

УДК 57.083.134:616.98

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ ПУТЕМ КОНСТРУИРОВАНИЯ НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ЛЕГИОНЕЛЛ

© 2012 Л.С. Кагунина¹, И.О. Лысенко², Т.В.Таран¹,
И.В. Жарникова¹, А.А. Зуенко¹, М.А. Ашихмина¹

¹Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

²Ставропольский государственный аграрный университет

Поступила 01.25.2011

Экологический мониторинг природных сред имеет важное значение в прикладной микробиологии. С этой целью разработана новая питательная среда плотная на основе ферментативного гидролизата легкого свиной для культивирования и выделения легионелл.

Ключевые слова: экологический мониторинг, ферментативный гидролизат легкого свиной, L-цистеин, эмбриональный стимулятор роста микроорганизмов, питательная среда плотная, легионеллы.

Болезнь легионеров является острым инфекционным заболеванием, характеризующимся разнообразием клинических - легочных проявлений, возбудителем которого являются факультативные внутриклеточные паразиты – легионеллы.

Биологической особенностью жизненного цикла всех представителей семейства Legionellaceae, является их способность к внутриклеточному паразитированию и размножению. Они проникают в макрофаги и моноциты, препятствуя слиянию эндосом с лизосомами. Тем самым они создают условия для их размножения и транспортировки в упомянутых клетках. Возбудитель поражает только легочную ткань. Содержимое капсулы легионелл относят к факторам агрессии, подавляющим фагоцитоз [1].

Важнейшим фактором успешного выживания легионелл в природных условиях является их существование в составе биопленок, которые широко представлены как в природных водоемах, так и в искусственных водных системах. Они формируются на внутренних поверхностях труб систем водоснабжения, фильтрации и очистки воды, в системах кондиционирования воздуха, подводных сооружениях.

Биопленка – это особая ниша, которая является чрезвычайно благоприятной средой для размножения микроорганизмов, так как формирующийся полисахаридный слой (гликокаликс) в совокупности с другими продуктами жизнедеятельности микроорганизмов, обеспечивающий бактериям защиту от неблагоприятных факторов окружающей среды в том числе химических и биологических.

Пресная вода является естественным местом обитания практически всех видов семейства Legionellaceae. Причем легионеллы встречаются практически повсеместно [7].

Наиболее распространенный путь заражения – вдыхание человеком аэрозолей, загрязненных легионеллами. Точная доза бактерий, необходимая для инфицирования человека, неизвестна. Однако можно предположить, что она невелика, поскольку известны случаи заражения после крайне непродолжительной экспозиции, т.е. нахождения в зоне действия загрязненного легионеллами аэрозоля в течение нескольких минут, а также после экспозиции на довольно большой дистанции от источника заражения – до 6 км [9].

Тяжесть течения пневмонии, вызванной легионеллами определяет особую важность проведения ее точной и своевременной лабораторной диагностики, кроме того данный возбудитель не растет на обычных питательных средах [10].

Существующие микробиологические методы диагностики обладают высокой стоимостью и длительны в исполнении (7-10 сут.).

Питательные среды являются основным звеном в системе микробиологических и биотехнологических исследований, своим качеством нередко определяя результаты исследования [2-4].

С целью удешевления питательных сред делаются попытки замены дорогостоящего мяса на субпродукты. Установлено, что легкое свиной, относящееся к субпродуктам 2 категории, состоит в среднем из 13% белка. Биохимические исследования подтвердили, что в ферментативном гидролизате легкого свиной (ФГЛс) отмечены наиболее оптимальные показатели аминокислотного состава, макро- и микроэлементы, витамины. Богатый состав подтверждает его биологическую полноценность, что является главным требованием к гидролизатам, используемым в качестве основы питательных сред [6].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Нами использован ФГЛс как основа при разработке рецептуры новой питательной среды. В качестве исходной использовали рецептуру приготовления традиционной простой среды общего назначения – агара Хоттингера, в которой мясная основа была заменена на субпродукт. Такой подход, по нашему мнению, обеспечивает снижение себестоимости питательной среды при сохранении ее универсальности.

Кагунина 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., в.н.с., 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

ФГЛс – белковая питательная основа является универсальным компонентом. Именно она обеспечивает биологическую полноценность и оптимальность развития культивируемых в ней организмов – легионелл.

На новой питательной среде изучали культуральные, морфологические свойства и подвижность, т.к. они являются важными и надежными диагностическими показателями для определения качества агаризованной питательной среды.

Для бактериологического контроля питательных сред, предназначенных для диагностики легионеллеза, используют тест-штаммы *Legionella pneumophila* Philadelphia 1 ATCC 33152 и *L. pneumophila* Bloomington ATCC 33155. Указанные тест-штаммы получают из НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Взвесь тест-штаммов засевают по 0,1 мл из разведения 10^{-7} ($1 \cdot 10^2$ м.к./мл) на трех чашках Петри с питательной средой, распределяя посевной материал по поверхности среды методом покачивания чашек. Учет результатов производят визуально через 24-48-72 ч инкубации посевов при температуре (37 ± 1) С.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При выращивании тест-штаммов легионелл на питательной среде, приготовленной на основе ФГЛс, наблюдали рост свыше 50% плоско-выпуклых, синевато-сероватых, плоско-выпуклых колоний размером 1,5-2,0 мм через 48 ч, тогда как на контрольной среде СЭЛ рост наблюдался только через 72 ч, на агаре Хоттингера роста не наблюдалось.

Таким образом, при получении результатов по испытанию новой питательной среды, следует подчеркнуть, что одновременное проявление культуральных и сохранение морфологических свойств, а также выраженной подвижности, свидетельствует о ее полноценности, а рекомендуемые подходы к разработке основы для конструирования новой питательной среды, позволили подтвердить эффективность применения в качестве дешевого, экономически целесообразного сырья легкого свиного, а в качестве ростовых факторов – L-цистеин и эмбриональный стимулятор роста микроорганизмов, что открывает перспективы для его использования в микробиологической про-

мышленности. Предложенная плотная питательная среда по чувствительности соответствует требованиям к питательным средам для выделения и культивирования возбудителя легионеллеза по биологическим показателям, а по скорости роста превосходит указанные требования, обеспечивая формирование колоний через 48 ± 2 ч инкубации [4].

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют, что опытная питательная среда плотная для культивирования и выращивания легионелл, приготовленная на ферментативном гидролизате легкого свиного, имея более низкую, чем контрольная среда, стоимость, и обладая стандартностью, не уступает ей по изученным показателям. Проведенное исследование указывает на перспективность дальнейшей работы по внедрению питательной среды в микробиологическую практику с целью эффективного экологического мониторинга объектов внешней среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология. М., 2001. 736 с.
2. Бубеев А.Т., Данилова Т.Е., Цыренов В.Ж. Технология получения основы микробиологических питательных сред // Биотехнология: состояние и перспективы развития. М., 2005. Ч. 1. С. 320-321.
3. Лысенко И.О., Толоконников В.П., Михалев С.Н. Научные основы технологии культивирования *Wohlfahrtia magnifica* // Актуальные вопросы современной науки. М., 2008. С. 123-127.
4. Лысенко И.О., Толоконников В.П. Научные основы культивирования и стерилизации *Wohlfahrtia magnifica* // Первые международные Беккеровские чтения. Волгоград, 2010. С. 43-439.
5. МУ 3.3.2.2124-46 (Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза Москва, 2007).
6. Петрухин И.В. Корма и кормовые добавки. М.: Росагропромиздат, 1989. 526 с.
7. Borella, P. Water ecology of *Legionella* and protozoan: environmental and public health perspectives // Biotechnol Annu Rev. 2005. Vol. 11. P. 355-380.
8. Cunha, B.A. The diagnostic significance of relative bradycardia in infectious disease // Clin. Microbiol. Infect. 2000. Vol. 6, № 12. P. 633-634.
9. Tran M.N., Ilef D., Jarraud S. et al. A community outbreak of Legionere's disease linked to industrial cooling towers – how far can airborne transmission spread. // Abstractset from 6th International Conference on *Legionella*, Chicago, USA October, 2005. P. 114-123.

INCREASING OF EFFICIENCY ECOLOGICAL MONITORING EFFICIENCY OF ENVIRONMENT BY DESIGNING OF NEW NUTRIENT MEDIUMS FOR CULTIVATION LEGIONELLS

© 2012 L.S. Katunina¹, I.O.Lysenko², T.V.Taran¹, I.V. Zharnikova¹, T.V. Zharnikova¹, A.A. Zuenko¹, M.A. Ashihmina¹

¹ Stavropol Research Antiplague Institute

² Stavropol State Agrarian University

Ecological monitoring of environments has great value in applied microbiology. For this purpose the new nutrient medium dense of fermentative hydrolysate of pig lung for cultivation and allocation of legionells.

Key words: ecological monitoring, fermentative hydrolysate of pig lung, L-tsistein, embryonic stimulator of microorganism growth, nutrient medium dense, legionells.

Katunina Lyudmila Semenovna, e-mail: admnip@mail.stv.ru; Taran Tatyana Viktorovna, E-mail: admnip@mail.stv.ru; Lysenko Izolda Olegovna, E-mail: Lysenkostav@yandex.ru; Zharnikova Irina Viktorovna, E-mail: IVJ-biotech@yandex.ru; Zharnikova Tatyana Vladimirovna, E-mail: IVJ-biotech@yandex.ru; Ashihmina Marina Aleksandrovna, E-mail: IVJ-biotech@yandex.ru; Zuenko Anastasiya Aleksandrovna, E-mail: IVJ-biotech@yandex.ru.