы развития сырьевой базы производства питательных сред / Г.А. Смирнова // Журн. микробиологии.- 1991.- № 5.- С.65-67.
274. Смирнова, Е.Б. Использование растительного сырья в питательных основах / Е.Б. Смирнова, О.Л. Старцева, Л.С. Катунина и др. // Актуальн. вопр. разработки и производства диагн. пит. сред и тест-систем: Мат. 3-й Международн. научно-практич. конф.- Махачкала, 2001.- С.1.
275. Смирнова, Н.И. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период / Н.И. Смирнова, А.А. Горяев, В.В. Кутырев // Мол. генетика.- 2010.- № 4.- С.11 – 19.
276. Соколенко, А.В. Особенности обмена некультивируемых форм холерного вибриона / А.В. Соколенко, Ю.М. Ломов, Л.Е. Асеева // Успехи современного естествознания, 2002.- № 2.- С.22 – 30.
277. Сомова, А.Г. Пробл. особо опасных инф. / А.Г. Сомова, Р.М. Саямов // – Саратов, 1974.- Вып.3.- С.110.
278. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера.- М.: Медицина, 1967.- 463с.
279. Справочник по микробиологическим питательным средам / Под ред. М.М. Меджидова.- Махачкала: Дагестанское книжное издательство, 1989.- 101с.

280. Специфическая индикация патогенных биологических агентов: Практическое руководство / Под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко. – М.: ЗАО «МП Гигиена», 2006. – 288с.

281. Старцева, О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения / О.Л. Старцева. Автореф. дис... канд. биол. наук.- Ставрополь, 2005.- 21с.

282. Старцева, О.Л. Использование питательных сред, приготовленных на ферментативных основах сои и говяжьего мяса, в качестве накопительных при культивировании *Yersinia pestis* EV / О.Л. Старцева, Л.С. Катунина, О.В. Малецкая и др. // Сан. охрана территор. гос-в - участ-в СНГ: пробл. биол. безопасн. и противодействия биотерроризму в соврем. услов.: Волгоград, 2005.- С.290 - 292.

283. Стейниер, Р. Мир микробов. Том 1: перевод с англ. / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм.- М.: Мир, 1979.- 320с.

284. Степанов, В.М. К вопросу о влиянии факторов питания на формирование чумного микроба / В.М. Степанов // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1969. – Вып.3.- С. 92 - 95.

285. Степанов, В.М. Изучение влияния различных источников углерода на рост возбудителя чумы / В.М. Степанов // Матер. VII науч. конф. противочум. учрежд. Ср. Азии и Казахстана.- Алма-Ата, 1971.- С.61- 63.

286. Степанов, В.М. Изучение влияния среды культивирования на некоторые показатели биохимической активности возбудителя чумы и псевдотуберкулёза / В.М. Степанов, О.В. Кондратьева // Мат. VIII науч. конф. противочум. учрежд. Ср. Азии и Казахстана.- Алма-Ата,1974.- С.72 - 74.

287. Стентон, Гланц. Медико-биологическая статистика / Гланц Стентон.- М.: Практика, 1999.

288. Сулейменов, Б.М. Энзоотия и эпизоотия чумы: монография / Б.М. Сулейменов.- Алматы, 2009.- 475с.

289. Султанов, З.З. Разработка и изучение биологических свойств питательных сред на основе гидролизата сои / З.З. Султанов, Е.А. Какулина, Э.И. Султанова и др. // Клин. лаб. диагн.- 2011.- № 3. - С.52 - 54.

290. Сурмин, В.М. Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностикумов и производство питательных сред / В.М. Сурмин, О.Б. Чимиров, Л.И. Терентьева. - Махачкала, 1975.- С.20.

291. Сулова, В.С. Опыт применения кормовых дрожжей для приготовления питательных сред / В.С. Сулова, Г.В. Романов, В.В. Гагаринская, Л.Г. Бендас // Лабораторное дело, 1968. - №3. – С.170-173.

292. Сучков, Ю.Г. Естественная генетическая маркировка штаммов чумного микроба из природных очагов Кавказа / Ю.Г. Сучков, Г.Н. Розанова, Ю.М. Елкин, Л.И. Грамотина // Пробл. природ. очагов чумы.- Иркутск,1980.- Ч.2.- С. 35 - 36.

293. Татарина, С.Д. Основные питательные среды, используемые в работе с энтеробактериями / С.Д. Татарина. - М., 1980.- 28с.

294. Телесманич, Н.Р. Некоторые фенотипические свойства СТХ-ТСП+ штаммов *V.cholerae eltor* / Н.Р. Телесманич, Ю.М. Ломов, А.В. Колякина, В.В. Агафонова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. мат. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2006.- Вып.19.- С.48 - 51.

295. Телесманич, Н.Р. Роль лектинов в изменчивости холерных вибрионов (биотехнологические аспекты использования) / Н.Р. Телесманич, Ю.М. Ломов, А.Б. Мазрухо // Главный врач.- 2011.-№ 3 (26).- С.58 – 61.

248. Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты / Л.Я. Телишевская. - М.: Аграрная наука, 2000.- 296с.

296. Терентьева, Л.И. Усовершенствование плотных питательных сред для диагностики холеры / Л.И. Терентьева, А.П. Ермилов, А.Г. Стогова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала, 1975.- С. 73 - 76.

297. Терентьева, Л.И. Сравнительное изучение роста штаммов чумного микроба, выделенных из различных очагов, на плотной дрожжевой среде / Л.И. Терентьева, Т.М. Архангельская // Тез. X научн. конф. противочумн. учрежд. Ср. Азии и Казахстана.- Алма-Ата, 1979.- Вып.2.- С.272 – 274.

298. Тимербаева, Р.Х. Оптимизация технологии получения препаратов – пробиотиков / Р.Х. Тимербаева. Автореф. дис... канд. биол. наук.- Уфа, 2005.- 21с.

299. Тимофеева, Л.А. Сухие питательные среды из селезёнки, печени, мозга и сердца крупного рогатого скота / Л.А. Тимофеева, Л.И. Носкова, Н.З. Трофименко // Изв. Иркутск. противочумн. ин-та.- Иркутск, 1960.- Т.23.- С.97 - 99.

300. Тимофеева, Л.А. Возможность использования сухой цветной среды, изготовленной из кислотно-казеинового гидролизата, для дифференциальной диагностики чумного и псевдотуберкулёзного микробов / Л.А. Тимофеева, Н.З. Трофименко, В.Я. Головачёва // Докл. Иркутск. противочумн. ин-та.- Чита, 1974.- Вып.10.- С.115 - 117.

301. Тинкер, И.С. Чума / И.С. Тинкер, А.Е. Алёшина // Лаб. диагн. особо опасн. и малоизвестн. бакт. инфекций. - Ростов-на-Дону: Рособлполиграфиздат, 1963.- С.71- 117.

302. Титов, В.А. Метилглиоксаль - тест нарушения биохимических функций экзотрофии и эндозекологии низкого уровня глюкозы в цитозоле и глюконеогенеза из жирных кислот / В.А. Титов, Л.Ф. Дмитриев, В.А. Крылин, В.А. Дмитриев // Клин. лаб. диагн.- 2010.- №.3.- С. 22 - 36.

303. Ткаченко, В.В. Производственные питательные среды на основе ферментативных гидролизатов, получаемых с использованием протеолитически активных дрожжевых автолизатов вместо панкреатина / В.В. Ткаченко, И.А. Уланов, Б.А. Никаноров, Л.А. Коротеева // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала, 1975.- С. 160 - 162.

304. Ткаченко, И.Н. Разработка технологий получения гидролизатов из молок лососевых рыб / И.Н. Ткаченко, Л.Д. Тимченко, Л.С. Катунина, О.Л. Старцева // Современ. аспекты эпид. надзора за особо опасн. инф. забол. на Юге России: Матер. научн.- практич. конф. 21-22-марта 2007г.- Ставрополь, 2007.- Ч.II.- С.137 - 139.

305. Трифонова, А.А. Роль составных частей крови различных видов животных в питании чумного микроба / А.А. Трифонова. Автореф. дис...канд. мед. наук.- Саратов,1954.- 11с.

306. Трифонова, А.А. Питательная среда из кровяных сгустков для культивирования чумного микроба / А.А. Трифонова, А.В. Тереножкина // Микробиол. и иммунол. особо опасн. инф.- Саратов,1964.- С.287 – 290.

307. Трофименко, Н.З. Среда из ферментативных гидролизатов соевых бобов для выращивания чумного микроба / Н.З. Трофименко, Н.И. Колесинская, Л.П. Носкова // Пробл. особо опасных. инф.- Саратов,1969.- Вып.3.- С.212 - 213.

308. Трофименко, Н.З. Питательные среды на дрожжевых гидролизатах для выращивания холерных вибрионов / З.И. Васильева, Л.С.Минаева, А.Д. Сафонова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала, 1975.- С. 23 - 25.

309. Трошкова, Г.П. Совершенствование технологии приготовления питательных сред на основе ферментативных гидролизатов рисовой и соевой муки / Г.П. Трошкова, Л.Д. Мартинец, Е.В. Кирова и др. // Биотехнология.- 2006.- № 4.- С.74 – 78.

310. Трухачёв, А.Л. Поиск праймеров на основе хромосомной ДНК *Yersinia pestis* для наиболее эффективной ПЦР-идентификации типичных и атипичных штаммов возбудителя чумы / А.Л. Трухачев, В.С. Иванова, Т.Е. Арсеньева // Клиническая лабораторная диагностика. -2008. - № 12. - С.49-52.

311. Туманский, В.М. Микробиология чумы / В.М. Туманский - М.: Медгиз, 1958.- 268с.
312. Тюлембаев, М.А. Влияние качества питательных сред и стимуляторов роста на синтез и свойства капсульного антигена возбудителя чумы / М.А. Тюлембаев, Л.Н. Классовский, А.М. Тлеугабылова, А.И. Парфирьева // Генетика, микробиол. и совешенств. методов лаб. диагн. ООИ.- Саратов,1991.- С.135-139.
313. Фаддеева, Т.Д. Холера и борьба с ней / Т.Д. Фаддеева.- М.: Медгиз, 1959.- 230с.
314. Фараджаева, Е.Д. Производство хлебопекарных дрожжей / Е.Д. Фараджева, Н.А. Болотов.- СПб.: Профессия, 2002.- 168с.
315. Фердман, Д.Л. Биохимия / Д.Л. Фердман.- М.: Высшая школа,1966.- 643с.
316. Филиппов, А.Ф. Выращивание культур чумного микроба на средах из аутолизатов рыбы / А.Ф. Филиппов, Т.В. Кондрашкова, Н.К. Муравьева и др. // Пробл. особо опасных инф.- Саратов, 1973.- Вып.6.- С.74 - 77.
317. Фирсов, Н.Н. Микробиология: словарь терминов / Н.Н. Фирсов.- М.: Дрофа, 2006.- 256с.
318. Фишер, Г.М. Питательные среды из рыбкостной муки / Г.М.Фишер // Изв. Иркутск. противочумн. ин-та.- Иркутск,1946.- Вып. 6.- 279 - 281.
319. Хазан, М.А. Конструирование из непищевого сырья плотных питательных сред для диагностики и накопления бактериальной массы чумного микроба / М.А. Хазан. Автореф. дисс...канд. биол. наук.- Саратов, 1987.- 24с.
320. Хазан, М.А. Разработка и характеристика сухих сред из непищевого сырья для диагностики и накопления биомассы возбудителя чумы / М.А. Хазан, В.В. Король, В.А.Копылов и др. // Актуальн. вопр. разработки препаратов мед. биотехнол.- Ч.1.- Махачкала, 1988.- С.12 - 13.

321. Харабаджаян, Г.Д. Разработка и производство препаратов медицинской биотехнологии / Г.Д. Харабаджаян, О.В.Шеремет, Ю.М.Ломов и др. - тез. реф.- Махачкала, 1992.- С.46 - 47.

322. Харькова, Н.М. Влияние ионов железа на рост и некоторые биологические свойства штамма ЕВ чумного микроба / Н.М. Харькова. Автореф. дис. ...канд. биол. наук.- Ставрополь, 1974.- 16с.

323. Хиллман, Г. Определённость и неопределённость в биохимических методах: перевод с англ./ Г. Хиллман. - М.: Мир, 1975.- 156с.

324. Хлябич, Г.Н. Современные научные разработки в области сухих питательных сред и перспективы дальнейших исследований / Г.Н. Хлябич, Е.А. Зонова, Б.М. Раскин // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала,1975.- С. 1 - 4.

325. Челдышова, Н.Б. Сравнительный протеомный анализ штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, утративших профаг СТХФ / Н.Б. Челдышова, Т.А. Кульшань, С.П. Заднова, Н.И. Смирнова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора в г.Ростове- на- Дону 5-6 июня 2013 г.).- Ростов-на-Дону: Дониздат, 2013.- Вып. 26.- С.112 - 115.

326. Черкасова, Л.С. Питательная среда для выделения *Neisseria meningitidis* / Л.С. Черкасова, И.С. Королёва, И.М. Грубер и др. // Журн. микробиологии. - 2008.- № 1.- С.69-71.

327. Чимиров, О.Б. Матер 8-й науч.конф.противочумн.учрежд.Ср.Азии и Казахст. / О.Б. Чимиров, А.Г. Стогова. - Алма-Ата, 1974.- С.412.

328. Шамсудинова, Б.М. Технология получения экстракта хлебных дрожжей на основе продукции махачкалинского дрожжевого завода / Б.М. Шамсудинова // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тестсистем. Матер. 3-ей Междунар. науч.-практ. конф. Махачкала, 2001. – С.24-25.

329. Шаханина, И.Л. Разработка автоматизированной системы расчёта «стандартных» значений экономического ущерба наносимого одним случаем инфекционных болезней / И.Л. Шаханина, Л.А. Осипова, Д.Л. Виноград // Журн. микробиологии.- 1993.- № 1.- С.33- 39.

330. Шведов, В.В. Перспективные питательные среды для производства медицинских иммунобиологических препаратов, выпускаемые ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» / В.В. Шведов, А.Г. Лазыкин, А.А. Лещенко // Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инф. бол. на тер. гос-в-участн. СНГ: Матер. 1X Межгос. научно-практич. конф.- Волгоград, 2008.- С. 303 - 304.

331. Шевченко, Ф.И. О преимуществах дрожжевого агара при массовом изготовлении вакцины / Ф.И. Шевченко // Журн. микробиол., эпидемиол.и иммунобиол., 1939. - №11. - С.11-12.

332. Шевченко, Ф.И. Применение дрожжевых сред в вакцинном производстве / Ф.И. Шевченко // Журн. микробиол., эпидемиол.и иммунобиол., 1942. - №7. - С.11.

333. Шепелин, А.П. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред / А.П. Шепелин, Л.В. Домотенко, И.А. Дятлов и др. // Клин. лаб. диагностика, 2015.- № 6, Том 60. – С.63-65.

334. Шепелин, А.П. Использование унифицированной белковой основы при производстве питательных сред для диагностики ООИ / А.П. Шепелин, М.В. Храмов, М.Н. Мартовецкий и др. // Чрезвыч. ситуации междунароудн. знач. в обществ. здравоохран. и сан. охрана тер. гос.- участн. СНГ: Мат. VII Межгос. науч.-практич. конф. гос.- участн. СНГ.- Оболенск, 2006.- С.255 - 256.

335. Шепелин, А.П. Роль и место микробиологии в решении вопросов модернизации здравоохранения / А.П. Шепелин, И.А. Дятлов // Оболенск: А-Принт, 2012.- 111с.

336. Шеремет, О.В. Новые питательные среды для возбудителя чумы / О.В. Шеремет. Автореф. дис...док. мед. наук.- Саратов, 1991.- 45с.

337. Шеремет, О.В. Питательные среды для дифференциации возбудителей чумы и псевдотуберкулёза / О.В. Шеремет, Е.П. Голубинский, Н.Н. Винидченко // Пробл. особо опасных инф.- Саратов.1978.- Вып.4.- С.65 - 66.

338. Шеремет, О.В. Оценка удельной скорости роста чумного микроба / О.В. Шеремет, В.А. Копылов // Вопр. профилактики природноочаговых инфекций.- Саратов,1983.- С.13 – 16.

339. Шеремет, О.В. Оптимизация условий культивирования чумного микроба на дрожжевой среде при 37°C / О.В. Шеремет, В.Н. Милютин, А.А. Канчух, Я.Н. Корганов // Микробиол., генетика и иммунол. чумы и холеры.- Саратов, 1983.- С.16 - 20.

340. Шеремет, О.В. Разработка способа управления ростом и биосинтетическими процессами чумного микроба. 1. Конструирование синтетической среды для выращивания возбудителя чумы в условиях лимитирования различных компонентов питательной среды / О.В. Шеремет, Л.Д. Карташёва, Л.Н. Зинченко, В.Ю. Рыжков // Биотехнология.- 1994.- № 3.- С.27 – 29.

341. Шиманюк, Н.Я. Хитиназная активность у спонтанных мутантов холерного вибриона O139 серовара / Н.Я. Шиманюк, Г.Т. Атарова, С.О. Водопьянов и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. матер. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2007.- Вып. 20.- С. 80 - 82.

342. Шиманюк, Н.Я. Биохимия, патофизиология и микробиология ООИ / Н.Я. Шиманюк, Б.Н. Мишанькин/. - Саратов, 1983. - С.27-30.

343. Шиянова, А.Е. Научное обоснование реализации эпидемиологической и санитарно-гигиенической составляющих санитарной охраны территорий / А.Е. Шиянова. Автореф. дис...канд. мед. наук.- Саратов, 2009.- 22с.

344. Шпилевая, Э.Г. Об экономичном расходовании мясных и казеиновых гидролизатов при изготовлении агара Хоттингера для чумного микроба / Э.Г. Шпилевая, М.Н. Гончарова, Е.В. Юндин, В.С. Матюшенко // Особо опасн. инф. на Кавказе: Тез. докл. шестой краевой научн. конф.- Ставрополь, 1987.- С.392 -393.

345. Энциклопедический словарь медицинских терминов. В 3-х томах. - М.: Сов. энциклопедия, 1983.

346. Эртуганова, З.Л. Некоторые рекомендации по рациональному использованию хлебных дрожжей в производстве сухих питательных сред / З.Л. Эртуганова, Л.Д. Газиумарова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Матер. 1-го Всесоюзн. раб. совещания.- Махачкала, 1975.- С. 86-87 .

347. Юргина, З.А. Изучение казеиновых сред в целях диагностики чумного микроба / З.А. Юргина // Межинститут. научн. конф.- Саратов, 1955.- Вып 1.- С.66.

348. Abd, Y. *Vibrio cholerae* O139 requires neither capsule nor LPS O side chain to grow inside *Acanthamoeba castellanii* / Y. Abd, A. Saeed, A. Weintraub, G. Sandstrom // J. Med. Microbiol. - 2009. -Vol.58. - Pt.1. - P.125-131.

349. Abrott, T.J. Plating media for the identification of *Yersinia pestis* / T.J. Abrott // US patent 000402(A1). - 2007. // Internet. - [http://patent application 20070004021](http://patentapplication20070004021).

350. Abuaita, B.H. Bicarbonate induces *Vibrio cholerae* virulence gene expression by enhancing ToxT activity / B.H. Abuaita, J.H. Whitney // Infect. Immun.- 2009. - Vol.77. - № 9. - P. -4111 - 4120.

351. Abulhassan, A.M. Baker's yeast quality evaluation for repacking and storage under Sudan condition / A.M. Abulhassan, A.S. Sayied // J. Applied and Industrial Sciences. - 2013. - Vol. 1. - № 2. - P.6 - 15.

352. Adamberg, K. Advanced continuous cultivation methods for systems microbiology / K. Adamberg , K. Valgepea, R. Vilu // Microbiology.- 23 July 2015.- vol.161.- doi:10.- 1099/mic. 0.000146.
353. Agarwala, S. The enzymatic of glutathione of *Vibrio cholerae* / S. Agarwala , V. Moban Rao, D. Shrivastava // *Experientia (Basel)*. - 1953. - № 9. - P. 257 - 259.
354. Agarwala, S.C./ S.C. Agarwala and D.L. Shrivastava // *J.Sci. Industr. Res.*- 1953. - V. 12B. -P.325.
355. Ali, Afsar. Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of *Vibrio cholera* / Afsar, Ali, J.G. Morris, J.A. Johnson // *J. Clin. Microbiol.* - 2005.- Vol. 43. - P. 1426 - 1429.
356. Almagro-Moreno, S. Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine / S. Almagro-Moreno, E.F. Boyd // *Infect. Immun.* - 2009.- Vol.77. - № 9. - P.3807-3816.
357. Amann, R.J. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation / R.J. Amann, W. Ludwig, K.-H. Schleifer // *Microb. Rev.* - 1995. - Vol. 59(1). - P. 143 - 169.
358. Anisimov, A.P. Interspective diversity of *Yersinia pestis* / A.P. Anisimov, L.E. Lindler, G.N. Pler // *Clin. Microb. Rev.* – 2004, April. - P. 434-464.
359. Aoki, H. Nanotransportation system for cholera toxin in *Vibrio cholerae* O1 / H. Aoki, H. Wu, T. Nakano // *Med. Mol. Morphol.*- 2009.- Vol.42.- № 1.- P.40 – 46.
360. Baharoglu, Z. Connecting environment and genome plasticity in the characterization of transformation – induced SOS regulation and carbon catabolic control of *Vibrio cholerae* integron integrase / Z. Baharoglu, E. Krin, D. Mazel // *J. Bacteriol.*- 2012.- Vol.194.- № 7.- P. 1659 - 1667.
361. Basic laboratory protocols for presumptive identification of *Yersinia pestis* 4/18/0// Internet. - <http://www.health.state.us/health.alter/plague/LabProtocols>.

362. Beach, M.B. Identification and characterization of the *fis* operon in enteric bacteria / M.B. Beach, R. Osuna // *J.Bacteriol.* - 1998. - Vol. 180. - № 22. - P. 5932 - 5946.
363. Bearden, S.W. An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB 11 / S.W. Bearden, T.M. Staggs, R.D. Perry // *J. Bacteriol.*-1998.- Vol.180.- № 5.- P.1135-1147.
364. Benktander, J. The repertoire of glycosphingolipids recognized by *Vibrio cholerae* / J. Benktander, Angström, H. Karlsson et al. // *PLoS One.* - 2013.- Vol.8(1).- e53999.
365. Ber, R. Development of an improved selective agar medium for isolation of *Yersinia pestis* / R. Ber, E. Mamroud, M. Aftalion et al. // *Appl. Environ. Microbiol.*, - 2003.- Vol.69.- P.5787 - 5792.
366. *Bergey's manual of systematic bacteriology* // Garrity G., Holt.- Springer, 2000.- Vol.1.- 742p.
367. Bhuiyan, N.A. Changing genotypes of cholera toxin (CT) of *Vibrio cholerae* O 139 in Bangladesh and description of three new CT genotypes / N.A. Bhuiyan, S. Nusrin, A. Alam et al. // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*- 2009.- № 57.- P.136-141.
368. Bina, J. Tox R regulon of *Vibrio cholera* and its expression in vitro shed by cholera patient / J. Bina, J. Zhu, M. Dziejman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-2003.- Vol. 100.- P.2801 - 2806.
369. Blackwell, R.Q. pH studies in diarrhoea. I.Comparison of initial pH values of cholera and non-cholera stool / R.O. Blackwell // *Ann. Trop. Med.Paris.*- 1961.- Vol.55.- № 3. - P. 320 - 327.
370. Blass, T. / T. Blass // *Ann.Ins. Past.*, 1947.- V.73.- P.885.
371. Blokesch, M. Chitin colonization, chitin degradation and chitin – induced natural competence of *Vibrio cholerae* are subject to catabolite repression / M. Blokesch // *Environ. Microbiol.* - 2012.- Vol. 14.- № 8.- P. 1898 - 1912.

372. Bogard, R.W. Met R – regulated *Vibrio cholerae* metabolism is required for virulence / R.W. Bogard, B.W. Davies, J.J. Mekalanos // *Mbio.*- 2012.- Vol.3.- № 5.- P. e00236-12.
373. Botstein, D. Yeast as a model organism / D. Botstein, S.A. Chervitz, J.M. Cherry // *Science.*- 1997.- Vol.277(5330).- P.1259 - 1260.
374. Braker, M. Gymrek M., Schuldier M. // *J. Cell Biology.*- 2013, 18 March. – Vol. 200. - № 6. - P. 839 – 850.
375. Brennan, T.C.R. A novel signal-cell screening platform reverses proteome plasticity clearing yeast stress responses. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to d-limonane show changes to the cell wall but not to the plasma membrane / T.C.R. Brennan, J.O. Krömer, L.K. Nielsen // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2013.- Vol.79.- № 12.- P. 3590 - 3600.
376. O'Brien, Maru Modified tourocholate-tellurite-gelatin agar for improved differentiation of *Vibrio* species / Maru O'Brien, Rita Colwell // *J. Clin. Microbiol.* - 1985.- Vol. 22.- № 6.- P.1011-1013.
377. Brownlow, C.W.Y. / C.W.Y. Brownlow, G.E. Wessman // *J.Bacteriol.*- 1960.- V.79, № 2.- P.299.
378. Brubaker, R.R. Factors promoting acute and chronic diseases caused by yersiniae / R.R. Brubaker // *Clin. Microbiol. Rev.*- 1991.- Vol. 4.- P. 309 - 324.
379. Brubaker, R.R / R.R. Brubaker, M.Y. Surgala // *J. Inf. Dis.*- 1964. - V.114.- P.13-25.
380. Burrows, T.W. Virulence of *Pasteurella pestis* / T.W. Burrows // *Nature.*- 1957. - Vol.179.- P. 1246 – 1247.
381. Burrows, T.W. Genetics of virulence in bacteria (*P.pestis*) / T.W. Burrows // *Brit. med. bull.*- 1962.- Vol.18.- P. 69 - 73.
382. Burrows, T.W. The nutritional requirements of some *Pasteurella pestis* species / T.W. Burrows, W.A. Gillet // *J. Gen. Microbiol.* - 1966.- Vol.45.- № 3.- P.333-339.

383. Burrows, W.T / T.W. Burrows, G.M. Musteikis, N.B. Oza et al. // *J. Infect.Dis.*, 1965.- V.115.- P.1.
384. Cakar, Z. P. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties / Z.P. Cakar, B. Turanli-Yildiz, C. Alkim, V. Yimaz // *FEMS Yeast Res.*- 2012.March.- Vol.12(2).- P.171 - 182.
385. Callahan, L. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence. II. Skin permeability factor (cholera enterotoxin production in chemically defined media / L. Callahan, R. Ryder, S. Richardson // *Infect.Immun.* - 1971.- V.4, № 5.- P.611-618.
386. Callahan, L. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence. III. Nutritional requirements for toxin production and the effects of pH on toxin elaboration in chemically defined media / L. Callahan, S. Richardson // *Infect.Immun.* - 1973.- V.7, № 4.- P.567-572.
387. Chakrabarti, S.R. Porins of *Vibrio*: purification and characterization of OmpU / S.R. Chakrabarti, K. Chaudhuri, K. Sen, J. Das // *J.Bacteriol.*- 1996.- Vol.178. - № 2. - P.529 - 530.
388. Chen, T.H. Scanning electron microscopic study of virulent *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* type 1 / T.N. Chen, S.S. Elberg // *Infect. Immun.* - 1977. - Vol. 15.- P. 972 - 977.
389. Cheng K. Comparative study of traditional flagellum serotyping and liquid chromatography – tandem mass spectrometry – based flagellum typing with clinical *Escherichia coli* isolates / K. Cheng, A. Sloan, L. Peterson et al. // *J. Clin. Microbiol.* June 2014. - Vol.52.- No. 6.- P.2275 - 2278.
390. Chromy, B.A. Proteomic characterization of *Yersinia pestis* virulence / B.A. Chromy, M.W. Choi, G.A. Murphy et al. // *J. Bacteriol.*- 2005.- Vol.187.- № 23. - P. 8172 – 8180.
391. Clerc, M. / M. Clerc, M. Duchassin, B. Agoh et. al. // *J.Bacteriol.*, 1968.- V.96.- P.203.
392. Clement, T. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to valine and ammonium pulses during four - stage continuous wine fermentation /

T. Clement, J.R. Perez. et al. // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2013.- Vol.79.- № 8.- P. 2749 - 2758.

393. Connell, T.D. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae* / T.D. Connell, D.J. Metzger, J. Lynch, J.P. Folster. // *J. Bacteriol.*- 1998.- Vol.180.- № 21.- P. 5591- 5600.

394. Craig, J.P. Preparation of the vascular permeability factor of *V.cholerae* / J.P. Crag // *J.Bacteriol.*-1966.- V.92, № 3.- P.793-795.

395. Crépin, L. Nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases / L. Crépin, T. Nidelet, J. Sanchez et al. // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2012.- Vol.78.- № 22.- P.8102 - 8111.

396. Da Silva, N.A. Sriknshnan S. Introduction and expressia of genes for metabolic engineering application in *Saccharomyces cerevisiae* / N.A. Da Silva // *FEMS Yeast Res.*- 2012 March.- Vol.12(2).- P.197 - 214.

397. De, S.N. Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of *V.cholerae* / S.N. De // *Nature.*- 1959.-V.183, № 4674.- P.73-74.

398. Dennis, D.T. Plague manual : epidemiology, distribution, surveillance and control / D.T. Dennis, K.L. Gage, N. Gratz et al. - Geneva: WHO, 1999.

399. Davis, G.H.G. / G.N.G. Davis, R.W.A. Park // *J.Gen. Microbiol.*, 1962.- V.27.- P.101.

400. Difco&BBL Difco & BBL Manual of Microbiological Media. Second Edition. / M.J.Zimbrow, D.A.Power, S.M.Miller, C.I.Wilson, J.A.Johnson (ed.).- Sparks, Maryand, 2009. -700p.

401. Di Rita, V.J. Coordinate expression of virulence genes by Tox R in *Vibrio cholera* / V.J. Di Rita // *Mol. Microbiol.*- 1992.- Vol. 6. - № 4.- P.451-458.

402. Douzi, B.F. On the path to uncover the bacterial type II secretion system / B.F. Douzi, A. Filloux, R. von Choux // *Phil. Trans. R. Soc.*- 2012.- Vol.367.- №159.- P.1059 - 1072.

403. Dueñas-Sánchez, R. Transcriptional regulation of fermentative and respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* industrial baker's strains / R. Dueñas-Sánchez, G. Guhérrez, A.V. Rincón et al. // *FEMS Yeast Res.*- 2012 March.- Vol.12(6).- P.625 - 636.
404. Edward, J.E.Jr. Recent innovative studies with *Saccharomyces* / J.E.Jr. Edward // *J. Med. Microbiol.* - 2012 July - Vol. 61.- №7.- P. 895 - 903.
405. Englesberg, E. Physiological basis for rhamnose utilization by mutant of *Pasteurella pestis*. I. Experiments with resting cells: the isolation of lactic aldehyde / E. Englesberg // *J. Bacteriol.* -1957. - Vol. 74. - №1.- P. 8-11.
406. Falcow, S. / S. Falcow // *Am. J. Clin. Pathol.*, 1958.-V.21.-P.192.
407. Faruque, S.M. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholera* / S.M. Faruque, M.J. Albert, J.J. Mekalanos // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 1998.- Vol.62.- P. 1301 - 1314.
408. Faruque, S. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area / S. Faruque, N. Choudhury, M. Kamruzzaman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,- 2004- Vol.101.- №7.- P.2123-2128.
409. Felek, S. Contributions of chaperone/user systems to cell binding biofilm formation and *Yersinia pestis* virulence / S. Felek, J.J. Jeong, R.L. Metal // *Microbiology.*- 2011.- Vol. 157 (pt3).- P. 805 - 818.
410. Felsenfeld, O. Review of recent trends in research and control of cholera/ Ed. by O. Felsenfeld.- Geneva: WHO, 1965.- 73p.
411. Finkelstein, R.A. Nutrient requirements of *Vibrio cholerae* / R.A. Finkelstein, C.E. Lankford // *Bact. Proc.* - 1955.- Vol.60.- P.49.
412. Finkelstein, R.A. Crystalline cholera toxin and toxoid / R.A. Finkelstein, J.J. Lospalluto // *Science.*-1972. – V.175, № 4021.- P.529-530.
413. Freter, R. An evaluation of intestinal fluid in the pathogenesis of cholera / R. Freter, H. Smith, F. Sweeney // *J. Infect. Dis.* - 1961.- Vol. 10.- № 1.- P.35 - 42.

414. Fuller, K.J. The contribution of accessory toxins of *Vibrio cholera* O1 El Tor to the proinflammatory response in a murine pulmonary cholera model / K.J. Fuller, J.C. Boucher, M.A. Hanes et al. // *J. Exp. Med.*- 2002.- Vol.195.- № 11.- P.1455- 1462.
415. Garza, D.R. Genome-wide study of the defective sucrose fermenter strain of *Vibrio cholerae* from Latin American cholera epidemic / D.R. Garza, C.C. Thompson, E.C. Loureiro // *PLoS ONE*.- 2012.- Vol.7.- № 5.- P. e 37283.
416. Gèlinas, P. Inventions on Baker's strains and special ingredients / P. Gèlinas // *Yeast*.- 2009 June. - Vol.1. - No.2. - P.104-132.
417. Givry, S. Optimization of culture medium and growth conditions for production of L-arabinose isomerase and D-xilose isomerase of *Lactobacillus bifermantas* / S. Givry, F. Duchiro // *Микробиология*.- 2008.- Т.77.- № 3.- P.324 - 331.
418. Guthke, R. Systems biology of microbial infection / R. Guthke, J. Linde, F. Mech, T. Fisse // *Front Microbial*.- 2012.- № 3 - P.328.
419. Han, Y. Comparative transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in response to hyperosmotic and high-salinity stress / Y. Han, D. Zhou, X. Pang et al. // *Research in Microbiol*.- 2005.- Vol.156.- P. 403-415.
420. Handbook of Microbiological Methods. Forth Edition // Ronald M. Atlas CRC Press, 2010.
421. Hanscho, M. Nutritional requirements of the BY of *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications / M. Hanscho, D.E. Ruckebauer, N. Chauhan et al. // *FEMS Yeast Res*.- 2012 Sept.- Vol. 12(7).- P. 796 - 808.
422. Heidelberg, J.F. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholera* / J.F. Heidelberg, J.A. Eisen, W.C. Nelson et al. // *Nature*. - 2000. -Vol. 406. - P. 477- 483.
423. Heiden, M.G. Growth factors can influence cell growth and survival through effects on glucose metabolism / M.G. Heiden, D.R. Plas, Heiden . Rathmell et al. // *Mol. Cell. Biol*. - 2001. - Vol. 21 (17). - P.5899 - 5912.

424. Herz, K. Role of NhaA, NhaB, and NhaD Na⁺/H⁺ antiporters in survival of *Vibrio cholerae* in saline environment / K. Herz, S. Vimont, E. Padan et al. // *J. Bacteriol.* - 2003. - Vol.185. - № 4.- P.1236-1244.

425. Higuchi, K. Studies on the nutrition and physiology of *Past. pestis*. I. A casein hydrolyzate medium for the growth of *Pasterella pestis* / K. Higuchi, C.R. Carlin // *J. Bacteriol.*- 1957.- Vol.73.- P.122 -129.

426. Hillier, S. Glyoxalate bypass enzymes in *Yersinia* species and multiple forms of isocitrate lyase in *Yersinia pestis* / S. Hillier, W.L. Charnetzky // *J. Bacteriol.*- 1982.- Vol. 145.- P. 452 - 458.

427. Hommais, F. Effect of vibrio mild pH on the functioning of bacterial membranes of *Vibrio cholera* / F. Hommais, C. Laurent-Winter, V. Labas et al. // *Proteomics.*- 2002.- Vol.2.- № 5.- P. 571 -579.

428. Houot, L. A novel role for enzyme 1 of the *Vibrio cholerae* phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in regulation of growth in a biofilm / L. Houot, P. Watnick // *J. Bacteriol.*- 2008. - Vol.190. - № 1.- P. 311-320.

429. Huang, X.-Z. The pH6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen / X.-Z. Huang, L.E. Linlder // *Infect. Immun.*- 2004.- Vol.72.- P. 7212 - 7219.

430. Hugh R., Leifson E. – *J.Bacteriol.*, 1953.- V.66.- P.24.

431. Iha, J.K. Chromosome dynamics in multichromosome bacteria / J.K. Iha, J.H. Back, T. Venkota Canova, J.D.K. Chattora // *Biochim. Biophys. Acta.*- 2012.- Vol. 1819.- № 7.- P. 926 - 929.

432. Inamdar, A.N. / A.N. Inamdar, K. Ganapathi / *Ind. J. Exp. Biol.*, 1963a.- V.1.- P.123.

433. Ishikawa, T. Pathoadaptative conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* O1 strains / T. Ishikawa, D. Sabharwal, J. Brons et al. // *Infect. Immun.*- 2012.- Vol. 80.- № 2.- P. 575 - 584.

434. Iwanaga, M. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor / M. Iwanaga, K. Yamamoto // *J. Clin. Microbiol.*- 1985.- Vol.22.- №3.- P.405 - 408.
435. Jeffreys, H. *Methods of Mathematical Physics*, 3rd ed. / H. Jeffreys and B.S. Jeffreys // Cambridge University Press, 1988. - P.305-306.
436. Jermyn, W.S. Molecular evolution of *Vibrio* pathogenicity island -2 (VPI): mosaic structure among *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* natural isolates / W.S. Jermyn, E.F. Boyd // *Microbiology.*- 2005.- Vol.151.- P.311-322.
437. Joellson, A. Genomic and phenotypic diversity of quorum-sensing systems in clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* / A. Joellson, Zhi Lui, Jun Shu // *Infect. Immun.* - 2006. - Vol.74. - P.1141- 1147.
438. Jubair, M. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient - poor environments is associated with a novel «persister» phenotype / M. Jubair, J.G. Morris, A. Ali // *PLoS One.*- 2012.- Vol.7.- № 9.- P. e45187.
439. Jude, B.A. Levels of the secreted *Vibrio cholerae* attachment factor GbpA are modulated by quorum-sensing-induced proteolysis / B.A. Jude, R.M. Martinez, K. Skorupski, R.K. Taylor // *J. Bacteriol.*- 2009. - Vol.191. - № 22.- P. 6911-6917.
440. Kalidas, P. Competitive growth advantage of nontoxigenic mutants in the stationary phase in archival cultures of pathogenic *Vibrio cholera* / P. Kalidas, A. Ghosh, N. Sengupta, R. Chowdhury // *Infect. Immun.*- 2004. - Vol. 72. - P. 5478 - 5482.
441. Karim, A.S. Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications / A.S. Karim, K.A. Cuzzan, H.S. Alper // *FEMS Yeast Res.*- 2013.Feb.- Vol. 13(1).- P. 107 - 116.
442. Keymer, D.P. Biogeographic patterns in genomic diversity among a large collection of *Vibrio cholerae* isolates / D.P. Keymer, L.H. Lam, A.B. Boehm // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2009.- Vol.75.- № 6.- P.1658-1666.

443. Khan, S. Type VI secretion system regulation as a consequence of evolutionary pressure / S. Khan, A. Kumar, D. Meparambu et al. // *J. Medical Microbiol.*- 2013.- Vol. 62.- № 6.- P.917 - 921.

444. Kjerek, K. Environmental determinants of *Vibrio cholera* biofilms development / K. Kjerek, P.J. Watnick // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2003.- Vol. 69.- P. 5078 - 5088.

445. Klevytska, A.M. Identification and characterization of variable-number tandem repeats in the *Yersinia pestis* genome / A.M. Klevytska, L.B. Price, J.M. Schupp et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2001.- Vol.39.- P.3179 - 3185.

446. Kligler, I.J. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group / I.J. Kligler // *Am. J Public Health*, 1917.- V.7.- P.1042-1044.

447. Kligler, I.J. Modifications of culture media used in the isolation and differentiation of typhoid, dysentery and allied bacilli / I.J. Kligler // *J. exp. Med.*, 1918. - V.28.- P. 319-322.

448. Koch, A.L. Microbiol physiology and ecology of slow growth / A.L. Koch // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* - 1997.-Vol. 61. - №3.- P. 305 - 318.

449. Koch, W. / W. Koch, D. Kaplan // *Trop. Dis. Bull.*- 1953.- V.50.- P.510.

450. Kolodziejek, A.M. Physiological levels of glucose induce membrane vesicle secretion and affect the lipid and protein composition of *Yersinia pestis* cell surfaces / A.M. Kolodziejek, A.B. Caplan, G.A. Bohach et al. // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2013.- Vol. 79.- № 14.- P. 4509 - 4514.

451. Krishna Murti, C.R. / C.R. Krishna Murti, D. Shrivastava // *J.Sci Industr.*. 1956.- (B-C).- V.15.- P.125.

452. Kusama, Hideo Production of biologically active substances by two strains of *Vibrio cholera* / Hideo Kusama, J.P. Craig // *Infect.Immun.*- 1970.- V.1, № 1.- P.80-87.

453. Lee, J. An alternative polyamine biosynthetic pathway is widespread in bacteria and essential for biofilm formation in *Vibrio cholerae* / J. Lee, V.

Sperandio, D.E. Frantz et al. // J. Biol. Chem.- 2009.- Vol. 284.- № 15.- P.9899-9907.

454. Li, N. Unique iron coordination in iron-chelating molecule vibriobactin helps *Vibrio cholerae* evade mammalian siderocalin – mediated immune response / N. Li, C. Zhang, B. Li et al. // J. Biol. Chem.- 2012.- Vol. 287.- №12.- P.8912-8919.

455. Li, Yi. Engineering of TEV protease variants by yeast ER sequestration screening (YESS) of combinatorial libraries / Yi. Li, M.C. Gerbard, Li Qing et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2013 April 30.- Vol. 210 (18).- P. 7229-7234.

456. Lomov, Y. Feature of an exchange of a glucose at the nonculturable forms of *Vibrio cholera* / Y. Lomov, A. Sokolenko, V. Kagramanov, L. Aseeva // Abstracts of Ninth International Congress for Cultural Collections.- Brisbane, Australia.- July, 23-28.-2000.- P.13 - 16.

457. Long Hang. Use of in vivo-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholera* / Long Hang, John Manohar, Muhammad Asaduzzaman et al. // Proc, Nat. Acad. Sci. USA.- 2003.- Vol.100.- P.8508 - 8513.

458. Longo, V.D. Replicative and chronological aging in *Saccharomyces cerevisiae* / G.S Shadel, M. Kaeberlein, B. Kennedy // Cell Metabolism.- 2012.- Vol.16.- No.1. - P.18 - 31.

459. Lorian, V. In vitro simulation of in vitro conditions: Physical state of the culture medium / V. Lorian // J. Clin. Microbiol.- 1989.- Vol. 27.- № 11.- P.2403 - 2406.

460. Marrero, K. Anaerobic growth promotes synthesis of colonization factors encoded of the *Vibrio* pathogenicity island in *Vibrio cholerae* ElTor / K. Marrero, A. Sanchez, A. Rodriguez-Ulloa et al. // Res. Microbiol.- 2009.- Vol.160.- № 1.- P.48-56.

461. Massad, G. New selective and differential media for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus* / G. Massad, J. Oliver // Appl. Environ. Microbiol.- 1987.- Vol. 53.- № 9.- P. 2262 – 2264.

462. Merrick, M.J. Nitrogen control in bacteria / M.J. Merrick, R.A. Edwards // *Microbiol. Rev.* - 1995.- Vol. 59.- № 4.- P. 604 - 622.
463. Mey, A.R. Molecular pathogenesis: effects of amino acid supplementation on porin expression and tox R levels in *Vibrio cholerae* / A.R. Mey, S.A. Craig, S.M. Payne // *Infect. Immun.*- 2012. - Vol. 80.- № 2.- P. 518 - 528.
464. Microbiology manual: LPRO UBA-V. - Product management microbial.- Merk, oct.1996.- Seit1.- V.2.- P.321.
465. Mishra, A. Mutation in tcp R gene (Vc 0832) of *Vibrio cholerae* O1 causes loss of tolerance to high osmolarity and affects colonization and virulence in infant mice / A. Mishra, R.Srivastava, C. Pruzzo, B.S. Srivastava // *J. Med. Microbiol.*- 2003.- Vol. 52.- P. 933- 939.
466. Mishra, A. Viability, kinetics, induction resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in fresh water microsoms / A. Mishra. N. Taneja, M. Sharma // *J. Appl. Microbiol.*- 2012.- Vol. 112.- № 5. - P.945 - 953.
467. Moeller V. / V. Moeller // *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 1955.-V.36.- P.158
468. Mohamed, A.A. Molecular epidemiology of geographically diversified *Vibrio cholerae*, Kenia, January 2009 – May 2010 / A.A. Mohamed, J. Oundo, S.M. Kariuni et al. // *Emerg. Infect. Dis.* - 2012.- Vol. 18.- № 6. - P.429 - 431.
469. Motin, V.L. Genetic variability of *Yersinia pestis* isolates as predicted by PCR-based IS100 genotyping and analysis of structural genes encoding glycerol-3- phosphate dehydrogenase (glpD) / V.L. Motin, A.M. Georgescu, J.M. Elliott et al. // *J. Bacteriol.*- 2002,- Vol.184. - P. 1019-1027.
470. Moulder, J.W. Comparative biology of intracellular parasitism J.W. Moulder // *Microbiol. Rev.* - 1985. - Vol. 49.- № 3. - P.- 298 - 337.
471. Mudra, K.B. The *Vibrio cholerae* Pst2 phosphate transport system is upregulated in biofilms and contributes to biofilm-induced hyperinfectivity / K.B. Mudra, R. Tamayo // *Infect. Immun.* - 2012.- Vol. 80.- № 5. - P. - 1794 - 1802.

472. Mueller, R.S. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae* / R.S. Mueller, S. Beyham, S.G. Saini et al. // *J. Bacteriol.*- 2009.- Vol.191.- № 11.- P.3504 - 3516.

473. Myers-Morales, T. A surface-focused biotinylation procedure identifies the *Yersinia pestis* catalase KatY as a membrane-associated but non-surface-located protein / T. Myers-Morales, C. Cowan, M. Gray et al. // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2007. - Vol.73. - № 3.- P.5750-5759.

474. Nahar, S. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission / S. Nahar, M.Saltana, M.N. Naser et al. // *Front Microbiol.* - 2012. - Vol.2. - P. 260.

475. Nishiyama Soichiro. Mlp 24 (Mcp X) of *Vibrio cholerae* as a chemoreceptor for multiple amino acids / Nishiyama Soichiro, D. Suzuki, Y. Itch et al. // *Infect. Immun.*- 2012.- Vol. 80.- № 9. - P. - 3170 - 3178.

476. Nyström, T. Role of protein synthesis in the cell division and starvation induced resistance to autolysis of a marinic *Vibrio* during the initial phase of starvation / T. Nyström and S. Kjelleberg // *J. Gen. Microbiol.*- 1989.- Vol. 135.- Part 6.- P.1599 - 1606.

477. Ogasawara, K. / K. Ogasawara, Y. Kariya-Nagoya // *J.Med.Sci.*, 1954.- V.47.- P.91.

478. Orozco, H. Oxidative stress tolerance, adenylate cyclase, and autophagy are key in the chronological during winemaking / H. Orozco, E. Matallona, A. Aranda // *Appl. Environ. Microbiol.* - 2012. - Vol.78. - №8. - P. 2748 - 2757.

479. Oyston, P.C. The many and varied niches occupied by *Yersinia pestis* as an arthropod-vectored zoonotic pathogen / P.S. Oyston, V.L. Isherwood // *Antonie van Leeuwenhoek J.*- 2005.- Vol. 87. - P.171 - 177.

480. Pal, R.R. Functional characterization of the stringent regulacity gene dKsA of *Vibrio cholerae* and its role in modulation of virulence phenotypes / R.R. Pal, S. Bag, S. Dasgupta et al. // *J. Bacteriol.*- 2012.- Vol.194.- № 20.- P.5638 - 5648.

481. Patra, T. Enter-Doudoroff pathway is obligatory for gluconate utilization and contributes towards the pathogenicity of *Vibrio cholerae* / T. Patra, H. Koley, T. Ramamurty et al. // *J. Bacteriol.*- 2012.- Vol.194.- № 13.- P.3377 - 3385.
482. Pollitzer, R. Cholera studies. *Bacteriology* / R. Pollitzer // *Bull.WHO.* – Geneva, 1955.- № 12.- P.777 - 875.
483. Poncet, S. Correlations between carbon metabolism and virulence in bacteria / S. Poncet, E. Milohanic, A. Maze et al. // *Contrib. Microbiol.*- 2009.- Vol.16.- P.88 - 102.
484. Pruzzo, C. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin / C. Pruzzo, L. Vezzulli, R.R. Colwell // *Environ. Microbiol.*- 2008.- Vol. 10.- P. 1400 - 1410.
485. Pukatzki, S. Identification of conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using *Dictyostelium* host model system / S. Pukatzki, A.T. Ma, D. Sturtevant et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*- 2006.- Vol.103.- № 5.- P.1528-1533.
486. Qu Mey. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O139 in China: polymorphism of ribotypes CTX elements / Qu Mey, Jing Xu, Yanpeng Ding et al. // *J. Clin. Microbiol.*- 2003.- Vol. 41.- P. 2306 - 2310.
487. Rakin, A. Hunter for iron: the alternative siderophore iron scavenging systems in highly virulent *Yersinia* / A. Rakin, L. Schneider, O. Podladchikova // *Front Cell Infect. Microbiol.*- 2012.- 2. - P.160.
488. Reidel, J. *Vibrio cholerae* and cholera: out of water and into the host / J. Reidel, K.E. Klose // *FEMS Microbiol. Rev.* - 2002. - Vol.26. - № 2.- P.125 - 139.
489. Richardson, S.N. Factors influencing in vitro skin permeability factor production by *Vibrio cholera* / S.N. Richardson // *J.Bacteriol.*- 1969.- V.100, № 1.- P.27-34.
490. Richardson, S.N. Factors influencing toxigenicity in *Vibrio cholera* / S.N. Richardson // *Symp.on cholera.*- Tokyo, 1971.- P.34-43.

491. Roehenmacher, M. Studies on the nutrition and physiology of *Pasterella pestis*. 1. A chemically define culture medium for *Pasterella pestis* / M. Roehenmacher, H. James, S. Elberg // *J. Bacteriol.*- 1952.- Vol.63.- P.785.

492. Rosec, J.P. The international standart ISO/TS 21872-1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood: ITS improvement by use of a chromogenic medium and PCR / J.P. Rosec, K. Causse, B. Cruz et al. // *Int. J. Food Microbiol.*- 2012.- vol.157.- № 2.- P. 1390 - 1397.

493. Russel, F.F. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium / F.F. Russel // *J. Med. Res.*, 1911. - V. 25. - P.217.

494. Safa, A. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 / A. Safa, G.B. Nair, R.Y.C. Kong // *Trends Microbiol.*- 2010.- Vol.18.- № 1.- P.46 - 54.

495. Saint-Dic, D. Excess SeqA leads to replication arrest and a cell division defect in *Vibrio cholerae* / D. Saint-Dic, J. Rehrl, B. Frushour, L.S. Kahng // *J. Bacteriol.* - 2008. - Vol.190. - № 17.- P.5870 - 5878.

496. Sarma, Z. Evaluation of use of a new chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens / Z. Sarma, M. Heifetz, J. Talmor et al. // *Clin.Microbiol.*- 1998. - Vol.36. - № 4.- P.990-994.

497. Seal, S.C. Casein hydrolisate agar a new solid medium for the growth of *Pasterella pestis* and allied organisms / S.C. Seal, S.R. Mukerji // *Ann. Biochem. a. Exper. Med.* - Calcutta, 1950.- Vol.10.- №. 3/4. - P.85 - 94.

498. Sentinel laboratory guidelines for suspected agents of bioterrorism *Yersinia pestis* // American Society for Microbiology, 2005. - 19 p.// Internet.- <http://www.asm.org/ASM/files/LeftMarginHeaderList/DownloadFileName/pdf>

499. Shi, J. Evidence supporting predicted metabolic pathways for *Vibrio cholera*: gene expression data and clinical tests / J. Shi, P.R. Romero, G.K. Schoolnik et al. // *Nucleic Acids Res.* - 2006.- Vol. 34.- № 8.- P.2438 - 2444.

500. Shikuma, N.J. Identification and characterization of OsrR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholera* / N.J. Shikuma, F.H. Yildiz // *J.Bacteriol.*- 2009.- Vol.191.- № 13.- P.4082 - 4096.

501. Sikora, A.E. Cell envelope perturbation induces oxidative stress and changes in iron homeostasis in *Vibrio cholera* / A.E. Sikora, S. Beyhan, F.H. Yildiz et al. // *J.Bacteriol.*- 2009. - Vol.191. - №17. - P.5398 - 5408.

502. Silva, A.J. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera / A.J. Silva, G.S. Leich, A. Camilli a. J.A. Benitez // *Infect. Immun.* - 2006. - Vol.74.- P. 2074 - 2079.

503. Sokhey, S.S. Hydrolisate of casein for preparation of plague and cholera vaccines / S.S. Sokhey, M.K. Harbu, K.F. Bharucha // *Bull. WHO.* - 1950. - №3. - P.25 - 31.

504. Sörensen, S.P.L. Enzymstudien. Ueber die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionen-Konzentration bei enzymatischen Prozessen / S.P.L. Sörensen // *Biochem.Z.*, 1909- V.21.- P.202.

505. Sportmann, A.M. Physiology of microbes in biofilms / A.M. Sportmann // *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.* - 2008.- Vol. 322. - P.17- 36.

506., N.L. Preparation and evaluation of two microbiological media from shrimp heads and hulls / N.L. Stephens, W.A. Bough, L.R. Beuchat, E.K. Heaton // *Appl. Environ. Microbiol.* - 1976. - Vol.31. - № 1.- P.1- 6.

507. Surgalla, M.J. Practical applications of new laboratory methods for plaque investigations / M.J. Surgalla, E.D. Befsley, J.M. Albizo // *Bull.WHO.* - 1970. - № 42. - P. 993-1000.

508. Tammann, G. Ueber die Wirkung der Fermente / G. Tammann // *Z. physiol. chem.*, 1889.- V.3.- P.25.

509. Tamrakar, A.K. Surveillance methodology for *Vibrio cholerae* in environmental samples / A.K. Goal, D.U. Kamboj, L. Singh // *Int. J. Environ. Helth. Res.* - 2006. - Vol. 16. - № 4.- P.305 - 312.

510. Tomisawa, M. / M. Tomisawa // *Jap.J.Bacteriol.*, 1970.- V.25.- P.

511. The Oxoid manual. Third edition revised. - Kent, 1976. - P.209 - 217.

512. Vezzulli, L. The *Vibrio* sea consortium. Benthic ecology of *Vibrio* spp. and pathogenic *Vibrio* species in a coastal Mediterranean environment (La Spezia Gulf, Italy) / L. Vezzulli, E. Pezzatti, V. Moreno et al. // *Microb. Ecol.*-2009.- Vol.58.- № 4.- P. 808 - 818.

513. Votruba, J. Application of modified Rosenbrock's method for optimization of nutrient media used in microorganism culturing / J. Votruba, P. Pilat and A. Prokop // *Biotechnology and Bioengineering.* - 1975. - Vol.17. - № 12. - P. 1833-1837.

514. Vukašinić. Utilization of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) for the production of yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid protein and carbohydrate recovery / Vukašinić, Milić, Rakin and Šiler-Márinković // *J.serb. chem. soc.*, 2007. - № 72(5). - P. 451 - 457 // Internet. - <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0352-5139/2007>

515. Wang, R. Proteins involved in difference of sorbitol fermentation rates of the toxigenic *Vibrio cholerae* ElTor strains revealed by comparative proteome analysis / R. Wang, H. Zhang, H. Qiu et al. // *BMC Microbiol.*- 2009.-Vol. 9. - P.135.

516. *Wkly Epidem. Rec.* - 2010. - Vol.85. - № 6. - P.40 - 48.

517. *Wkly Epidem. Rec.* -2014. - Vol.89. - № 31.- P.345 - 355.

518. Wloch-Salomon, D.M. Types of cell death and methods of their detection in yeast *Saccharomyces cerevisiae* / D.M. Wloch-Salomon and A.E. Bem // *J.Appl. Microbiol.*- 2013, Feb. - Vol.114.- Issue 2. - P.287 - 298.

519. Wong, E. The *Vibrio cholerae* colonization factor Ghp A possesses a modular structure that governs binding to different host surfaces / E. Wong, G. Vaie-Irolstad, A. Ghosh et al. // *PLoS Pathog.*- 2012.- Vol.8. - № 1. - P. e 1002373.

520. Wordend, Z. Trophic regulation of *Vibrio cholera* in coastal marine water / Z. Wordend, M. Seidel, S. Smriga et al. // *Environ. Microbiol.*- 2006. - Vol. 8. - № 1. - P. 21 - 29.

521. Xu, Q. Determination of the transcriptome of *Vibrio cholerae* during intrainestinal growth and midexponential phase in vitro / Q. Xu, M. Dziejman,

J.J. Mekalanos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 2003.- Vol.100.- № 3.- P.1285 - 1291.

522. Yildiz, F.H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required of rugose colony type exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation / F.H. Yildiz a. G.K. Schoolnik // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 1999. - Vol. 96. - P.4028 - 4033.

523. P. Mannitol and mannitol – specific enzyme IIB subunit activate *Vibrio cholerae* biofilm formation / P. Ymeli-Leki, L. Houot, P.J. Watnick // Appl. Environ. Microbiol.- 2013.- Vol. 79.- № 15. - P. 4675 - 4683.

524. Yujun Cui. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis* / Yujun Cui, Chang Yu, Yanfeng Yan et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2013. - Vol. 110. - № 2. - P. 577 - 582.