

## РЕГИДРАТАЦИЯ СУХИХ КУЛЬТУР ДЕРМАТОФИТОВ

Зайцева В.В.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

*Установлена зависимость жизнеспособности микроконидий дерматофитов от состава используемого растворителя. Предложены стандартные по составу растворители, позволяющие сохранить высокую жизнеспособность микроконидий дерматофитов при регидратации сухих препаратов.*

*The dependence of the viability of dermatophytes microconidia on the composition of the solvent used to offer a standard solution composition, allowing to maintain high viability of dermatophytes microconidia when rehydrated dry preparations.*

**Введение.** Одним из важнейших при производстве и применении сухих вакцин является вопрос восстановления в высушенном материале максимального количества жизнеспособных клеток, сохранившихся в культуре после процесса лиофилизации. Поэтому возникает необходимость подбора оптимальных условий регидратации, которые будут способствовать процессу восстановления жизнеспособности клеток или спор.

Наиболее чувствительны к понижению температуры биомембраны клеток. Ряд последовательных нарушений ее структуры приводит к образованию дефектных зон в мембране, изменению ее проницаемости и объема, проявлению ряда биохимических реакций, вызывающих качественные изменения фосфолипидов и белков. Однако, несмотря на сложность и глубину криповреждений, клетка способна довольно хорошо восстанавливаться за счет систем репарации и самосборки структурных компонентов в предшествующие комплексы и системы, обеспечивая их функционирование [5, 10].

Восстановление жизнедеятельности клеток на различных этапах процесса изготовления сухих биопрепаратов, в частности, при подготовке биомассы к сублимационному высушиванию, замораживанию, также при регидратации действует целый ряд других повреждающих факторов: осмотическое сжатие клеток, скорость и глубина замораживания, образование кристаллов льда, концентрирование компонентов защитной среды и продуктов лизиса поврежденных клеток в незамерзшей фазе и пребывание клеток в доэвтектической зоне температур [6].

Важное значение имеет скорость обезвоживания, состав, осмолярность и температура регидратирующего раствора [2, 7, 10].

Период восстановления лиофилизированных культур характеризуется устранением всех деструктивных изменений, реставрацией поврежденных при обезвоживании структур, отторжением и лизисом необратимо инактивированных участков, восстановлением деятельности ферментных систем.

Для быстрого восстановления всех жизненных функций клеток большое значение имеет выбор оптимальных условий, при этом решающую роль играют состав растворителя, его температура и время экспозиции перед высевом на контрольную питательную среду. При удачном выборе этих условий выход жизнеспособных микроорганизмов в отдельных случаях увеличивается в десятки раз [5].

Современный подход к повышению эффективности применения сухих живых вакцин основан на разработке и использовании специальных растворителей, обеспечивающих лучшее восстановление микроорганизмов из высушенного состояния в процессе регидратации.

Поскольку в разведенных суспензиях клетки легко подвергаются вредным воздействиям со стороны неблагоприятной для них среды, состав растворителей необходимо предварительно подбирать и оптимизировать. В качестве растворителя, как правило, нельзя использовать дистиллированную или водопроводную воду, так как она гипотонична по отношению ко всем бактериальным клеткам, за исключением покоящихся спор, и не обладает буферными свойствами. Также не подходит для разведения физиологический раствор и фосфатный буфер, поскольку они обладают малой буферной емкостью и изотоничны только по отношению к клеткам млекопитающих. При разведении такими растворами жизнеспособность может упасть на 50% и более [3].

Мировая практика производства сухих вакцин свидетельствует, что подавляющее большинство их выпускается зарубежными фирмами в комплекте с соответствующими растворителями, состав которых не расшифровывается.

Согласно имеющимся литературным данным, в исследованиях по испытанию в качестве растворителя для сухих бактериальных вакцин используют как простые, так и сложные многокомпонентные системы, включающие молоко и сыворотку крови крупного рогатого скота, глицерин и пептон [8], физиологический раствор и мясопептонный бульон. Однако указанные растворители имеют целый ряд недостатков: использование для их изготовления дорогостоящего пищевого сырья, не стандартного по составу, из дефицитных компонентов; молоко и сыворотка крови обладают антигенностью и могут вызывать неспецифические иммунные реакции. Поэтому они не нашли своего применения в производстве.

Ярцев М.Я. (1990) установил низкую жизнеспособность микроорганизмов в сухих вакцинах против пастереллеза птиц и рожи свиней при регидратации физиологическим раствором, что послужило основанием испытания растворителя, представляющего 0,5%-ный раствор пептона на сложном калий-фосфатном буферном растворе с рН 7,2-7,5 [11].

В настоящее время в Республике Беларусь для регидратации сухих вакцин против дерматофитозов не выпускаются специальные растворители, а используется стерильный физиологический раствор.

Целью настоящих исследований являлось изучение и подбор среды для регидратации сухих культур дерматофитов, обеспечивающих максимальный выход жизнеспособных микроконидий гриба в процессе реактивации.

**Материалы и методы исследований.** Исследования проводили в ГП «Витебская биофабрика» и РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

В работе использовали культуры производственных штаммов гриба *Trichophyton verrucosum* ТФ-130, *Trichophyton verrucosum* № 11183, *Trichophyton mentagrophytes*.

Для изготовления питательной среды и выращивания грибов использовали сусло. Солод для получения сусла готовили из зерна, обработанного препаратами Флоравит, Фузарин, Бионорм В и водопроводной водой.

Эффект от использования стимуляторов состоит в повышении выхода целевого продукта, экстрактивности и сокращении солодоращения.

Культуру грибов выращивали на сусло-агаре при температуре 26-28°C. Далее культуру снимали скребком и ресуспендировали в 100 см<sup>3</sup> специального растворителя, гомогенизировали в течение 12 минут при 3-5 тыс. об/мин. В культуре определяли общее количество микроконидий и их жизнеспособность. После чего смешивали гомогенат гриба и защитную среду в соотношении 4:1. Смесь культуры и среды фасовали по 5 см<sup>3</sup> в стерильные флаконы емкостью 10 см<sup>3</sup>.

Фасовали вакцину с помощью дозирующего устройства «Контур П4». Флаконы с вакциной помещали в морозильную камеру, охлажденную до -40°C, на 16-24 часа. Сублимацию культур грибов осуществляли по ранее разработанной схеме.

Нами для испытания были приготовлены 8 вариантов растворителя для сухой вакцины против дерматофитов.

Вариант 1. Готовили путем смешивания 1,0%-ного раствора липополисахаридпептидной фракции (ЛПС-Ф) о-антигена бактерий рода *Salmonella* (получали по разработанному нами методу) [9], натрия хлорида (НХ), экстракта дрожжей (ЭД) в следующем соотношении, вес. %:

1,0%-ный раствор ЛПС-Ф о-антигена бактерий *Salmonella dublin* - 20,0; НХ - 0,5; ЭД - 0,1; вода - остальное.

Вариант 2. 1,0%-ный раствор ЛПС-Ф о-антигена бактерий *Salmonella dublin* - 10,0; НХ - 1,0; ЭД - 0,9; вода - остальное

Вариант 3. 1,0%-ный раствор ЛПС-Ф о-антигена бактерий *Salmonella dublin* - 8,0; НХ - 0,4; ЭД - 0,08; вода - остальное.

Вариант 4. 1,0%-ный раствор ЛПС-Ф о-антигена *Salmonella dublin* - 10,0; НХ - 0,5; ЭД - 0,1; вода - остальное.

Вариант 5. 1,0%-ный раствор ЛПС-Ф о-антигена *E. coli* O<sub>9</sub> - 20,0; НХ - 0,5; ЭД - 0,1; вода - остальное.

Вариант 6. 1,0%-ный раствор ЛПС-Ф о-антигена *E. coli* O<sub>9</sub> - 22,0; НХ - 1,0; ЭД - 1,2; вода - остальное.

Вариант 7. 1,0%-ный раствор ЛПС-Ф о-антигена бактерий *Salmonella dublin* - 16,0; НХ - 0,6; ЭД - 0,5; вода - остальное.

Вариант 8. Натрия хлорид - 0,85; вода - остальное.

Использовали в опыте следующую рецептуру защитной среды: сухое молоко - 8,0 %; желатин - 1,0 %; защитная композиция - остальное. Защитную композицию готовили путем смешивания ингредиентов в следующем соотношении, масс. %: трилон Б - 1,4; сахароза - 33; вода - остальное. Защитную среду и суспензию гриба смешивали в соотношении 1:4.

Общее количество микроконидий и их жизнеспособность определяли после окончания сушки, через 6 и 12 месяцев хранения.

Для определения общего количества микроконидий культуру гриба разводили в 10 раз стерильным физиологическим раствором. Разведенной культурой заряжали две камеры Горяева и подсчитывали количество микроконидий. При этом содержание макроконидий и грибных элементов не учитывали. Подсчет вели в каждой сетке в пяти квадратах (четыре по углам и один в центре или в пяти квадратах, расположенных по диагонали сетки).

Расчет количества микроконидий, содержащихся в пробе, рассчитывали по формуле 1:

$$K = \frac{П + В}{2} \times \rho \times 10^4 \times 5 \quad (1)$$

где K - количество микроконидий в 1 см<sup>3</sup> испытуемой культуры;  
П - количество микроконидий в пяти квадратах первой сетки;

В - количество микроконидий в пяти квадратах второй сетки;  
Р - разведение исходной культуры.

Культуры проверяли на наличие контаминаций. Для этого брали пробу культуры и делали высев на две пробирки с МПА, МПБ, средами Китта-Тароцци и Сабуру. Посевы со средой Сабуру инкубировали при температуре 26-28°C, а на остальных средах при 37°C в течение 10 суток.

Для определения количества жизнеспособных микроконидий готовили разведения вакцины и высевали на сусло-агар. Посевы вакцины инкубировали в термостате при температуре 26-28°C в течение 8-9 суток и проводили визуальный подсчет колоний.

Для определения количества жизнеспособных микроконидий предварительно в шесть пробирок помещали по 4,5 см<sup>3</sup> одного из испытуемых растворителей. Пипеткой брали 0,5 см<sup>3</sup> суспензии культуры и вносили в первую пробирку, перемешивали содержимое пробирки и новой пипеткой брали 0,5 см<sup>3</sup> и переносили во вторую пробирку и т.д., то есть готовили разведения от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup>.

Из разведения вакцины 10<sup>-6</sup> пипеткой набирали 0,5 см<sup>3</sup> суспензии гриба и засеивали в каждую из трех чашек Петри с сусло-агаром. Легким покачиванием чашки равномерно распределяли суспензию гриба по поверхности питательной среды. Засеянные чашки помещали в термостат при температуре 26-28°C на 10 суток.

Количество выросших колоний подсчитывали на 10 сутки визуально. Суммировали выросшие колонии в трех чашках Петри. Полученную сумму делили на 3 и умножали на 10<sup>6</sup> (степень разведения), полученный результат соответствует количеству жизнеспособных микроконидий в см<sup>3</sup> гомогената гриба.

Влияние температуры растворителя и времени экспозиции в нем культур на жизнеспособность микроконидий изучали при температуре испытуемых растворителей 10°C, 15°C, 20°C, 25°C и 30°C в течение 1, 30, 60 и 120 минут.

Массовую долю влаги в вакцине определяли по ГОСТ 24061-89.

**Результаты исследований.** Разнообразие механизмов повреждения клеток при выведении их из состояния анабиоза объясняется как природой микроорганизмов, так и множеством повреждающих факторов, особенно на стадии регидратации, когда вследствие нарушения барьерных функций клеточных мембран ценные компоненты клетки выходят в окружающую среду, а вода проникает внутрь клетки. Паранекроз и липофенероз при регидратации также могут привести их к гибели [1].

Период восстановления лиофилизированных культур характеризуется устранением всех деструктивных изменений, реставрацией поврежденных при обезвоживании структур, отторжением и лизисом необратимо инактивированных участков, восстановлением деятельности ферментных систем.

Для быстрого восстановления всех жизненных функций клеток микроорганизмов большое значение имеет выбор оптимальных условий. Решающую роль играет состав растворителя, его температура и время экспозиции перед высевом на контрольную питательную среду. При удачном выборе этих условий выход жизнеспособных микроорганизмов в отдельных случаях увеличивается в несколько раз [5].

Современный подход к повышению эффективности применения сухих вакцин также направлен на разработку и использование специальных растворителей.

После ресуспендирования сухих образцов культур дерматофитов разными растворителями была прежде всего установлена чистота и типичность роста культур.

Проведенные исследования показали, что жизнеспособность микроконидий, высушенных в оптимизированной нами защитной среде, при выведении их из состояния анабиоза в значительной степени зависит от состава применяемого для этой цели растворителя.

Данные по изучению влияния состава растворителя на восстановление жизнеспособности дерматофитов приведены в таблице 35.

Таблица 35

**Влияние состава растворителя на восстановление жизнеспособности дерматофитов**

№ серии	Состав растворителя	Количество живых микроконидий в см <sup>3</sup> вакцины					
		при изготовлении		через 6 мес. к исходной		через 12 мес. к исходной	
		млн/см <sup>3</sup>	%	млн/см <sup>3</sup>	%	млн/см <sup>3</sup>	%
1	№ 1	237,0±1,5	100,0	232,0±2,0	97,9	226,0±1,0	95,4
2							
3							
1	№ 2	221,0±2,5	100,0	213,7±1,5	96,7	207,7±1,5	94,0
2							
3							
1	№ 3	233,0±2,0	100,0	220,7±3,0	94,7	214,0±2,0	91,8
2							
3							
1	№ 4	222,3±2,0	100,0	154,0±3,0	69,3	129,3±2,5	58,2
2							
3							
1	№ 5	228,7±1,5	100,0	218,3±1,5	95,5	212,6±1,5	93,0
2							
3							
1	№ 6	238,0±2,0	100,0	203,7±2,5	85,6	193,0±2,5	81,0
2							
3							
1	№ 7	222,7±2,0	100,0	214,0±1,5	96,1	211,7±2,5	95,0
2							
3							

1	№ 8						
2	физиологический	232,6±2,0	100,0	176,7±2,5	76,0	156,3±2,5	67,2
3	раствор (контроль)						

Из результатов, сведенных в таблице 1, видно, что состав растворителя оказывает существенное влияние на восстановление исходной жизнеспособности. При этом видно, что достоверная разница отмечается уже через 6 месяцев хранения образцов культур грибов.

Для практических целей наиболее предпочтительно использовать растворитель, приготовленный по вариантам № 1, 2, 5 и 7, так в образцах культур грибов даже через 12 месяцев они способствуют восстановлению жизнеспособности у 93-95 % микроконидий. Применяемый в настоящее время физиологический раствор для регидратации сухой живой вакцины против трихофитии восстанавливает через 12 месяцев хранения жизнеспособность только у 67,2 % микроконидий.

Это указывает на то, что влияние состава растворителя на жизнеспособность микроорганизмов при выведении их из состояния анабиоза следует изучать для каждого конкретного вида микроорганизмов и штамма.

Результаты исследований по изучению влияния температуры и времени экспозиции в растворителях приведены в таблице 36.

Таблица 36

**Влияние температуры и время экспозиции на жизнеспособность микроконидий  
Tr. verrucosum ТФ-130**

Температура растворителя, °С	Время экспозиции в растворителе, мин.	Состав растворителя		
		Физиологический раствор	Вариант 1	Вариант 7
		Выживаемость микроконидий к исходному, %		
10	на момент растворения	60,9	93,2	94,3
	30	58,4	90,1	90,8
	60	52,2	88,8	90,2
	120	50,6	87,4	88,7
15	на момент растворения	65,6	93,6	94,5
	30	64,2	93,2	94,2
	60	59,2	92,6	93,8
	120	57,8	92,2	93,5
20	на момент растворения	67,2	94,0	95,0
	30	64,5	94,2	94,6
	60	60,3	94,2	94,2
	120	59,4	94,5	94,6
25	на момент растворения	67,5	94,3	95,5
	30	66,6	94,6	95,8
	60	62,4	94,8	96,4
	120	62,3	95,4	96,4
30	на момент растворения	67,3	94,4	95,7
	30	66,5	94,8	96,2
	60	62,6	95,2	96,4
	120	62,2	95,6	96,6

Как видно из данных, помещенных в таблице 2, жизнеспособность микроконидий, ресуспендированных в растворителе 1 и 7, не зависит от температуры растворителя и длительности выдерживания конидий в нем перед высевом на питательную среду. При ресуспендировании конидий в физиологическом растворе при температуре 10°С и времени инкубации 60-120 минут отмечается некоторое снижение их жизнеспособности, особенно относительно его температуры 25-30°С.

**Заключение.** В ходе проведенных исследований нами установлено, что жизнеспособность микроконидий дерматофитов при выведении их из состояния анабиоза зависит от состава растворителя. С этой целью целесообразно использовать растворитель, приготовленный по вариантам № 1 и № 7.

**Выводы.** 1. Жизнеспособность микроконидий дерматофитов при выведении из состояния анабиоза зависит от состава растворителя. 2. Разработаны эффективные, стандартные по составу растворители, обеспечивающие высокую выживаемость микроконидий дерматофитов в процессе регидратации, независимо от температуры и времени экспозиции в нем.

**Литература.** 1. Беккер, М.Е. Анабиоз микроорганизмов / М.Е. Беккер. – Рига: Зинатне, 1981. – С. 27-32. 2. Белоус, А.М. Научные основы технологии сублимационного консервирования / А.М. Белоус, Ц.Д. Цветков. – Киев: Наукова Думка, 1985. – С. 208. 3. Герхардт, Ф. Растворы для разведения и изменения биомассы // Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др.: Пер. с англ. – М.: Мир, 1983. – Т. 3. – С. 231-238. 4. Дубров, И.С. Зависимость биологической устойчивости вакцины в аэрозоле от состава регидранта / И.С. Дубров, Г.Д. Ищенко, А.А. Матрос // Ветеринария. – 1984. - № 5. – С. 32-34. 5. Заболотных, М.В. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства коринебактерий при лиофилизации и длительном хранении / М.В. Заболотных, А.В. Заболотных // Материалы Всесоюзной научно-практической конференции патологоанатомов ветеринарной медицины. – Омск, 2000. – С. 79-80. 6. Звягин, И.В. Методические рекомендации по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов / И.В. Звягин. – М., 1981. – С. 33. 7. Пушкарь, Н.С. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования / Н.С. Пушкарь, А.М. Белоус, Ц.Д. Цветков. – Киев: Наукова Думка, 1984. – С. 264. 8. Рубченков, П.Н. Выживаемость пастерелл штамма К после регидратации и в

аэрозольном состоянии / П.Н. Рубченко // *Ветеринария*. – 1986. – № 1. – С. 38. 9. Способ получения препарата для иммунокоррекции из сальмонеллезных бактерий : пат. 11671 Респ. Беларусь, МПК<sup>6</sup> А 61К 35/66 / Зайцева А.В., Дремач Г.Э., Вербицкий А.А., Зайцева В.В.; заявитель УО ВГАВМ - № а 20070348 ; заявл. 04.04.07 ; опубл. 28.02.09 // *Афіцыйны бюл. / Нац. Цэнтр інтэлектуал. Уласнасці*. – 2009. – № 1. – С. 56. 10. Ураков, Н.Н. Функциональное состояние микроорганизмов в процессе приготовления бактериальных препаратов / Н.Н. Ураков, В.Я. Волков, Р.Б. Боровик // *Биотехнология*. – 1988. – Т. 4, № 4. – С. 420-432. 11. Ярцев, М.Я. Разработка технологии производства живых сухих вакцин против пастереллеза птиц, рожи свиней и бруцеллеза животных (экспериментальные исследования и внедрения) / М.Я. Ярцев. – Дисс. ... докт. биол. наук. – М., 1990. – С. 316.

Статья передана в печать 05.09.2012 г.

УДК 619:616.594

## ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ДЕРМАТОФИТОВ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Зайцева В.В., Красочко И.А.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

*Предложен оптимизированный состав растворителя для подготовки посевного материала гриба трихофитон, позволяющий повысить выход целевого продукта в 1,65-1,87 раз.*

*We propose to optimize the composition of the solvent for the preparation of seed fungus Trichophyton, which increases the yield of the desired product 1,65-1,87 times.*

**Введение.** Основным элементом создания эффективной биотехнологической системы является питательная среда для оптимального биосинтеза целевого продукта, а важная стадия ее формирования – разработка способа выращивания микроорганизмов и их аппаратурно-техническое обеспечение [7, 8].

Среды должны быть по возможности воспроизводимыми и свободными от балластных веществ, ненужных для роста и размножения культур, а также веществ, затрудняющих процесс дальнейшей очистки и консервации препаратов.

Тест питательной потребности играет определенную роль при определении вида гриба, хотя и не отражает истинное питание дерматофитов в природных условиях в стадии сапрофитного роста.

Значение этого теста усиливается в связи с промышленным производством живых грибных вакцин, когда получение биомассы вакцинного штамма производится в стерильных условиях на питательных средах [1, 2, 5].

Как отмечают некоторые исследователи [3, 4], микроконидии дерматофитов полноценны в генетическом отношении, а полное отсутствие антагонистов – выращивание культуры в стерильных условиях на питательных средах – дает возможность проявляться изменчивости бесконечно.

Признак спорообразования, являющийся количественным, легко изменяется под воздействием внешних условий. Метод селекции штаммов дерматофитов по признаку спорообразования включает этапы:

- 1) приготовление разведений селекционируемой культуры с целью получения на чашках Петри отдельно выросших колоний;
- 2) перенос отдельно выросших колоний в отдельную пробирку с сусло-агаром;
- 3) доращивание культур до 20- дневного возраста;
- 4) приготовление смывов моноизолятов;
- 5) подсчет конидий в смывах, выбор наиболее продуктивных смывов;
- 6) высев взвесью продуктивного смыва – приготовление матричной культуры [3].

Жизнеспособность микроконидий, т.е. способность прорасти, не менее, чем интенсивность спорообразования, относится к категории основных качеств живой грибной вакцины.

Известны способы выращивания дерматофитов на разных агаризованных средах: сусло-агар, агар Чапека, агар Сабуро, агар Плаута, мясо-пептонный агар и агар с крахмалом [6].

Следует отметить, что известные способы выращивания дерматофитов не обеспечивают высокого выхода микроконидий дерматофитов, поэтому остается актуальной задачей поиск наиболее эффективных питательных основ и стимуляторов роста грибов.

Цель исследований – оптимизировать выращивание гриба трихофитона на питательных средах.

**Материалы и методы.** Использовали культуры: *Trichophyton verrucosum* ТФ-130 и *Trichophyton mentagrophytes*.

Для изготовления питательной среды и выращивания грибов использовали сусло-агар. Солод для получения сусла готовили из зерна, обработанного препаратами Флоравит, Фузарин, Бионорм В и водопроводной водой.

Эффект от использования стимуляторов состоит в повышении выхода целевого продукта, экстрактивности, его ферментативной активности и сокращении солодоращения.

Неохмеленное сусло готовили из мелкоизмельченного сухого солода. Для этого 2 кг солода ресуспендировали в 10 литрах очищенной воды. Температуру смеси доводили до 54°C и инкубировали далее в течение 20 минут (белковая пауза). Далее температуру смеси доводили до 63°C (за 1 мин