УДК 57.083.134:579.843.1

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПУТЕМ ЭФФЕКТИВНОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА С ПРИМЕНЕНИЕМ ВЫСОКОКАЧЕСТВЕННЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

© 2011 Л.С. Катунина[1], И.О. Лысенко[2] , Т.В.Таран[1] , И.В. Жарникова[1], Т.В. Жарникова [1], А.А. Зуенко [1], М.А Ашихмина[1]

[1] Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, Ставрополь
[2] Ставропольский государственный аграрный университет, Ставрополь

Поступила 17.02.2011

Микробное обсеменение водоемов приводит к серьезным заболеванием людей, животных, а иногда и к их летальному исходу. Для проведения экологического мониторинга с целью бактериологического выявления возбудителей инфекционных заболеваний необходимы высококачественные питательные среды. С этой целью разработана новая питательная среда жидкая на основе патоки рафинадной для культивирования и выделения холерного вибриона.

***Ключевые слова*:** экологический мониторинг, патока рафинадная, питательная среда жидкая, холерный вибрион.

Вода не является благоприятной средой для размножения болезнетворных микробов, но, тем не менее, они сохраняются и выживают в ней определенное время. Во многих странах и по настоящее время наблюдаются водные эпидемии холеры, брюшного тифа, сальмонеллезов, колиэнтеритов.

Острые желудочно-кишечные заболевания из-за широкой распространенности, представляет значительную проблему для здравоохранения. Особую опасность в плане эпидемиологических осложнений, тяжести заболевания и трудности лабораторной диагностики представляет холера. Опасное заболевание человека – холеру вызывает *Vibrio cholera*.

Возбудителем являются вибрионы *V. cholera eltor*, отличающиеся большой устойчивостью к действию неблагоприятных факторов внешней среды и может длительно находиться в воде открытых водоемов [2].

Факт широкого распространения холерных вибрионов в окружающей среде должен обращать на себя внимание эпидемиологов и способствовать организации мониторинга за эпидемическим потенциалом циркулирующих холерных вибрионов. Для быстрой оценки эпидемической ситуации целесообразно применение новых методов индикации, позволяющих одновременно обнаружить микроорганизм и охарактеризовать его значимость (определить наличие маркеров патогенности и серогруппу).

Катунина Людмила Семеновна, к.б.н., с.н.с., e-mail: admnip@ mail.stv.ru; *Таран Татьяна Викторовна*, д.м.н., с.н.с., e-mail: admnip@ mail.stv.ru; *Лысенко Изольда Олеговна*, д.б.н., доц.,. e-mail: Lysenkostav@yandex.ru; Жарникова Ирина Викторовна, д.б.н., с.н.с., e-mail: IVJ-biotech@.yandex.ru; *Жарникова Татьяна Владимировна*, к.б.н., с.н.м., e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru; *Ашихмина Марина Александровна*, м.н.с., e-mail: IVJ-biotech@.yandex.ru; *Зуенко Анастасия Александровна*, н.с., e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru.

В целях предупреждения возникновения и распространения холеры необходимо своевременно диагностировать заболевание, а для этого в свою очередь, необходимо разработать новые качественные питательные среды. Перспективным представляется поиск доступного, экономически выгодного, стандартизированного сырья и создание из него питательных основ и сред для бактериологической диагностики холеры [6].

Одним из ключевых факторов, определяющих технологию бактериологической диагностики холеры является среда накопления [3, 4, 7]. Наряду с традиционными – основным раствором пептона и 1% - ной пептонной водой – в разные годы были предложены альтернативные среды накопления на основе панкреатических и солянокислотных гидролизатов казеина, ферментолизатов сои, кукурузного экстракта и кормовых углеводородных дрожжей, бульонных кубиков «Maggi» [10]. Однако в нашей стране налажен промышленный выпуск только одной накопительной среды – пептона основного сухого, рецептура и технология изготовления которого были разработаны Н.В. Плоскиревым [9]. Входящий в состав данной среды ферментативный пептон имеет высокую себестоимость из-за дороговизны мясопродуктов [5].

По данным ряда исследователей, с целью удешевления питательных сред для культивирования холерного вибриона уже давно делались попытки заменить дорогостоящие продукты животного происхождения растительными [8]. Авторы применяли пекарские дрожжи, экстракты лекарственных растений, спирулину, кукурузный экстракт и т.д. Успешно использовали различные белковые основы из растительного сырья – сои, картофеля для культивирования возбудителей особо опасных инфекций. С целью снижения себестоимости бактериальных препаратов для выращивания холерного вибриона, нами предложена новая питательная среда жидкая приготовленная на основе патоки рафинадной (меласса свекловичная) [1].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве сырья использовали патоку рафинадную (меласса свекловичная) (ГОСТ Р 52304-2005) – отход свеклосахарного производства, обладающая универсальным составом: содержащая до 56% сахарозы, около 14,8% азотсодержащих веществ, преимущественно амидов, 54-63% углеводов, главным образом сахаров, 16,7% безазотистых органических экстрактивных веществ, 8-11% солей, 8,5% золы. Из органических азотсодержащих веществ в мелассе присутствуют амиды – бетаин, аспарагин и глютамин, а также нитраты. Из органических безазотистых веществ в мелассе представлены пектиновые вещества; низкомолекулярные жирные кислоты и другие вещества. В мелассе обнаружено 17 аминокислот. К основным ростовым факторам патоки относятся витамины B_3, B_4, B_5, B_8 и Н. В золе мелассы представлен ряд микроэлементов: бор, фтор, алюминий, кремний, фосфор, марганец, железо, кобальт, никель, цинк, медь, стронций, молибден, олово, свинец. В продукте присутствует: кальций, калий, натрий, и другие элементы [1].

Для контроля ростовых качеств сред использовали типичные по культурально – морфологическим свойствам холерного вибриона вирулентные тест-штаммы Vibrio cholera С-602; С-604; 442 As; 619 As и авирулентный штамм V. holerae non 01 Р 9741, полученные из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» СтавНИПЧИ.

По нашему мнению патока рафинадная подходит для ее использования в качестве основы для приготовления питательных сред. Внесение добавок и стимуляторов роста в среды осуществляли во время варки. Опытная среда была представлена тремя экспериментально-лабораторными сериями. Контрольной средой являлся пептон основной сухой производства ФГУП НПО «Питательные среды», г. Махачкала, приготовленный по инструкции производителя и разведенный в 10 раз водой, очищенной. Посевы с опытной и контрольной сред осуществляли на щелочной агар производства ФГУП НПО «Питательные среды» (г. Махачкала).

Разработанная нами среда для культивирования и выделения холерного вибриона на основе патоки рафинадной апробирована в производственных условиях и сотрудниками лаборатории «коллекция патогенных микроорганизмов» СтавНИПЧИ. Оценку разработанной новой питательной среды жидкой по биологическим показателям проводили по следующим показателям: чувствительности и скорости роста на них холерных вибрионов при посеве 6 – часовых культур из флаконов на агаровые пластинки, стабильность биохимических свойств тест-штаммов после пассажей через исследуемую среду.

Руководствуясь методическими указаниями по определению качества питательных сред для выращивания холерного вибриона, готовили культуры вирулентных тест-штаммов и авирулентного штамма V. cholerae non 01 Р-9741 [7]. Оценку ростовых качеств питательных сред проводили путем подсчета количества выросших колоний холерного вибриона при посеве содержимого флаконов на пластинки с плотной питательной средой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении ростовых качеств питательной среды жидкой для V. cholerae С-602; С-604; 442 As; 619 As и V. cholerae non 01 Р 9741 провели подсчет КОЕ на всех чашках Петри. Анализ ростовых качеств, показал, что при посеве 100 и 10 м.к. во флаконы и выращивания вибрионов в течение 6 ч при 37 °С на питательной среде жидкой, размножение указанных штаммов происходило быстрее, чем на контрольной среде. Это достигалось, вероятно, за счет высокой питательности новой питательной среды приготовленной на основе патоки рафинадной, содержащей большое количество сахарозы, углеводов, витаминов, азотсодержащих веществ микро- и макроэлементов и аминокислот и т.д. Статистическая обработка показала достоверность различий ($P \leq 0,05$) этих результатов в сравнении с контролем.

Было установлено, что по показателям чувствительности, количеству выросших колоний при посеве на агаровые пластинки 6 – часовых культур опытная среда превосходила контрольную и соответствовала требованиям «Инструкции по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для холерного вибриона» [7].

Основные биохимические свойства взятых в работу вирулентных и V. cholerae non 01 Р-9741 не изменялись после трех последовательных пассажей как через опытную, так и через контрольную среды.

ВЫВОДЫ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что опытная питательная среда жидкая для культивирования и выращивания холерного вибриона, приготовленная на основе патоки рафинадной, обладая универсальным составом, имеет более низкую, чем контрольная среда, стоимость. Кроме того, обладая стандартностью по изученным показателям, она не уступает контрольной. Проведенное исследование указывает на перспективность дальнейшей работы по внедрению питательной среды в микробиологическую практику с целью индикации холерного вибриона для последующего проведения эффективного экологического мониторинга объектов внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРПТУРЫ

1. *Болотов, Н.А., Фараджаева, Е.Д.* Производство хлебопекарных дрожжей. М.: Профессия, 2002. 167 с.
2. *Заднова, С.П., Смирнова, Н.С.* Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде // Проблемы особо опасных инфекций. Вып. 3 (105). Саратов, 2010. С. 13-19.

3. Инструкция по организации и проведению противохолерных мероприятий. М., 1995. С. 61-71.
4. Инструкция по бактериологическому контролю диагностических питательных сред для холерного вибриона. Саратов, 1983. С. 11-13.
5. *Калинский Д.И.* и др. Оценка жидкой накопительной питательной среды // Биотехнология (теоретический и научно- практический журнал). 2003, № 4. С. 70 -74.
6. *Мазрухо А.Б.* Разработка питательных сред для культивирования и выделения холерных вибрионов на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сб. матер. пробл. комис. научн. совета по сан.-эпидем. охр. терр. РФ. Вып. № 10. 2005. С. 169 - 171.
7. МУ 3.3.2.2124-46 (Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза Москва, 2007). – 35 с.
8. *Поздеев О.К., Покровский В.И.* Бактериологические исследоания. Медицинская микробиология М., 1999. 1200 с.
9. *Плоскирев, Н.В.* Сухие питательные среды: Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней. М.: Медицина, 1973. С. 110 115.
10. *Прокофьева Т.И.* Подбор питательных сред для выращивания холерного вибриона: Материалы по обмену опытом. М., 1960. № 2(58). С. 10-17.

ECOLOGICAL MONITORING PERFECTION OF ENVIRONMENT BY EFFECTIVE ALLOCATION CHOLERA VIBRIO WITH APPLICATION HIGH-QUALITY NUTRIENT MEDIUMS

© 2011 L.S. Katunina[1], I.O.Lysenko[2], T.V.Taran[1], I.V. Zharnikova[1], T.V. Zharnikova [1], A.A. Zuenko [1] , M.A. Ashihmina[1]

[1] Stavropol research antiplague institute, Stavropol
[2] Stavropol state agrarian university, Stavropol

Microbic seeding of reservoirs leads to serious diseases of people, animals and sometimes to their lethal outcome. High-quality nutrient mediums are necessary for carrying out of ecological monitoring for the purpose of bacteriological revealing of infectious disease activators. For this purpose the new nutrient medium, liquid , on the basis of treacle refined is developed for cultivation and allocation of cholera vibrio.

Key words: ecological monitoring, treacle refined, nutrient medium liquid, cholera vibrio.

Katunina Lyudmila Semenovna, the Candidate of Biological Sciences, the senior research assistant of laboratory of nutrient mediums for cultivation of microorganisms I-IV of groups of pathogenicity in Stavropol research antiplague institute, e-mail: admnip@ mail. stv. ru; *Taran Tatyana Viktorovna*, the Doctor of Medical Sciences, the senior research assistant of laboratory of nutrient mediums for cultivation of microorganisms I-IV of groups of pathogenicity in Stavropol research antiplague institute, e-mail: admnip@ mail. stv. ru; *Lysenko Izolda Olegovna*, the Doctor of BIOLOGICAL ScienceS,the manager of ecology and landscape building chair in StSAU, the docent, e-mail: Lysenkostav@yandex.ru; *Zharnikova Irina Viktorovna*, the Doctor of Biological Sciences, the leading research assistant of research-and-production laboratory of especially dangerous and other infections in Stavropol research antiplague institute, e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru; *Zharnikova Tatyana Vladimirovna*, the Candidate of Biological Sciences, the senior research assistant of laboratory of experts of StavRAPI, e-mail: IVJ-biotech@.yandex.ru4 *Ashihmina Marina Aleksandrovna*, the junior research assistant of nutrient mediums for cultivation of microorganisms I-IV of groups of pathogenicity of StavRAPI, e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru; *Zuenko Anastasiya Aleksandrovna*, the research assistant of laboratory of biological-technological department StavRAPI, e-mail: IVJ-biotech@yandex.ru