

## МИКРОБИОЛОГИЯ И ВИРУСОЛОГИЯ MICROBIOLOGY AND VIROLOGY

DOI: 10.29413/ABS.2020-5.4.8

### Конструирование питательной среды для культивирования листерий

Хаптанова Н.М., Лукьянова С.В., Кузнецов В.И., Gefan Н.Г., Андреевская Н.М., Коновалова Ж.А.,  
Остяк А.С., Косилко В.С.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора  
(664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78, Россия)

Автор, ответственный за переписку: Лукьянова Светлана Владимировна, e-mail: svetlulukyan@mail.ru

#### Резюме

**Обоснование.** Для получения достоверных результатов лабораторных исследований по идентификации листерий требуется наличие сертифицированных диагностических агглютинирующих листериозных сывороток. Важным этапом технологического процесса производства таких медицинских изделий для диагностики *in vitro* является подбор эффективных питательных сред для накопления листериозного микроба.

**Цель исследования:** разработка эффективной питательной среды для культивирования и накопления бактериальной массы листерий.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила экспериментальная питательная среда для культивирования листерий сухая. В качестве контроля использовали питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) и мясопептонный агар с 1% глюкозой (МПА с 1% глюкозой). Специфическую активность питательных сред при культивировании тест-штамма *Listeria monocytogenes* 766 оценивали комплексом микробиологических методов.

**Результаты.** Подобрана оптимальная основа питательной среды для культивирования листерий – панкреатический гидролизат речной рыбы сороги (лат. *Rutilus rutilus lacustris*) и гидролизат отходов производства мясной воды. Разработан качественно-количественный состав питательной среды, исследованы её физико-химические и биологические свойства. При изучении биологических свойств экспериментальной среды установлено, что через 24 часа инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °C питательная среда обеспечивала рост типичных колоний листерий. Показатель прорастания составлял 85 %, что выше по сравнению с ростом культуры на МПА с 1% глюкозой и ГРМ-агаре в среднем на 21 % ( $p < 0,05$ ).

**Заключение.** Экспериментальная питательная среда для культивирования листерий сухая обеспечивала рост колоний тест-штамма *L. monocytogenes* 766 с сохранением характерных культуральных, морфологических и биохимических свойств, а по показателям роста превосходила контрольные среды. Использование предлагаемых питательных основ способствует снижению экономических затрат при производстве питательной среды.

**Ключевые слова:** гидролизаты, культивирование, питательная среда, *Listeria monocytogenes*

**Для цитирования:** Хаптанова Н.М., Лукьянова С.В., Кузнецов В.И., Gefan Н.Г., Андреевская Н.М., Коновалова Ж.А., Остяк А.С., Косилко В.С. Конструирование питательной среды для культивирования листерий. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(4): 60-66. doi: 10.29413/ABS.2020-5.4.8

### Designing a Nutrient Medium for the Accumulation of Microbial Mass of Listeria

Khaptanova N.M., Lukyanova S.V., Kuznetsov V.I., Gefan N.G., Andreevskaya N.M., Konovalova Zh.A.,  
Ostyak A.S., Kosilko V.S.

Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor (Trilissera str. 78, Irkutsk 664047,  
Russian Federation)

Corresponding author: Svetlana V. Lukyanova, e-mail: svetlulukyan@mail.ru

#### Abstract

**Background.** To obtain reliable results of laboratory studies on the identification of Listeria, the presence of certified diagnostic agglutinating Listeria sera is required. An important step in the manufacturing process of such medical devices for *in vitro* diagnostics requires effective nutrient media for the accumulation of listeriosis microbe.

**Aim of the research.** To develop an effective nutrient medium for the accumulation of bacterial mass of Listeria.

**Materials and methods.** The object of the study was an experimental culture medium for Listeria cultivation. As a control, we used nutrient agar for the cultivation of microorganisms (fish meal hydrolysate, FMH-agar) and meat-peptone agar with 1 % glucose (MPA with 1 % glucose). The specific activity of nutrient media during cultivation of the test strain *Listeria monocytogenes* 766 was evaluated using a complex of microbiological methods.

**Results.** The optimal base of the nutrient medium for *Listeria* cultivation has been selected: pancreatic hydrolysate of river magpie fish (*Rutilus rutilus lacustris*) and hydrolysate of meat water production waste. The qualitative and quantitative composition of the nutrient medium has been developed, its physical, chemical and biological properties have been studied. It was found that after 24 hours of incubation at 37 °C, the nutrient medium provided the growth of typical *Listeria* colonies. The germination rate was 85 %, which is higher compared to the growth of the culture on MPA with 1 % glucose and GRM agar by an average of 21 % ( $p < 0,05$ ).

**Conclusion.** The experimental culture medium for *Listeria* cultivation provided growth of colonies of the test strain *L. monocytogenes* 766 with the preservation of characteristic cultural, morphological and biochemical properties, and, in terms of germination and growth rate, exceeded the control media. The developed nutrient medium provides effective growth of *Listeria* and can be used as a medium for the accumulation of microbial mass.

**Key words:** diagnostics, cultivation; nutrient medium; *Listeria monocytogenes*

**For citation:** Khaptanova N.M., Lukyanova S.V., Kuznetsov V.I., Gefan N.G., Andreevskaya N.M., Konovalova Zh.A., Ostyak A.S., Kosilko V.S. Designing a Nutrient Medium for the Accumulation of Microbial Mass of *Listeria*. *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(4): 60-66. doi: 10.29413/ABS.2020-5.4.8

## ВВЕДЕНИЕ

С конца XX века и по настоящий момент в России и за рубежом зарегистрированы многочисленные случаи листериоза в виде вспышек пищевой токсикоинфекции и внутрибольничных заболеваний в родильных домах, иногда с летальными исходами. Этиологическим агентом инфекции является, в большинстве случаев, *Listeria monocytogenes*. Лабораторные методы исследования играют решающую роль в диагностике листериоза [1, 2, 3]. При этом наряду с бактериологическими методами дополнительно проводят идентификацию *L. monocytogenes* путём постановки реакции агглютинации на стекле с поливалентной листериозной сывороткой. Фактором, лимитирующим диагностические возможности бактериологических лабораторий, является отсутствие коммерческих агглютинирующих листериозных сывороток [2, 4].

В Иркутском научно-исследовательском противочумном институте Роспотребнадзора разработана технология получения кроличьей высокоактивной гипериммунной листериозной сыворотки к *L. monocytogenes* для реакции агглютинации. Сыворотка агглютинирующая листериозная сухая может успешно применяться для идентификации штаммов *L. monocytogenes* в санитарной, клинической и ветеринарной микробиологии, а также при эпизоотолого-эпидемиологическом мониторинге за листериозом [5].

При производстве агглютинирующей листериозной сыворотки большое значение имеет подбор оптимальной питательной среды для культивирования и накопления бактериальной массы *L. monocytogenes*. Несмотря на то, что коммерческие питательные среды для выделения и накопления листерий, выпускаемые зарубежными фирмами, широко применяются в лабораторной диагностике листериоза, существует необходимость в разработке отечественных питательных сред с целью выполнения Постановления Правительства РФ № 813 от 26.06.2019 г. «О внесении изменений в перечень отдельных видов медицинских изделий, происходящих из иностранных государств, в отношении которых устанавливаются ограничения допуска для целей осуществления закупок для обеспечения государственных и муниципальных нужд».

Таким образом, разработка состава и технологии производства отечественных импортозамещающих питательных сред позволит удовлетворить потребности диагностических лабораторий в расходных материалах, обеспечить адекватный ответ на возникающие вызовы и новые биологические угрозы и поддержание биобезопасности государства на должном уровне [6].

В РФ производятся питательные среды для выделения и культивирования листерий, содержащие селективные добавки, поэтому актуальным направлением является конструирование питательных сред, которые будут использоваться для накопления бактериальной массы листерий и производства агглютинирующих листериозных сывороток.

В связи с этим, совершенствование технологии производства сухой питательной среды для культивирования листерий будет способствовать решению ключевых вопросов микробиологической диагностики листериоза в РФ.

На основании вышеизложенного **целью работы** является разработка эффективной питательной среды для культивирования и накопления бактериальной массы листерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве питательной основы выбран панкреатический гидролизат речной рыбы сороги байкальской (*Rutilus rutilus lacustris*) (ПГР) и гидролизат отходов производства мясной воды соответственно (ПГМ, ГОСТ 20083-74). Гидролиз проводили реакторным способом при периодическом или постоянном перемешивании и автоматической коррекции температуры [7]. Динамику процесса контролировали ежедневно, определяя методом формольного титрования в гидролизатах содержание аминного азота по МУК 4.2.2316-08 до его стабилизации в течение двух суток. Для консервации добавляли 1 % хлороформа от общего объёма гидролизата. Затем гидролизат фильтровали и высушивали. На всех этапах осуществляли физико-химический контроль промежуточного продукта.

Определение удельной ростовой активности наиболее важных компонентов питательной среды, математический расчёт оптимальной концентрации компонентов среды и коэффициентов их использования проводили с помощью экспериментально-аналитического метода балансирования состава микробиологических питательных сред [8].

В работе использовали вирулентный и эпидемически значимый тест-штамм *L. monocytogenes* 766 из коллекции музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Штамм хранился в лиофилизированном состоянии, обладал характерными для представителей соответствующего вида культурально-морфологическими и биологическими свойствами.

Определение физико-химических показателей экспериментальной питательной среды для культивиро-

вания листерий (СКЛ) и ростовых свойств в отношении тест-штамма *L. monocytogenes* 766 проводили комплексом микробиологических методов в соответствии с требованиями МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред».

Для определения ростовых свойств питательной среды в отношении тест-штамма *L. monocytogenes* 766 из 24-часовой агаровой культуры готовили взвесь, оптическая плотность которой соответствовала 10 МЕ ( $1 \times 10^9$  м. к.) по стандартному образцу мутности ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-85П соответствующего года выпуска). Из полученной суспензии готовили разведения ( $10^{-3}$ – $10^{-8}$ ) и засеивали по 0,1 мл из разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  на чашки Петри с питательной средой (в трёх повторах). Просмотр чашек с посевами проводили через 12, 24, 36 и 48 часов инкубирования при температуре  $37 \pm 1$  °С. Эффективность оценивали по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды (в млрд/мл).

В качестве контроля использовали мясоептонный агар с 1% глюкозой (МПА с 1% глюкозой, ГОСТ 10444.1, п. 5.13; pH  $7,3 \pm 0,1$ ) и питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) производства ФБУН «ГНЦ ПМБ» Россия, п. Оболенск (ГОСТ 32031–2012. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*).

Полученные результаты обрабатывали статистически стандартными методами с применением пакета программ Microsoft Excel (2007), данные выражали в виде среднего арифметического (M) и стандартного отклонения (s). Результаты считали статистически значимыми, если вероятность ошибки не превышала 0,05 ( $p < 0,05$ )

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время белковой основой преобладающей номенклатуры производимых в России сухих питательных сред служат рыбные аутолизаты и рыбные панкреатические гидролизаты [9]. В лаборатории питательных сред Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора разработана методика получения ферментативного гидролизата речной рыбы сороги байкальской (*Rutilus rutilus lacustris*). В качестве источника протеолитических ферментов использовали поджелудочную железу крупного рогатого скота при соотношении фермент-субстрат – 1:10. Ранее было показано, что питательные среды на основе панкреатического гидролизата сороги обеспечивали рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766 через 18–24 ч инкубации [10]. Анализ качественного состава органической составляющей показал, что ПГР содержит аминокислоты валин и лейцин, которые являются наиболее существенными для роста листерий [11].

Известно, что при объединении гидролизатов рыбы и отходов производства мясной воды аминокислотный состав и в качественном, и в количественном отношении взаимно дополняется. В частности, питательная основа обогащается аминокислотой аргинином, стимулирующей рост листерий [12]. Использование смеси ПГР и ПГМ позволяет устранить опалесценцию раствора. Поэтому в качестве питательной основы сухой среды для культивирования листерий взята смесь сухих ПГР и ПГМ в пропорции 11,0 к 9,0 г/л соответственно.

По данным литературы известно, что натрия хлорид является осмотическим стабилизатором, натрия карбонат

и углекислый натрий – стабилизатор pH среды, витамин В<sub>1</sub> способствует нормальному формированию колоний листерий, глюкоза служит источником углерода [13].

В качестве исходной среды использовали опытную серию СКЛ с 1 % глюкозой (ГОСТ 975-88) без добавления ПГР. Во всех вариантах питательной среды содержание хлорида натрия (3,0 г/л) и агар-агара (9,0 г/л) было аналогично исходной среде, pH среды ( $7,3 \pm 0,2$ ) обеспечили введением карбоната натрия (0,63–0,69 г/л). Затем выполняли балансирование состава среды по двум компонентам: глюкоза и витамин В<sub>1</sub>. Для этого изготовили два варианта среды с различным содержанием этих компонентов. Концентрацию (лимитирующую) одного из компонентов уменьшали в сравнении с исходной средой в 3–5 раз, концентрацию второго – увеличивали в 0,5–2 раза (табл. 1).

Таблица 1  
Состав вариантов питательной среды для культивирования листерий (г/л)

Table 1  
Composition of the growth medium for cultivation of *Listeria* (g/l)

| Компонент среды         | Варианты среды, г/л |           |           |
|-------------------------|---------------------|-----------|-----------|
|                         | исходный            | вариант 1 | вариант 2 |
| ПГР (сорога)            | –                   | 11,00     | 11,00     |
| ПГМ                     | 21,00               | 9,00      | 9,00      |
| Хлорид натрия           | 3,00                | 3,00      | 3,00      |
| Карбонат натрия         | 0,68                | 0,65      | 0,65      |
| Глюкоза                 | 10,00               | 3,30      | 2,00      |
| Витамин В <sub>1</sub>  | 0,05                | 0,025     | 0,1       |
| Агар микробиологический | 9,00                | 9,00      | 9,00      |

Расчёт удельной ростовой активности (P) глюкозы и витамина В<sub>1</sub> проводили по формуле:

$$P = X / Cл,$$

где: X – среднее количество колоний тест-штамма *L. monocytogenes* 766, выросших на одной чашке среды; Cл – концентрация лимитирующего компонента в среде (г/л). Посевная доза на чашку во всех опытах составляла 100 м. к. (табл. 2).

Расчёт концентрации компонентов сконструированной среды проводили по формуле:

$$C = Mo / P,$$

где: C – концентрация компонента в среде (г/л); Mo – максимально ожидаемое количество колоний (КОЕ/чашку); P – удельная ростовая активность компонента (КОЕ/г). Значение Mo принимали условно равным 80 колоний на чашку.

Таким образом, расчётная концентрация компонента в сконструированной среде (C) составила для глюкозы:  $Cг = 80/33,5 = 2,4$  г/л, а для витамина В<sub>1</sub> –  $Cв = 80/3040 = 0,026$  г/л.

Этап конструирования завершили расчётом эффективности использования глюкозы и витамина В<sub>1</sub> в сконструированной среде. Коэффициент использования компонентов сбалансированной и исходной среды рассчитывали по формуле:  $K = X/C$  (табл. 3).

Коэффициент использования глюкозы в сконструированной среде выше, чем в исходной среде в 7,0,

Удельная ростовая активность глюкозы и витамина B<sub>1</sub> в среде для культивирования *L. monocytogenes* 766

Таблица 2

Specific growth activity of glucose and vitamin B<sub>1</sub> in the culture medium of *L. monocytogenes* 766

Table 2

| Варианты среды | Концентрация лимитирующих компонентов (Сл) г/л |                        | Удельная ростовая активность (Р), м.к./г |                        | Предельное количество колоний на чашку (X), M ± s |
|----------------|--|------------------------|--|------------------------|---|
|                | глюкоза  | витамин B <sub>1</sub> | глюкоза                                  | витамин B <sub>1</sub> |   |
| 1              | 3,3  | 0,025                  | 23,0                                     | 3040,0                 | 74,0 ± 2,0  |
| 2              | 2,0  | 0,1                    | 33,5                                     | 670,0                  | 65,3 ± 1,5  |
| Исходный       | 10,0   | 0,05                   | 4,7                                      | 940,0                  | 45,3 ± 2,0  |

Эффективность использования глюкозы и витамина B<sub>1</sub> в питательной среде для культивирования листерий

Таблица 3

Efficiency of use glucose and vitamin B<sub>1</sub> use in the nutrient medium for *Listeria* cultivation

Table 3

| Вариант питательной среды | Коэффициент использования компонентов, (КОЕ/г) |                        | Предельное количество колоний на чашку (X) |
|---------------------------|--|------------------------|--|
|                           | глюкоза  | витамин B <sub>1</sub> |  |
| Исходный                  | 4,7  | 940,0                  | 45,3 ± 2,0                                 |
| Сконструированный         | 33,0   | 3038,0                 | 75,7 ± 2,0                                 |

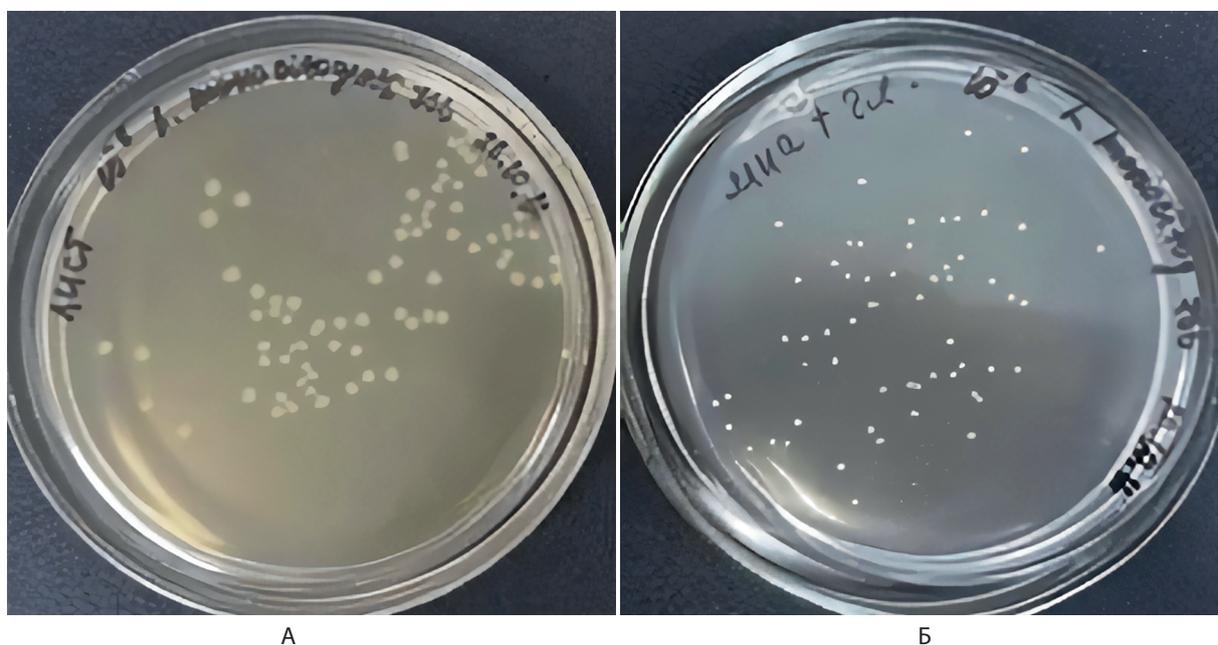


Рис. 1. Ростовые свойства *L. monocytogenes* 766 при культивировании на СКЛ (А) и МПА с 1% глюкозой (Б) через 48 часов  
 Fig. 1. Growth properties of *L. monocytogenes* 766 cultivated on the nutrient medium (A) and meat peptone agar with 1 % glucose (B) after 48 h of culturing

а витамина B<sub>1</sub> – в 3,2 раза, что сопровождается повышением предельного количества колоний тест-штамма *L. monocytogenes* 766, вырастающих на сконструированной среде по сравнению с исходной на 32 % (табл. 3).

Изучение ростовых свойств различных вариантов СКЛ осуществляли на протяжении 48 часов инкубации штамма *L. monocytogenes* 766 при температуре 37 ± 1 °С. В качестве контроля использовали среду МПА с 1% глюкозой. Показано, что после первых суток культивирования тест-штамма *L. monocytogenes* 766 на исходном варианте СКЛ и на МПА с 1% глюкозой наблюдался росинчатый рост колоний с диаметром меньше 1,0 мм. В 1-м и 2-м варианте СКЛ отмечали рост колоний достаточный для визуального подсчёта (d = 1–1,5 мм). Колонии круглые, выпуклые с ровным краем, белые с сероватым оттенком,

полупрозрачные, гладкие, структура однородная, консистенция слизистая.

Через 48 часов размер колоний тест-культуры, выращенной на экспериментальной среде всех вариантов, был в среднем в 2,7 раза больше, чем на контрольной среде (p < 0,05), что указывает на преимущество экспериментальной серии СКЛ перед средой МПА с 1% глюкозой (p < 0,05) (рис. 1).

Тест-культура *L. monocytogenes* 766, независимо от варианта питательной среды, сохраняла однородность по морфологическим и культуральным свойствам и не проявляла признаков диссоциации клеток и колоний. Наилучшие ростовые свойства отмечены на экспериментальной питательной среде 1-го варианта по сравнению со 2-м вариантом (74,0 ± 2,0 и 65,3 ± 1,5 соответственно),

что в среднем на 23 % превышало значения на исходном варианте СКЛ и контроле (МПА с 1% глюкозой) ( $p < 0,05$ ).

Результаты исследований свидетельствуют, что сбалансированная питательная среда на основе ППР сороги и ПГМ, обладала наилучшими ростовыми свойствами и выбрана нами для дальнейших экспериментов.

Питательную среду СКЛ готовили методом смешивания сухих компонентов в шаровой мельнице типа «Лабор» 2181 при скорости вращения барабана 30 об./мин. Количество полученного готового препарата 15,0 кг, что составляет 29,6 % к основному исходному сырью.

Технология приготовления питательной среды с использованием метода смешивания сухих компонентов проста экономична, вдвое снижает затраты времени, необходимые для приготовления среды по традиционной технологии, устраняет необходимость в некотором оборудовании вследствие сокращения этапов технологического процесса, что может способствовать снижению загрязнения окружающей среды парами полуфабрикатов и уменьшению аллергизации обслуживающего персонала.

В результате определения физико-химических показателей экспериментальной среды получены следующие данные: pH –  $7,3 \pm 0,2$ ; аминный азот –  $4,75 \pm 0,25$  мг/мл; прочность студня среды –  $500 \pm 50$  г; потеря в массе при высушивании не более 7 %, растворимость – 50 г среды полностью растворяется в 1 л дистиллированной воды при помешивании и кипячении в течение 3–5 мин; прозрачность и цветность – расплавленная среда прозрачна, от светло-жёлтого до светло-коричневого цвета. Допускается лёгкая опалесценция не более 5 МЕ по оптическому стандарту мутности ФГБУ «НЦЭСМП» (ОСО 42-28-86-соответствующего года выпуска). Физико-химические показатели соответствуют общепринятым требованиям к сухим питательным средам для культивирования листерий (МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред»).

Для проведения исследований навеску испытуемой питательной среды в количестве, указанном на этикетке для приготовления конкретной серии питательной среды, размешивали в 1 л дистиллированной воды, доводили до кипения при помешивании, кипятили в течение 5–7 мин, охлаждали до температуры 45–50 °С, тщательно взбалтывали и разливали в чашки Петри. Гото-

вая к употреблению среда в чашках плотная, прозрачная, светло-жёлтого цвета. Среда, разлитая в стерильные флаконы, может храниться в тёмном месте не более 7 суток при температуре 2–8 °С.

Ростовые свойства сконструированной питательной среды для культивирования листерий изучали в сравнении с МПА с 1% глюкозой и ГРМ-агаром (контроли). Данные таблицы 4 свидетельствуют о высоких ростовых свойствах экспериментальной питательной среды, обеспечивающей рост тест-штамма *L. monocytogenes* 766 с типичной морфологией колоний при посеве единичных клеток возбудителя.

Как видно из данных таблицы 4, экспериментальная среда СКЛ не уступала контрольной среде ГРМ-агар, не содержащей ростовых добавок, по количеству колоний, выросших на чашке через  $22 \pm 2$  ч инкубации посевов, а также обладала высокой чувствительностью ( $10^{-7}$ ), поскольку позволяла обнаружить рост колоний при посеве единичных микробных клеток. При посеве культуры *L. monocytogenes* 766 из разведения  $10^{-7}$  на всех засеянных чашках через  $22 \pm 2$  ч инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °С выросло более  $8,0 \pm 0,5$  колоний, из разведения  $10^{-6}$  м. к. – выросло в среднем  $83,0 \pm 2,6$  бесцветных, прозрачных, круглых колоний. При определении морфологии листерий в мазках отмечались типичные характерные мелкие грамположительные палочки.

Через 48 часов инкубации диаметр колоний достигал 3,5–4,0 мм. Показатель прорастания колоний, выросших из разведения  $10^{-6}$  м. к., составлял 85 %, что выше по сравнению с ростом культуры на МПА с 1% глюкозой и ГРМ-агаром в среднем на 21 % ( $p < 0,05$ ).

Показано, что эффективность испытуемой питательной среды была выше по сравнению с МПА с 1% глюкозой и ГРМ-агаром в 1,3 и 2,2 раза соответственно ( $p < 0,05$ ) и составляла 5,5 млрд м.к./мл питательной среды.

При изучении культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766, выращенного на сконструированной питательной среде для культивирования листерий, получены следующие результаты: рост на МПА с 1% глюкозой – колонии круглые, мелкие полупрозрачные с чётко очерченным гладким краем, рост на сахарном бульоне – равномерное помутнение без плёнки. При микроскопии мазка – кокковидные грамположительные

Ростовые свойства питательной среды для культивирования *L. monocytogenes* 766

Таблица 4

Table 4

Growth properties of a growth medium for *L. monocytogenes* 766 cultivation

| Питательная среда | Скорость роста, ч | Показатель прорастания колоний, выросших из $10^{-6}$ м.к., % | Чувствительность (выросло колоний из $10^{-7}$ м.к.), КОЕ |
|-------------------|-------------------|---|---|
| СКЛ               | 24                | $83,0 \pm 2,6^*$<br>d = 1,0–1,5                               | $8,0 \pm 0,5^*$<br>d = 2,0–2,5                            |
|                   | 48                | $86,0 \pm 1,5^*$<br>d = 2,0                                   | $8,5 \pm 0,5^*$<br>d = 3,5–4,0*                           |
| ГРМ-агар          | 24                | $65,0 \pm 1,5$<br>d = 1,0–1,5                                 | $6,0 \pm 0,5$<br>d = 2,0–2,5                              |
|                   | 48                | $66,0 \pm 1,5$<br>d = 2,0–2,5                                 | $6,0 \pm 0,5$<br>d = 2,5–3,0                              |
| МПА с 1% глюкозой | 24                | d < 1,0   | d < 1,0   |
|                   | 48                | $49,0 \pm 1,5$<br>d = 1,0                                     | $4,5 \pm 0,5$<br>d = 1,0                                  |

Примечание. d – диаметр колоний, мм; \* –  $p < 0,05$  при сравнении с показателем в контроле.

палочки, образующие небольшие цепочки (3–5 клеток). Тест-штамм *L. monocytogenes* 766 сохранял свои типичные биохимические свойства по способности ферментировать маннозу, мальтозу, глюкозу, ксилозу и отсутствию способности ферментировать манит и дульцит, положительный каталазный тест. Культура *L. monocytogenes* 766, выращенная на СКЛ, дала положительную реакцию агглютинации с листериозной сывороткой, так как она обладала всеми типичными для листерий свойствами.

Полученные данные подтвердили типичность культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766, выращенного на экспериментальной питательной среде, который в последующих этапах работы использовался в качестве антигена для иммунизации животных-продуцентов при производстве листериозной сыворотки.

Таким образом, высокие ростовые показатели предлагаемой среды достигнуты за счёт сочетанного использования оптимальных концентраций питательной основы и компонентов, стимулирующих рост листерий, что в совокупности обеспечивает в минимальные сроки значительное накопление бактериальной массы листерий. Ферментативный гидролизат из соргоги содержит набор аминокислот, в том числе незаменимых, не уступая по этому показателю мясопептонному бульону и питательному бульону на основе панкреатического гидролизата рыбной муки.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальная питательная среда для культивирования листерий отвечает требованиям, предъявляемым к питательным средам для культивирования *L. monocytogenes* и имеет преимущество по чувствительности и скорости роста в сравнении с МПА с 1% глюкозой и ГРМ-агаром, обеспечивает типичный рост тест-культуры *L. monocytogenes* 766. Сконструированная питательная среда предназначена для выращивания и накопления биомассы листерий.

Таким образом, питательная среда для культивирования листерий может успешно использоваться в производстве листериозной сыворотки для получения бактериальной массы с последующей иммунизацией животных антигенами листерий.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Мусаева А.К., Егорова Н.Н., Даугалиева А.Т., Кожбаев М.К., Досанова А.К. Диагностика листериоза животных и биологические свойства листерий. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016; (3-3): 483-489.
2. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. *Клиническая микробиология антимикробная химиотерапия*. 2000; 2(2): 20-30.
3. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*. 2007; 9(10): 1236-1243. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
4. Хаптанова Н.М., Андреевская Н.М., Лукьянова С.В., Коновалова Ж.А., Гефан Н.Г., Остяк А.С., и др. Особенности серологической диагностики листериоза (обзор литературы). *Acta Biomedica Scientifica*. 2019; 4(1): 43-49. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.7

5. Андреевская Н.М., Михайлова В.А., Токмакова Е.Г., Хаптанова Н.М., Остяк А.С., Уланская А.В., и др. Изучение и подбор антигенных и контрольных штаммов *Listeria monocytogenes* для производства листериозной сыворотки. В: Куличенко А.Н. (ред.) *Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: Материалы III Всероссийской научно-практической конференции, Ставрополь, 24–25 апреля 2019 г.* Ставрополь; 2019. 258.

6. Шепелин А.П. Современное состояние и направления развития производства питательных сред в России. *Современная лабораторная диагностика*. 2015; (2): 18-20.

7. Дятлов И.А., Кутырев В.В., Храмов М.В. *Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы*. М.; 2012.

8. Иванова Л.Г., Шмелева Е.И., Трифонов В.И., и др. *Методические рекомендации по балансированию состава микробиологических питательных сред*. М.; 1987.

9. Меджидов М. *Справочник по микробиологическим питательным средам*. М.: Медицина; 2003.

10. Татарникова О.Г., Кузнецов В.И., Маевский М.П., Каретникова Э.С., Гефан Н.Г., Липаева Л.С., и др. Оценка возможности использования гидролизата речной рыбы при конструировании среды для выделения листерий. *Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера, Новосибирск, 27–29 сентября 2006*. Новосибирск; 2006. 219.

11. Остяк А.С., Ушаков И.А., Хаптанова Н.М., Гефан Н.Г., Кузнецов В.И., Оборина Е.Н., и др. Сравнительный анализ состава питательных основ методом спектроскопии ЯМР. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019; 9(3): 430-438. doi: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-430-438

12. Siddiqi R. Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl Bakteriol*. 1989; 271(2): 146-152. doi: 10.1016/s0934-8840(89)80067-2

13. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. *Питательные среды для медицинской микробиологии*. СПб.; 2003.

#### REFERENCES

1. Musaeva AK, Egorova NN, Daugalieva AT, Kozhabaev MK, Dosanova AK. Diagnosis of animal listeriosis and biological properties of listeria. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2016; (3-3): 483-489. (In Russ.)
2. Tartakovskij IS. Listeria: role in human infectious pathology and laboratory diagnostics. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2000; 2(2): 20-30. (In Russ.)
3. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*. 2007; 9(10): 1236-1243. doi: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
4. Khaptanova NM, Andreevskaya NM, Lukyanova SV, Konovalova ZhA, Gefan NG, Ostyak AS, et al. Aspects of serological diagnostics of listeriosis (overview). *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(1): 43-49. doi: 10.29413/ABS.2019-4.1.7 (In Russ.)
5. Andreevskaya NM, Mikhailova VA, Tokmakov EG, Haptanov NM, Ostyak AS, Ulanskaya AV, et al. Study and selection of antigenic and control strains of *Listeria monocytogenes* for production of listeriosis serum. In: Kulichenko AN (ed.) *Urgent problems of zoonotic infectious diseases: Materials of the III All-Russian Scientific and Practical Conference, April 24-25, 2019, Stavropol*. Stavropol; 2019. 258. (In Russ.)
6. Shepelin AP. Modern state and development of production of industrial media in Russia. *Sorennaya laboratornaya diagnostika*. 2015; (2): 18-20. (In Russ.)
7. Dyatlov IA, Kutyrev VV, Khramov MV. *Growth media for the isolation, cultivation, and identification of pathogens of extremely dangerous bacterial infections*. Moscow, 2012. (In Russ.)
8. Ivanova LG, Shmeleva EI, Trifonov VI, et al. *Methodological recommendations for balancing the composition of microbiological nutrient media*. Moscow; 1987. (In Russ.)
9. Medzhidov M. *Handbook of microbiological growth media*. Moscow: Meditsina; 2003. (In Russ.)

10. Tatarnikova OG, Kuznetsov VI, Maevskii MP, Karetnikova ES, Gefan NG, Lipaeva LS, et al. Evaluation of the possibility of using freshwater fish hydrolyzate in constructing the growth medium for listeria isolation. *All-Russian Conference Problems of infectious pathology in regions of Siberia, the Far East and the Far North, September 27-29, 2006, Novosibirsk*. Novosibirsk; 2006. 219. (In Russ.)

11. Ostyak AS, Ushakov IA, Khaptanova NM, Gefan NG, Kuznetsov VI, Oborina EN, et al. Comparative analysis of base

nutrient composition by NMR spectroscopy. *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2019; 9(3): 430-438. doi: 10.21285/2227-2925-2019-9-3-430-438 (In Russ.)

12. Siddiqi R. Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes*. *Zentralbl Bakteriol*. 1989; 271(2): 146-152. doi: 10.1016/s0934-8840(89)80067-2

13. Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. *Growth media for medical microbiology*. St. Petersburg; 2003. (In Russ.)

#### Сведения об авторах

**Хаптанова Наталья Маркеловна** – младший научный сотрудник лаборатории питательных сред, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: khaptanchik@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8520-4720>

**Лукьянова Светлана Владимировна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории питательных сред, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: svetlulukyan@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3687-1273>

**Кузнецов Владимир Ильич** – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией питательных сред, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2089-1771>

**Гефан Наталья Геннадьевна** – кандидат медицинских наук, заведующая отделом биологического и технологического, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9425-2273>

**Андреевская Нина Михайловна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-производственного отдела, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8051-1809>

**Коновалова Жанна Анатольевна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела обеспечения качества, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: konovalova-shanna@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4217-9171>

**Остяк Александр Сергеевич** – научный сотрудник отдела биологического и технологического контроля, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9391-6779>

**Косилко Варвара Сергеевна** – врач-бактериолог лаборатории питательных сред, ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7869-0940>

#### Information about the authors

**Natalya M. Khaptanova** – Junior Research Officer at the Laboratory of Cultural Medium, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, e-mail: Khaptnat@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0001-8520-4720>

**Svetlana V. Lukyanova** – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Cultural Medium, Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор, e-mail: svetlulukyan@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0003-3687-1273>

**Vladimir I. Kuznetsov** – Cand. Sc. (Biol.), Head of the Laboratory of Cultural Medium, Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0003-2089-1771>

**Natalya G. Gefan** – Cand. Sc. (Med.), Head of the Department of Biological and Technological Control, Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9425-2273>

**Nina M. Andreevskaya** – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Research and Production Department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8051-1809>

**Zhanna A. Konovalova** – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Quality Assurance Department, Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rosпотребнадзор, e-mail: konovalova-shanna@mail.ru, <http://orcid.org/0000-0002-4217-9171>

**Aleksandr S. Ostyak** – Research Officer at the Department of Biological and Technological Control, Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0001-9391-6779>

**Varvara S. Kosilko** – Bacteriologist of the Laboratory of Cultural Medium, Irkutsk Antiplague Research Institute of Rosпотребнадзор of Rosпотребнадзор, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru, <http://orcid.org/0000-0002-7869-0940>

#### Вклад авторов

Хаптанова Н.М. – проведение эксперимента, учёт и анализ результатов.

Лукьянова С.В. – анализ результатов, написание статьи, оформление документов для публикации статьи.

Кузнецов В.И. – планирование эксперимента, написание статьи.

Гефан Н.Г. – проведение эксперимента, анализ полученных результатов.

Андреевская Н.М. – планирование научно-исследовательской работы.

Коновалова Ж.А. – анализ результатов, написание аннотации статьи.

Остяк А.С. – анализ полученных результатов, написание статьи.

Косилко В.С. – получение гидролизатов, приготовление питательных сред.

Статья получена: 13.05.2020. Статья принята: 30.07.2020. Статья опубликована: 26.08.2020.

Received: 13.05.2020. Accepted: 30.07.2020. Published: 26.08.2020.