

ПОДБОР СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ УСЛОВНО ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ (*S. AUREUS*, *K. PNEUMONIAE*, *E. COLI* И *P. VULGARIS*) И ВЫДЕЛЕНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ МЕМБРАННЫМИ МЕТОДАМИ

А.В. Солдатенкова, С.А. Лазарев, А.А. Калошин, Н.А. Михайлова

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, Россия

Настоящая работа является частью проекта по созданию лекарственного средства на основе комплекса антигенов штаммов условно патогенных бактерий (*S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. vulgaris*), предназначенного для стимуляции врожденного иммунитета с целью профилактики бактериальных и вирусных инфекций.

Задачами проведенных исследований явился подбор питательной среды универсальной для получения биомассы бактерий *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris* и *S. aureus*, а также отработка метода выделения их протективных антигенов мембранными методами.

Оценку эффективности сред выращивания проводили по накоплению биомассы в стационарной фазе роста культур, рассчитывая выход микробных клеток с 1 мл питательной среды (млрд/мл).

Предварительно экспериментальные питательные среды были охарактеризованы на приборе Multiscan ascent, оснащенный программным обеспечением «Микроб-Автомат».

Апробировано 22 состава питательных среды в том числе синтетические и полусинтетические, в которых варьировали солевые составы, содержание сахаров от 1 до 20 г./л (глюкозы или сахарозы) и дрожжевого экстракта от 1 до 3 г/л. В результате подобрана питательная среда универсальная для культивирования *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. vulgaris* и *S. aureus*, обеспечивающая накопление микробной массы.

На данной среде проведено культивирование микроорганизмов в ферментере ФА 10 («Проинтех»), контролируя скорости подачи воздуха и перемешивания, рН, концентрацию микробных клеток.

Выращенную микробную массу отделяли центрифугированием, осадок разводили в дистиллированной воде и инактивировали гидроксиламином. На следующем этапе удаляли инактивированные бактериальных клетки и другие нерастворимые компоненты центрифугированием или микрофильтрацией в капсульных фильтрах. Очистку от гидроксиламина проводили диализом или с использованием тангциальной ультрафильтрации. Отработку условий тангциальной фильтрации осуществляли на различных мембранах (полипропиленовые, полиэфирсульфоновые и нитроцеллюлозные мембраны) с диаметром пор 5 или 10 кДа. При этом использовали установки фирм Sartorius, Cobetter и Millipore. После очистки, образцы антигенов лиофильно высушивали и определяли остаточное содержание гидроксиламина и специфическую активность в реакции торможения гемагглютинации со специфическими сыворотками.

На основании проведенных экспериментов выявлено, что наиболее технологичным способом очистки антигенов *K. pneumoniae*, *E. coli* и *P. vulgaris* от гидроксиламина является удаление микробных клеток микрофильтрацией с последующей тангциальной ультрафильтрацией с использованием мембран с диаметром пор 10 кДа.

Настоящая работа выполнена в рамках соглашения с Министерством промышленности и торговли РФ о предоставлении грантов в форме субсидий из федерального бюджета бюджетным учреждениям на реализацию проектов по разработке лекарственных препаратов и медицинских изделий № 020–15–2021–005 от 07.10.2021 г.