

УДК 57. 083. 134: 616. 98

Катунина Л.С., Таран Т.В., Старцева О.А.

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

Тимченко Л.Д., Пенькова Н.И.

Ставропольский государственный университет

Арешидзе Д.А.

Московский государственный областной университет

**РАЗРАБОТКА НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕГИОНЕЛЛ НА ОСНОВЕ КИСЛОТНОГО
ГИДРОЛИЗАТА МОРКОВИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
НЕТРАДИЦИОННЫХ СТИМУЛИРУЮЩИХ ДОБАВОК**

L. Katunina, T. Taran, O. Startseva

Stavropol Research Anti-Plague Institute

L. Timchenko, N. Pen'cova

Stavropol State University

D. Areshidze

Moscow State Regional University

**WORKING OUT OF NEW NUTRIENT MEDIUMS FOR CULTIVATING
LEGIONELLA ON THE BASIS OF CARROT ACID HYDROLIZATION
WITH THE USE OF NONCONVENTIONAL STIMULATING ADDITIVES**

Аннотация. Предложена рецептура новой питательной среды для культивирования легионелл на основе кислотного гидролизата моркови со стимулирующими компонентами из миндаля, арахиса и креветок. Проведен аналитический обзор литературы по химическому составу используемого сырья для стимуляторов роста и обнаружены факторы роста легионелл. Подробно описана технология приготовления среды. Полученные результаты свидетельствуют о том, что питательные среды со стимулирующими компонентами из миндаля и арахиса способствуют высокому выходу бактериальной массы, незначительно уступают контролю, не изменяют классических характеристик микроорганизмов и могут явиться экономически выгодной моделью в диагностических и производственных целях.

Ключевые слова: питательная среда, легионеллы, стимулирующая добавка, ферментативный гидролизат из миндаля, ферментативный гидролизат арахиса, ферментативный гидролизат креветок.

Abstract. A new nutrient medium for cultivating Legionella has been suggested on the basis of carrot acid hydrolization with stimulating components from almonds, peanut and shrimps. A review of the sources on chemical compounds of the used raw materials for growth factors has been made and growth factors for Legionella have been found out. The technology of preparing the environment has been described in detail. The received results testify that nutrient mediums with stimulating components from almonds and peanuts promote a high output of bacterial weight, slightly concede to the control, do not change classical characteristics of microorganisms and can be an economical model for diagnostic and industrial purposes.

Key words: a nutrient medium, Legionella, the stimulating additive, fermentum hydrolization from almonds, fermentum hydrolization from peanuts, fermentum hydrolization from shrimps.

Легионеллез (болезнь легионеров) – острое системное инфекционное заболевание, инициированное микроорганизмами рода *Legionella*, преимущественно видом *L. pneumophila*, классически проявляющее себя пневмонией, а также более легкой респираторной инфекцией (лихорадка *Pontiac*). Уровень заболеваемости легионеллезом в мире неуклонно растет. Его клиническая диагностика практически невозможна из-за полиморфизма проявлений, что характерно для всех атипичных пневмоний. Это предопределяет актуальность совершенствования лабораторной диагностики указанной инфекции.

Легионеллез является типичным примером техногенных инфекций, обусловленных активным использованием в промышленности и быту циркулирующих замкнутых водных систем, источников бактериального аэрозоля [1, 428-430]. Это обстоятельство предопределяет актуальность контроля легионелл в этих системах.

Поскольку клиническая диагностика легионеллеза сложна, решающим при постановке диагноза являются данные микробиологических и серологических исследований. Применяют гематодиагностику (ПЦР), а также выявление возбудителя в мокроте, слизи, биоптатах. Для посева материала обычно используют среду Мюллера-Хинтона с добавлением солей железа и L-цистеина [2, 392-401].

К настоящему времени разработано значительное количество питательных сред для легионелл: угольно-дрожжевой агар, GVPС, GVPN, ВМРА, ВСУЕа. Все указанные среды производятся зарубежными фирмами: Oxoid (Великобритания), Becton Dickinson (США), BioMerieux (Франция), Himedia (Индия) [6].

В РФ выпускают питательные среды для культивирования легионелл – легионелбакагар (Оболенск, ФГУН ГНЦПМиБ); среду СЭЛ (Ростов, ОАО «Медис»).

Бактериологический метод, включающий выделение чистой культуры и ее идентификацию, остается «золотым» стандартом диагностики легионеллезом. Существующие микробиологические методы диагностики легионеллезом длительны в исполнении (7-

10 суток) и обладают высокой стоимостью [8, 144-145]. Легионеллы не растут на простых питательных средах (агаре Хоттингера, кровяном агаре, агаре MacConkey и др.), что связано с потребностью возбудителя в L-цистеине и в растворимом пирофосфате железа (Fe^{2+}). Для выделения возбудителя используют модификации буферного угольно-дрожжевого агара, содержащего L-цистеин, растворимый пирофосфат железа и α -кетоглутаровую кислоту (среда ВСУЕа, СЭЛ, легионелбакагар и другие). Однако чувствительность бактериологического метода остается недостаточно высокой, что предопределяет актуальность разработки новых дешевых питательных сред для культивирования легионелл и улучшение качества имеющихся питательных сред.

Целью настоящего исследования явилось конструирование плотных недорогих питательных сред для культивирования легионелл, отвечающих требованиям современной нормативной документации по контролю качества питательных сред [3].

Нами была предложена рецептура питательной среды на основе кислотного гидролизата моркови (КГМорк.). В связи с тем, что легионеллы растут при определенном наборе аминокислот, ростовых факторов, рН среды и температуре 37°C на искусственных питательных средах (угольно-дрожжевом агаре) [1, 428-430], для усиления ростовых качеств среды применили стимулирующие добавки, выбору которых уделили особое внимание.

По сообщениям ряда авторов в качестве стимулирующих компонентов целесообразно использовать гидролизаты из различных сырьевых субстанций, которые являются богатыми источниками питательных веществ в доступной для микроорганизмов форме [5, 117-118; 7, 74-77].

С учетом пищевых потребностей выращиваемого микроба провели аналитический обзор доступной литературы по химическому составу используемого сырья для гидролиза [4]. Установлено, что арахис, миндаль и креветки являются богатыми субстанциями, в составе которых обнаружены комплексы

Таблица 1

Ростовые качества питательных сред для культивирования легионелл

Название питательной среды	<i>Legionella pneumophilla</i> ATCC 33152	<i>Legionella pneumophilla</i> ATCC 33155	Подвижность	Цвет колоний
КГМорк.	25±0,1	18±0,2	сохранена	голубые с розоватым оттенком
КГМорк. + ФГМ	51±0,1	55±0,3	выражена	голубые с сероватым оттенком
КГМорк. + ФГК	нет роста	нет роста	-	-
КГМорк. + ФГА	65±0,2	67±0,1	выражена	голубые
СЭЛ	80±0,2	85±0,2	сохранена	голубые
Агар Хоттингера	нет роста	нет роста	-	-

витаминов (А, Е, С, В₆, В₁₂, биотин, ниацин, пантотеновая кислота, рибофлавин, тиамин, фолацин), аминокислот и минеральных элементов. Это свидетельствует об уникальном составе используемого сырья и позволяет рассчитывать на конечные продукты гидролиза с уникальными свойствами, а также высокими показателями качества.

В связи с вышеизложенным, в качестве стимулирующих добавок использовали ферментативные гидролизаты из миндаля (ФМ), арахиса (ФА) и креветок (ФК) в концентрации 10,0 мл/л. В состав плотной питательной среды, помимо основы и стимулирующего компонента, входили: L-цистеин, калий-фосфатный буфер на дистиллированной воде (КН₂РО₄ – 0,9 г/л, КН₂РО₄·СН₂О – 2,2 г/л), активированный уголь – 2,0 г/л и микробиологический агар – 10,0 г/л.

В работе использовались типичные по культурально-морфологическим свойствам тест-штаммы *Legionella pneumophilla* ATCC 33155 Bloomington 2, *Legionella pneumophilla* ATCC 33152 Philadelphia 1, полученные из ГИСК им. Л.А. Тарасевича.

Эффективность различных вариантов новой питательной среды (рН 6,9) с указанными стимулирующими добавками оценивали в сравнении с контрольной средой СЭЛ (рН 7,1) и агаром Хоттингера (рН 6,8). Показатель аминного азота всех питательных сред соответствовал 120 мг/%. Среды, разлитые во

флаконы, стерилизовали при 121°C в течение 20 мин. На свежие разлитые и просушенные пластинки исследуемых питательных сред засеивали взвесь легионелл в дозе 100 м.к. в 0,1 мл. Результаты учитывали на третьи, четвертые и пятые сутки путем подсчета выросших колоний, определения их цвета, а также подвижности микробных клеток в раздавленной капле (табл. 1).

По результатам исследований, приведенным в табл. 1, можно сделать вывод, что питательная среда на основе кислотного гидролизата из моркови с добавлением гидролизата из миндаля обеспечивает выход *Legionella pneumophilla* ATCC 33152 – 64%, а *Legionella pneumophilla* ATCC 33155 – 65%, с ферментативным гидролизатом из арахиса – 81% и 79%, при сравнении с количеством колоний, выросших на контрольной среде – СЭЛ (100%).

Питательная среда, приготовленная на основе кислотного гидролизата моркови без стимулирующих компонентов, способствует выходу бактериальной массы *Legionella pneumophilla* ATCC 33152 – 31%, а *Legionella pneumophilla* ATCC 33155 – 21%.

Новая питательная среда с ферментативным гидролизатом из креветок при культивировании легионелл не показала ростостимулирующего эффекта.

Агар Хоттингера использовали в качестве отрицательного контроля.

При изучении морфологических свойств микроорганизмов *Legionella pneumophilla* ATCC 33152 и *Legionella pneumophilla* ATCC 33155, выросших на всех вариантах рецептур питательной среды на основе кислотного гидролизата моркови, а также на питательной среде - СЭЛ установлено, что они идентичны на всех средах и соответствуют классическим характеристикам микроба. Так, *Legionella pneumophilla* является грамотрицательной палочковидной подвижной бактерией, размерами 3Ч0,5Ч0,7 мкм.

Таким образом, предложенные питательные среды со стимулирующими компонентами из миндаля и арахиса по количеству выросших колоний незначительно уступают контрольной среде СЭЛ, а также соответствуют требованиям контроля питательных сред для культивирования возбудителя легионеллеза по биологическим показателям [3].

Проявление культуральных, сохранность морфологических свойств, а также выраженная подвижность микробных клеток свидетельствует о полноценности двух новых питательных сред для культивирования легионелл из растительного сырья – моркови со стимулирующими компонентами – ферментативными гидролизатами из арахиса и миндаля. С учетом вышеизложенного, а также с учетом низкой стоимости основных компонентов разработанных сред, открывается перспектива их широкого использования в диагностических и производственных целях.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Борисов, Л.В. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. Изд. 4-е, доп. и перераб. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005.
2. Воробьев, А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология // А.А. Воробьев // Учебник для студентов мед. 2-е изд., испр. и доп. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2008.
3. Методические рекомендации / Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.
4. Нестерин, М.Ф. Химический состав пищевых продуктов / М.Ф. Нестерин, И.М. Скурихина. М.: «Пищевая промышленность», 1979.
5. Пенькова, Н.И. Оценка качества ферментативных гидролизатов на основе нетрадиционного сырья / Н.И. Пенькова // Университетская наука – региону: Матер. 54-й научно-практ. конф. / Сб. труд. молодых ученых. Ставрополь: Изд-во СГУ, 2009.
6. Тебезникова, Н.Д. Легионеллезная инфекция / Н.Д. Тебезникова, И.С. Тартаковский. М.: ОАО «Медицина», 2007.
7. Тимченко, Л.Д. Эффективность добавления гидролизата из каллизии душистой в питательной среде – агаре Хоттингера при культивировании лактобактерий / Л.Д. Тимченко, Н.И. Пенькова // Проблемы развития биологии и экологии на Северном Кавказе: Матер. научн. конф. «Университетская наука – региону». Ставрополь: СГУ, 2009.
8. Ярков, С.П., Третьяков С.И., Башарова Л.А. и др. Проблемы особо опасных инфекций. Саратов, 2009. Вып. 2 (100).