

ВЛИЯНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ДОБАВОК НА РОСТОВЫЕ СВОЙСТВА СУСЛО-АГАРА ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ ДЕРМАТОФИТОВ

Ю.А. Костыркин *, О.В. Лысинская, Ю.В. Никитин, В.В. Шаповал

ООО Фирма «БиоХимФарм», г. Владимир, Россия

* ignatosyanag@gmail.com

Аннотация. Дерматофиты рода *Trichophyton*, в первую очередь *Trichophyton verrucosum*, являются основными возбудителями трихофитии крупного рогатого скота. Культивирование этих микроорганизмов на твердых питательных средах сопряжено с рядом трудностей: большинство штаммов *T. verrucosum* обладают строгими ростовыми потребностями в витаминах, их рост часто контаминируется сопутствующей бактериальной микрофлорой, а продуктивность по биомассе и спорам на стандартных средах остается недостаточной для промышленного производства вакцин. В связи с этим актуальной задачей является оптимизация состава базовой среды сусло-агара путем введения специфических добавок, улучшающих ростовые свойства.

Цель работы – оценить влияние глицерина, инозитола, L-гистидина и хлорамфеникола на ростовые свойства сусло-агара при культивировании производственных штаммов *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes*.

Материалы и методы. Базовой средой служил стандартный сусло-агар. В опытные образцы вводили глицерин (0,5-2,5%), инозитол (0,005-0,1%), L-гистидин (0,005-0,2 г/л) и хлорамфеникол (0,01-0,05 г/л). Ростовые свойства оценивали по линейной скорости роста, интенсивности спорообразования и продуктивности мицелия.

Результаты. Глицерин в концентрации 1,5-2,0% увеличивал линейную скорость роста *T. verrucosum* №123 на 28,3%, а продуктивность мицелия – на 25,6% по сравнению с контролем. Инозитол в концентрации 0,02-0,03% повышал число микроконидий с 45,2 до 73,0 млн/см³. L-гистидин в концентрации 0,02-0,04 г/л оказывал умеренное стимулирующее действие на рост *T. mentagrophytes*. Хлорамфеникол в концентрации 0,025 г/л полностью подавлял видимый рост бактериальной контаминирующей микрофлоры без угнетения дерматофитов. Комплексное использование добавок повышало суммарный выход микроконидий на 53,4% по сравнению со стандартным сусло-агаром.

Заключение. Введение в состав сусло-агара глицерина (1,5-2,0% для *T. Verrucosum* и 2,0-2,5% для *T. mentagrophytes*), инозитола (0,02-0,03%), L-гистидина (0,02-0,04 г/л) и хлорамфеникола (0,025 г/л) позволяет существенно улучшить ростовые свойства питательной среды, повышая продуктивность производственных культур дерматофитов и обеспечивая надежную защиту от бактериальной контаминации.

Ключевые слова: *Trichophyton verrucosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, глицерин, инозитол, L-гистидин, хлорамфеникол, культивирование.

Введение. Дерматофитозы (трихофития, стригущий лишай) представляют собой одну из наиболее распространенных групп инфекционных заболеваний крупного рогатого скота, наносящих значительный экономический ущерб животноводству. Основным возбудителем трихофитии у крупного рогатого скота является гриб *Trichophyton verrucosum*, который также может поражать лошадей, овец, коз, свиней, собак, кошек, грызунов и человека. В ветеринарной практике наряду с *T. verrucosum* значительную роль играет *Trichophyton mentagrophytes*, также вызывающий дерматофитозы у различных видов животных.

Эффективная профилактика и терапия трихофитии осуществляется с использованием специфических вакцинных препаратов. В Российской Федерации и других странах широкое применение находит вакцина ТВМ (производство ООО Фирма «БиоХимФарм», регистрационное удостоверение № 899 QF от 13.12.2019, Монголия) [12], предназначенная для профилактики и терапии трихофитии парнокопытных (крупного и мелкого рогатого скота, буйволов, зебу и оленей). Данный препарат представляет собой суспензию, изготовленную из производственных аттенуированных штаммов *Trichophyton verrucosum* № 123 и *Trichophyton mentagrophytes* № 244, поддерживаемых на предприятии-изготовителе. Технологический процесс производства вакцины включает этапы культивирования указанных штаммов на твердой питательной среде (сусло-агаре) с последующей инактивацией и расфасовкой.

Ключевым этапом, определяющим качество и эффективность конечного продукта, является культивирование производственных штаммов дерматофитов. Стандартная питательная среда – сусло-агар – не всегда обеспечивает оптимальные условия для роста и спорообразования этих микроорганизмов [2, 3]. В связи с этим возникает необходимость в оптимизации состава базовой среды путем введения специфических добавок, способных стимулировать ростовые процессы, повышать продуктивность культур по выходу биомассы и спор, а также предотвращать контаминацию посторонней микрофлорой.

Известно, что *T. verrucosum* является ауксотрофным микроорганизмом с выраженными потребностями в витаминах. Все штаммы *T. verrucosum* нуждаются в тиамине для своего роста, причем примерно 80% штаммов требуют одновременно тиамина и инозитола [4-7]. Данная особенность делает изучение влияния инозитола на ростовые свойства питательной среды особенно актуальным. Кроме того, в микологических питательных средах в качестве дополнительного источника углерода, способствующего повышению продуктивности мицелиальных грибов, широко используется глицерин. Некоторые исследования показывают, что аминокислоты, включая L-гистидин, также могут оказывать влияние на рост дерматофитов. Кроме этого, проблема бактериальной контаминации при длительном культивировании дерматофитов решается путем введения в состав среды антибиотиков, среди которых наиболее эффективным является хлорамфеникол [8-10].

Цель настоящей работы – оценить влияние глицерина, инозитола, L-гистидина и хлорамфеникола на ростовые свойства сусло-агара при культивировании производственных штаммов *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes* для оптимизации технологического процесса получения вакцинного сырья.

Обзор литературы. 1. Биологические особенности *Trichophyton verrucosum* и *Trichophyton mentagrophytes*. Дерматофиты представляют собой группу патогенных грибов, объединяемых под общим названием дерматофиты, которые поражают кератинизированные ткани животных и человека. *Trichophyton verrucosum* является типичным представителем зоофильных дерматофитов, основным резервуаром которого служит крупный рогатый скот. Этот гриб характеризуется медленным ростом по сравнению с другими дерматофитами. Культуральные особенности включают образование плоских, белых или кремовых колоний с возможным пуговчатым возвышением в центре, с выраженной зональностью роста.

Trichophyton mentagrophytes отличается более быстрым ростом и способностью поражать более широкий круг хозяев. Культуральные свойства включают образование плоских, мучнистых, кремовых колоний с радиальной исчерченностью. Оба вида обладают способностью продуцировать ферменты, участвующие в деградации кератина, что обеспечивает их патогенность.

2. Питательные потребности дерматофитов. *Trichophyton verrucosum* является ауксотрофом с выраженными потребностями в витаминах. Исследования показали отсутствие роста на бескаротиновой среде без добавок, минимальный субмерный рост при добавлении инозитола и хороший рост только при совместном добавлении инозитола и тиамина [4-7]. Это подтверждает, что *T. verrucosum* является ауксотрофным по отношению к инозиту и тиамину.

Витаминные потребности видов рода *Trichophyton* различны. *T. mentagrophytes*, напротив, является менее требовательным и способен расти на синтетических средах с минеральными источниками азота и углеводов [6-7].

3. Роль глицерина как источника углерода

Глицерин представляет собой многоатомный спирт, который может служить альтернативным источником углерода для многих микроорганизмов. В биосинтезе грибов глицерин участвует в процессах центрального углеродного метаболизма и катаболизма глицерина, связанных с метаболизмом активных форм кислорода и построением клеточной стенки.

Исследования показывают, что дерматофиты способны использовать глицерин в качестве источника углерода, хотя их липолитическая активность часто ограничена. Глицерин входит в состав многих стандартных питательных сред для дерматофитов, таких как мясопептонно-глицериновый агар (МПА) [2, 3, 11, 12].

4. Биологическая роль инозитола

Инозитол (мио-инозитол) представляет собой циклический шестиатомный спирт, который является важным ростовым фактором для многих микроорганизмов. Инозитол играет ключевую роль в клеточном морфогенезе и цитогенезе, липидном синтезе, структуре клеточных мембран и клеточном росте. Для ауксотрофных штаммов *T. verrucosum* наличие инозитола в среде является критическим фактором для нормального спорогенеза [4,7]. Некоторые исследования показывают, что инозитол может влиять на процессы спорогенеза у дрожжей, причем выявлены две фазы потребности в инозите, совпадающие с фазами синтеза липидов.

5. Влияние аминокислот на рост дерматофитов. Влияние аминокислот на рост дерматофитов варьирует в зависимости от вида и концентрации. Некоторые аминокислоты могут стимулировать рост, тогда как другие могут ингибировать его в определенных концентрациях. Исследования показали, что L-гистидин может снижать рост *T. mentagrophytes* в определенных концентрациях, однако в низких концентрациях некоторые аминокислоты стимулируют рост.

Для многих дерматофитов характерна аминокислотная или белковая зависимость роста – добавление аминокислот значительно ускоряет рост по сравнению с базовыми средами. Некоторые исследования выявили, что гистидин может служить фактором роста для трихофитонов группы *rosaceum* [6, 7, 11, 12].

6. Антибиотики в микологических средах. Хлорамфеникол – антибиотик широкого спектра действия с бактериостатическим механизмом действия (связывание с 50S субъединицей бактериальной рибосомы, подавление синтеза белка). Добавление хлорамфеникола в агар Сабуро широко используется для ингибирования бактериальной контаминации при выделении дерматофитов [8-10].

Однако некоторые исследования указывают, что хлорамфеникол может частично ингибировать рост некоторых патогенных грибов. Поэтому важен подбор оптимальной концентрации для максимального ингибирования бактерий с минимальным влиянием на рост дерматофитов. Обычно используются концентрации 0,05 г/л, но существуют данные об эффективности более низких концентраций [9].

7. Оптимизация питательных сред для дерматофитов. Разработка оптимизированных питательных сред для культивирования дерматофитов является актуальной задачей ветеринарной биотехнологии. Исследования показали, что добавление стимуляторов роста (0,03% стимулонга) может повысить мицелиообразование на 19,6–22,4% и спорогенез на 19,6–24,7% [2, 3, 11, 12]. Комплексное использование различных добавок может дать синергический эффект, повышающий суммарный выход биомассы и спор.

Материалы и методы. Объекты исследования. Объектами исследования служили производственные штаммы дерматофитов:

Trichophyton verrucosum № 123 – производственный штамм, используемый при изготовлении вакцины против трихофитии крупного рогатого скота (RCAM04479);

Trichophyton mentagrophytes № 244 – производственный штамм из коллекции ООО Фирма «БиоХимФарм» (RCAM04477).

Оба штамма относятся к III-IV группам патогенности микроорганизмов и поддерживаются в коллекции предприятия-изготовителя.

Базовые питательные среды. В качестве базовой питательной среды использовали стандартный сусло-агар, приготовленный согласно действующей нормативной документации. Солодовое неохмеленное сусло разбавляли в два раза дистиллированной водой до 7° содержания сахаров по Баллингу, устанавливали pH до 8,0-8,2 добавлением 10% NaOH и вносили 2% агара. Выбор pH 8,0-8,2 обусловлен необходимостью подавления роста сопутствующей бактериальной микрофлоры; для дерматофитов допустим диапазон pH 6,5-8,5 [3, 12]. Среду стерилизовали автоклавированием при 121 °C (0,1 МПа) в течение 20 минут.

Исследуемые добавки. В опытные образцы сусло-агара вводили следующие добавки:

-глицерин (ГОСТ 6824-96, х.ч.) в концентрациях 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5% от объема среды (до 100 мл/л);

-инозитол (мио-инозитол, Sigma-Aldrich, ≥99%) в концентрациях 0,005%; 0,01%; 0,02%; 0,03%; 0,05%; 0,1% от массы среды (до 0,5 г/л);

-L-гистидин (Sigma-Aldrich, ≥98%) в концентрациях 0,005; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,15; 0,2 г/л;

-хлорамфеникол (левомецетин, активность 975-1020 мкг/мг, ФС.2.1.0207.18) в концентрациях 0,01 г/л; 0,025 г/л; 0,05 г/л (до 0,05 г/л).

Комплексное влияние добавок изучали при их совместном внесении в оптимально подобранных концентрациях. В качестве контрольного образца использовали сусло-агар без добавок.

Условия культивирования. Посев штаммов производили путем укола в центр чашки Петри с последующей инкубацией при температуре 28±1°C в течение 14-21 суток. Для оценки витальных потребностей штаммов и влияния добавок дополнительно использовали агар Сабуро и картофельный агар.

Оценка ростовых свойств. Оценку ростовых свойств питательных сред проводили по следующим показателям.

1. Линейная скорость роста ($V_{\text{лин}}$, мм/сут): ежедневное измерение диаметра колоний с третьих по четырнадцатые сутки культивирования, расчет среднего суточного прироста;

2. Интенсивность спорообразования ($N_{\text{спор}}$, млн/см³): подсчет числа микроконидий в камере Горяева в трехкратной повторности;

3. Продуктивность мицелия ($M_{\text{сух}}$, г/л): гравиметрическое определение массы сухого вещества мицелия после высушивания до постоянной массы;

4. Индекс спорообразования (ИС): отношение числа микроконидий в опытном варианте к контролю, выраженное в процентах.

Бактериологический контроль чистоты культуры проводили путем посева на мясопептонный агар (МПА) и в мясопептонный бульон (МПБ) с последующей инкубацией при 37°C в течение 48 часов.

Статистическая обработка. Экспериментальные данные обрабатывали с использованием методов вариационной статистики. Нормальность распределения проверяли по критерию Шапиро-Уилка. При множественных сравнениях опытных групп с одним контролем применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с поправкой Даннетта. Для каждого показателя рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Каждый эксперимент проводили в трехкратной повторности ($n = 3$).

Результаты. 1. Влияние глицерина на рост и продуктивность дерматофитов.

Проведенные исследования показали, что добавление глицерина в состав сусло-агара оказывает дозозависимое влияние на ростовые свойства питательной среды. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Влияние различных концентраций глицерина на ростовые показатели *T. verrucosum* № 123

Концентрация глицерина, %	Линейная скорость роста, мм/сут	Продуктивность мицелия, г/л	Индекс спорообразования, %
0 (контроль)	2,18 ± 0,09	5,12 ± 0,21	100,0
0,5	2,24 ± 0,11	5,28 ± 0,19	104,6
1,0	2,46 ± 0,08*	5,74 ± 0,18*	115,2
1,5	2,78 ± 0,10*	6,43 ± 0,22*	128,7
2,0	2,80 ± 0,12*	6,51 ± 0,20*	130,4
2,5	2,71 ± 0,09*	6,28 ± 0,23*	122,8

*Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Как следует из представленных данных (таблицы 1 и 2; рисунки 1-3), глицерин в концентрации 1,5-2,0% оказывает максимальное стимулирующее действие на *T. verrucosum*. Линейная скорость роста увеличилась на 27,5-28,4%, продуктивность мицелия – на 25,6-27,1%, индекс спорообразования – на 28,7-30,4%. Дальнейшее повышение концентрации глицерина до 2,5% приводило к незначительному снижению ростовых показателей.

Для *T. mentagrophytes* №244 оптимальная концентрация глицерина оказалась несколько выше – 2,0-2,5% (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние различных концентраций глицерина на ростовые показатели *T. mentagrophytes* № 244

Концентрация глицерина, %	Линейная скорость роста, мм/сут	Продуктивность мицелия, г/л	Индекс спорообразования, %
0,0 (контроль)	2,95 ± 0,12	4,86 ± 0,19	100,0
1,0	3,18 ± 0,10	5,23 ± 0,17	108,9
1,5	3,46 ± 0,11*	5,68 ± 0,20*	119,5
2,0	3,72 ± 0,13*	6,21 ± 0,22*	132,6
2,5	3,78 ± 0,14*	6,34 ± 0,24*	135,2
3,0	3,58 ± 0,12*	6,02 ± 0,21*	124,8

*Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

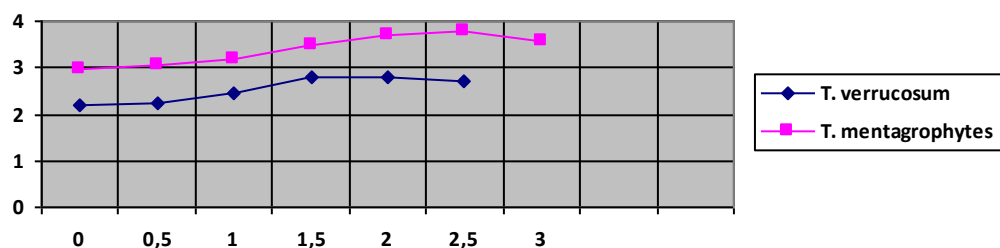


Рисунок.1 – Зависимость линейной скорости роста (мм/сут) *T. verrucosum* от концентрации глицерина

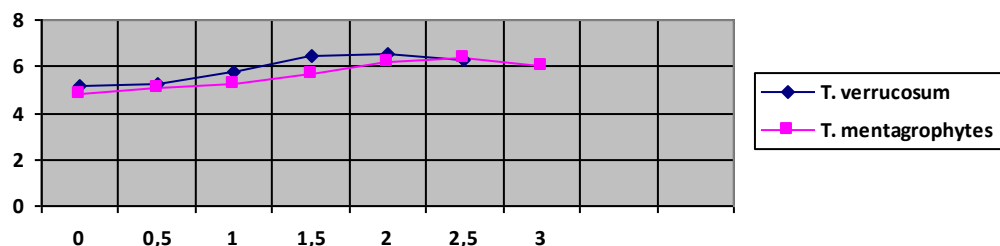


Рисунок 2 – Зависимость продуктивности мицелия (г/л) *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* от концентрации глицерина

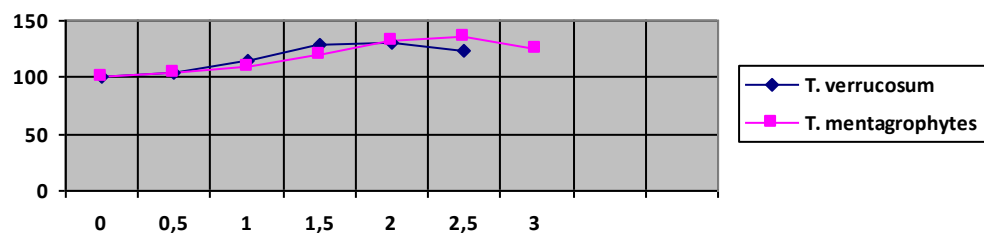


Рисунок 3 – Зависимость индекса спорообразования (%) *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* от концентрации глицерина

Выявленные межвидовые различия, по-видимому, связаны с особенностями углеводного метаболизма каждого из видов дерматофитов [2, 3, 11].

2. Влияние инозитола на ростовые свойства питательной среды. Инозитол является критическим ростовым фактором для многих штаммов *T. verrucosum* [4,7]. Результаты исследования представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Влияние различных концентраций инозитола на ростовые показатели *T. verrucosum* № 123

Концентрация инозитола, %	Линейная скорость роста, мм/сут	Число микроконидий, млн/см ³	Индекс спорообразования, %
0,0 (контроль)	2,18 ± 0,09	45,2 ± 2,8	100,0
0,005	2,21 ± 0,10	47,5 ± 3,1	105,1
0,01	2,32 ± 0,08	55,8 ± 2,9*	123,5
0,02	2,45 ± 0,09*	68,4 ± 3,2*	151,3
0,03	2,48 ± 0,10*	73,0 ± 3,4*	161,5
0,05	2,46 ± 0,11*	70,2 ± 3,3*	155,3
0,10	2,38 ± 0,09	62,5 ± 3,0*	138,3

*Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Анализ полученных данных показывает, что инозитол оказывает более выраженное влияние на спорообразование, чем на вегетативный рост. Максимальные значения зафиксированы при 0,03%: число микроконидий увеличилось на 61,5% (с 45,2 до 73,0 млн/см³).

Для *T. mentagrophytes* № 244 влияние инозитола было мало выраженным, что согласуется с литературными данными [4,5,6].

3. Влияние L-гистидина на рост дерматофитов. Влияние L-гистидина на ростовые свойства изучали в широком диапазоне концентраций (0,005-0,2 г/л). Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние различных концентраций L-гистидина на ростовые показатели дерматофитов

Концентрация L-гистидина, г/л	<i>T. verrucosum</i> № 123	<i>T. mentagrophytes</i> № 244
Линейная скорость роста, мм/сут:		
0,00 (контроль)	2,18 ± 0,09	2,95 ± 0,12
0,005	2,20 ± 0,08	2,98 ± 0,11
0,01	2,24 ± 0,10	3,05 ± 0,13
0,02	2,30 ± 0,09	3,18 ± 0,12*
0,04	2,33 ± 0,11	3,22 ± 0,14*
0,08	2,28 ± 0,10	3,15 ± 0,11*
0,10	2,21 ± 0,09	3,08 ± 0,13
0,15	2,14 ± 0,10	2,96 ± 0,12
0,20	2,09 ± 0,08*	2,88 ± 0,11
Число микроконидий, млн/см ³ :		
0,00 (контроль)	45,2 ± 2,8	38,6 ± 2,5
0,005	46,1 ± 2,9	39,2 ± 2,6
0,01	48,4 ± 3,1	41,5 ± 2,8
0,02	52,6 ± 3,3*	46,8 ± 3,0*
0,04	53,8 ± 3,4*	48,2 ± 3,1*
0,08	51,2 ± 3,2*	46,1 ± 2,9*
0,10	48,5 ± 3,0	43,4 ± 2,8
0,15	45,8 ± 2,9	40,2 ± 2,6
0,20	43,1 ± 2,7	37,5 ± 2,4

*Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

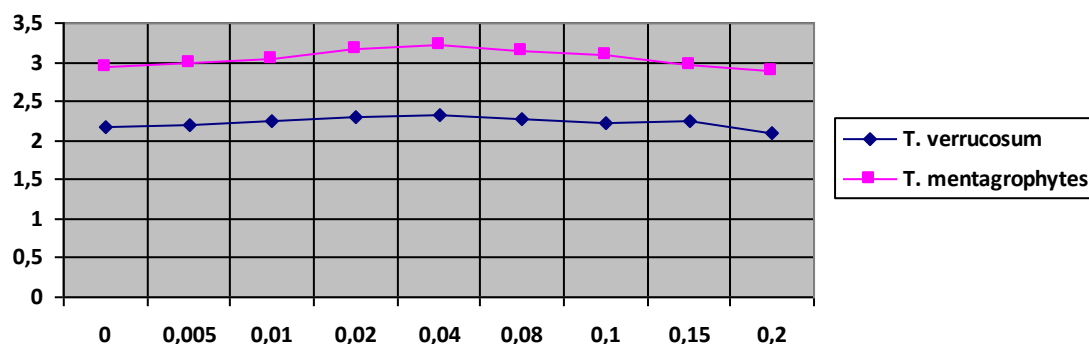


Рисунок. 4 – Зависимость линейной скорости роста (мм/сут) *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* от концентрации L-гистидина

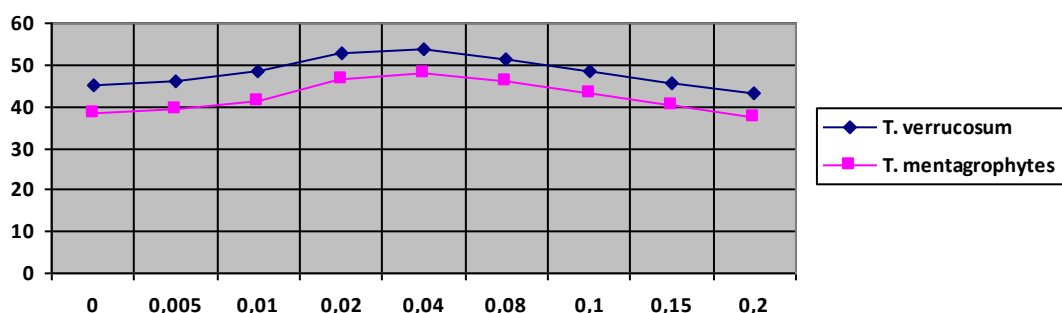


Рисунок 5 – Зависимость числа микроконидий (млн/см³) *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes* от концентрации L-гистидина

Установлено, что L-гистидин оказывает умеренное стимулирующее действие на рост *T. mentagrophytes* при концентрациях 0,02-0,04 г/л, тогда как для *T. verrucosum* эффект менее выражен. При концентрациях выше 0,15 г/л наблюдается незначительное угнетение роста. Оптимальной концентрацией L-гистидина для включения в состав питательной среды является 0,02-0,04 г/л [17,18].

4. Влияние хлорамфеникола на чистоту культуры и рост дерматофитов. Результаты изучения эффективности различных концентраций хлорамфеникола представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Оценка эффективности различных концентраций хлорамфеникола при культивировании дерматофитов

Концентрация хлорамфеникола, г/л	Подавление видимого роста бактериальной флоры, %	Влияние на рост дерматофитов
0,000 (контроль)	0,0	рост нормальный
0,010	72,3	рост нормальный
0,025	100,0	рост нормальный
0,050	100,0	незначительное угнетение

Установлено, что концентрация 0,025 г/л полностью ингибирует рост бактерий без отрицательного влияния на дерматофиты. Повышение до 0,05 г/л вызывает незначительное угнетение ростовых процессов. Полученные данные согласуются с рекомендациями по применению хлорамфеникола в составе микробиологических сред [8-10].

5. Комплексное влияние изученных добавок. Следующим этапом явилось изучение комплексного влияния добавок при их совместном внесении в оптимально подобранных концентрациях (таблица 6; рисунки 6, 7).

Таблица 6 – Комплексное влияние добавок на ростовые показатели дерматофитов

Вариант опыта	<i>T. verrucosum</i> № 123	<i>T. mentagrophytes</i> № 244
Линейная скорость роста, мм/сут:		
Контроль (без добавок)	2,18 ± 0,09	2,95 ± 0,12
Глицерин (опт.)	2,80 ± 0,12*	3,78 ± 0,14*
Инозитол (опт.)	2,48 ± 0,10*	3,15 ± 0,11
L-гистидин (0,03 г/л)	2,31 ± 0,11	3,20 ± 0,12*
Хлорамфеникол (0,025 г/л)	2,21 ± 0,10	3,02 ± 0,13
Комплекс добавок	2,94 ± 0,12*	3,89 ± 0,15*
Число микроконидий, млн/см ³ :		
Контроль (без добавок)	45,2 ± 2,8	38,6 ± 2,5
Глицерин (опт.)	58,9 ± 3,1*	52,2 ± 2,9*

Инозитол (опт.)	73,0 ± 3,4*	45,8 ± 2,7
L-гистидин (0,03 г/л)	52,1 ± 3,0	47,5 ± 2,8*
Хлорамфеникол (0,025 г/л)	46,1 ± 2,9	39,4 ± 2,6
Комплекс добавок	80,2 ± 3,8*	58,6 ± 3,2*

*Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

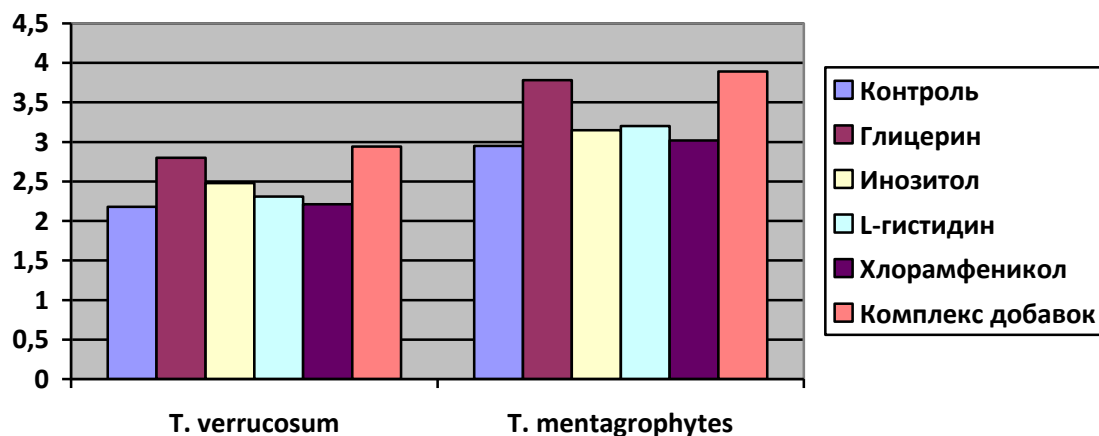


Рисунок 5 – Влияние отдельных добавок и их комплекса на линейную скорость роста (мм/сут) *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*

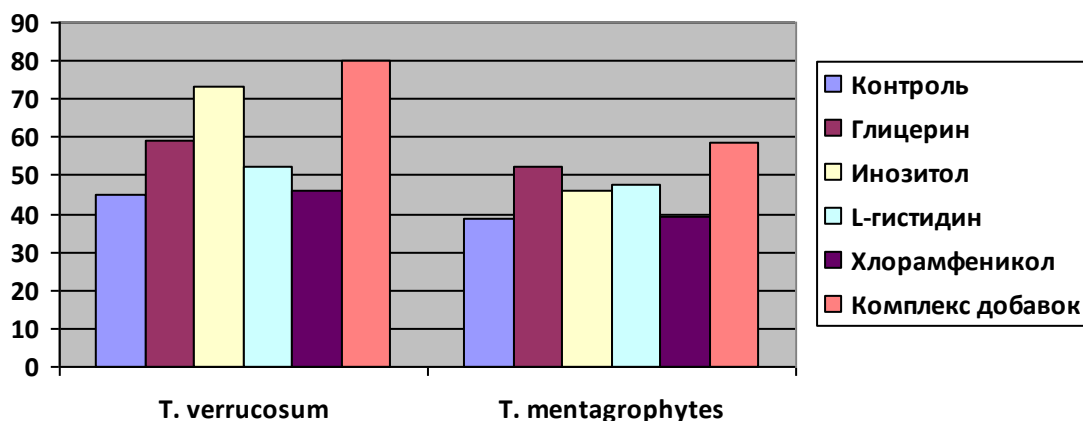


Рисунок 6 – Влияние отдельных добавок и их комплекса на число микроконидий (млн/см³) *T. verrucosum* и *T. mentagrophytes*

Комплексное использование всех добавок обеспечило максимальные значения ростовых показателей. Для *T. verrucosum* № 123 линейная скорость роста увеличилась на 34,9% (с 2,18 до 2,94 мм/сут), число микроконидий – на 77,4% (с 45,2 до 80,2 млн/см³). Для *T. mentagrophytes* №244 соответствующие показатели повысились на 31,9% и 51,8% соответственно. Суммарный выход микроконидий (усредненный показатель по двум штаммам) увеличился на 53,4%.

6. Практическое значение результатов. На основании проведенных исследований предлагаются следующие модификации базовой питательной среды.

1. Для культивирования *T. verrucosum* № 123: глицерин 1,5-2,0%, инозитол 0,02-0,03%, L-гистидин 0,02-0,04 г/л, хлорамфеникол 0,025 г/л.

2. Для культивирования *T. mentagrophytes* № 244: глицерин 2,0-2,5%, инозитол 0,02-0,03%, L-гистидин 0,02-0,04 г/л, хлорамфеникол 0,025 г/л.

3. Для совместного культивирования рекомендуется универсальный состав: глицерин 2,0%, инозитол 0,025%, L-гистидин 0,03 г/л, хлорамфеникол 0,025 г/л.

Обсуждение. Проведенные исследования позволяют сделать ряд важных выводов о механизмах действия изученных добавок и их влиянии на ростовые свойства питательной среды.

Роль глицерина. Глицерин, выступая в качестве дополнительного источника углерода, создает энергетический резерв для активного биосинтеза. Обнаруженные межвидовые различия в чувствительности к глицерину объясняются особенностями углеводного метаболизма каждого из видов дерматофитов. Полученные результаты согласуются с литературными данными о том, что глицерин является одним из наиболее часто используемых многоатомных спиртов в питательных средах для культивирования микромицетов [2, 3, 11].

Роль инозитола. Инозитол является критическим ростовым фактором для *T. verrucosum*, особенно в отношении спорообразования. Установлено, что инозитол, являясь структурным компонентом мембранных фосфолипидов, оптимизирует процессы спорогенеза. Полученные результаты хорошо коррелируют с классическими экспериментами, в которых было показано, что рост *T. verrucosum* наблюдается только при добавлении тиамин, тогда как совместное внесение инозитола и тиамина приводит к еще более выраженной стимуляции роста [4, 6, 7].

Роль L-гистидина. Влияние L-гистидина на рост дерматофитов оказалось умеренным. Установлено, что оптимальные концентрации лежат в диапазоне 0,02-0,04 г/л. При превышении этих концентраций наблюдается незначительное угнетение роста, что согласуется с литературными данными о том, что аминокислоты в низких концентрациях стимулируют рост, а в высоких могут ингибировать его. Для *T. Mentagrophytes* эффект оказался более выраженным, чем для *T. verrucosum*, что может быть связано с различными метаболическими потребностями этих видов [6, 11, 12].

Роль хлорамфеникола. Хлорамфеникол в концентрации 0,025 г/л полностью подавляет видимый рост бактериальной контаминирующей микрофлоры без отрицательного влияния на дерматофиты. Механизм действия связан со способностью хлорамфеникола связываться с 50S субъединицей рибосом бактерий, подавляя синтез бактериального белка. Важно отметить, что хлорамфеникол не оказывает фунгицидного действия, что делает его предпочтительным выбором для селективного культивирования грибной биомассы [8-10].

Синергизм добавок. При комплексном использовании изученных добавок наблюдается синергический эффект. По-видимому, глицерин создает энергетический резерв, инозитол участвует в биосинтезе мембранных фосфолипидов и оптимизирует процессы спорогенеза, L-гистидин обеспечивает дополнительный источник аминного азота, а хлорамфеникол защищает от бактериальной контаминации. Подобный синергизм также ранее отмечался рядом авторов при использовании комплексных добавок в средах для культивирования дерматофитов [2, 3, 11, 12].

Заключение. 1. Глицерин в концентрациях 1,5-2,0% оказывает выраженное стимулирующее действие на рост и продуктивность *T. verrucosum* №123, увеличивая линейную скорость роста на 27,5-28,4%, продуктивность мицелия - на 25,6-27,1% и индекс спорообразования – на 28,7-30,4%. Для *T. Mentagrophytes* №244 оптимальная концентрация глицерина составляет 2,0-2,5%, при которой индекс спорообразования повышается на 32,6-35,2%.

2. Инозитол является критическим ростовым фактором для *T. verrucosum*, особенно в отношении спорообразования. Оптимальная концентрация инозитола составляет 0,02-0,03%, при которой число микроконидий увеличивается на 51,3-61,5% по сравнению с контролем [4, 7].

3. L-гистидин в концентрациях 0,02-0,04 г/л оказывает умеренное стимулирующее действие на рост дерматофитов, особенно на *T. mentagrophytes*. При превышении оптимальных концентраций наблюдается незначительное угнетение роста.

4. Хлорамфеникол в концентрации 0,025 г/л полностью подавляет рост бактериальной контаминирующей микрофлоры без отрицательного влияния на рост дерматофитов. Данная концентрация является оптимальной для обеспечения стерильности культуры [9].

5. Комплексное использование глицерина (1,5-2,0% для *T. verrucosum* и 2,0-2,5% для *T. mentagrophytes*), инозитола (0,02-0,03%), L-гистидина (0,02-0,04 г/л) и хлорамфеникола (0,025 г/л) обеспечивает максимальный стимулирующий эффект, позволяя повысить суммарный выход микроконидий на 53,4 (для *T. verrucosum* – на 77,4%, для *T. Mentagrophytes* – на 51,8%) по сравнению со стандартным сусло-агаром.

Предложенная оптимизация состава сусло-агара позволяет существенно повысить эффективность культивирования производственных штаммов дерматофитов и может быть рекомендована для дальнейшей технологической апробации и валидации в производственных условиях при изготовлении вакцины ТВМ и других антидерматофитозных биопрепаратов [1].

Финансирование. Финансирование исследований осуществлялось производителем вакцины ТВМ ООО Фирма «БиоХимФарм», г. Владимир.

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам ООО Фирма «БиоХимФарм» за предоставленные производственные штаммы дерматофитов и техническую поддержку при проведении исследований.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Формулировки выводов носят нейтральный характер и не являются рекламой конкретного препарата.

Литература.

1. СТО 9384-168-89767728-2015. Стандарт организации. Вакцина ТВМ. – ООО Фирма «БиоХимФарм», г. Радужный, 2018. – 24 с.
2. Зайцева В.В., Красочно И.А. Влияние состава плотной питательной среды на продуктивность дерматофитов // Экология и животный мир. – 2015. – № 1. – С. 53–59.
3. Зайцева В.В., Красочно И.А. Оптимизация выращивания дерматофитов на питательных средах разного состава // Ученые записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины. – 2017. – Т. 53, № 2. – С. 78–82.
4. Robbins W.J., Mackinnon J.E., Ma R. Vitamin requirements of dermatophytes // Bulletin of the Torrey Botanical Club. – 1945. – Vol. 72. – P. 509–523. – DOI: 10.2307/2481615.
5. Balabanoff V.A., Strashilova M. Comparative physiological studies on saprophytic and pathogenic dermatophytes. II. Growth factors // Mykosen. – 1970. – Vol. 13, No. 10. – P. 499–504. – DOI: 10.1111/j.1439-0507.1970.tb00654.x.
6. Philpot C.M. The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes // Sabouraudia. – 1977. – Vol. 15, No. 2. – P. 141–150. – DOI: 10.1080/00362177785190221.
7. Robbins W.J., Ma R. A growth factor for *Trichophyton verrucosum* // American Journal of Botany. – 1945. – Vol. 32. – P. 509.
8. Arendrup M.C., Guinea J., Meletiadis J., Jorgensen K.M. EUCAST susceptibility testing of *Trichophyton rubrum*: chloramphenicol and cycloheximide supplemented growth medium improve assay performance // Meeting Abstract. – 2018.
9. Патент РФ № 2275631. Способ диагностики дерматомикозов и питательная среда для дерматофитов. – 2006.
10. Алешкевич В.Н., Медведев А.П., Кулешов Д.Б. Стимуляция роста и размножения дерматофитов // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – № 1. – С. 41–45.
11. Зайцева В.В., Красочно И.А. Влияние компонентов микроорганизмов на продуктивность дерматофитов на сусло-агаре // Вестник Витебского государственного университета. – 2014. – № 8. – С. 45–51.
12. Aly R. Culture media for growing dermatophytes // Journal of the American Academy of Dermatology. – 1994. – Vol. 31, No. 3. – P. S107–S108. – DOI: 10.1016/S0190-9622(94)70277-0.

References

1. STO 9384-168-89767728-2015. Standart organizatsii. Vaksina TVM [Organization Standard. Vaccine TVM]. ООО Фирма «БиоХимФарм», г. Радужный, 2018. (In Russ.)
2. Zaitseva V.V., Krasochko I.A. (2015) Vliyanie sostava plotnoi pitatel'noi sredy na produktivnost' dermatofitov [Effect of solid nutrient medium composition on dermatophyte productivity]. *Ekologiya i zhivotnyi mir*, no. 1, pp. 53–59. (In Russ.)
3. Zaitseva V.V., Krasochko I.A. (2017) Optimizatsiya vyrashchivaniya dermatofitov na pitatel'nykh sredakh raznogo sostava [Optimization of dermatophyte cultivation on nutrient media of different composition]. *Uchenye zapiski Vitebskoi gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny*, vol. 53, no. 2, pp. 78–82. (In Russ.)
4. Robbins W.J., Mackinnon J.E., Ma R. (1945) Vitamin requirements of dermatophytes. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, vol. 72, pp. 509–523. DOI: 10.2307/2481615.
5. Balabanoff V.A., Strashilova M. (1970) Comparative physiological studies on saprophytic and pathogenic dermatophytes. II. Growth factors. *Mykosen*, vol. 13, no. 10, pp. 499–504. DOI: 10.1111/j.1439-0507.1970.tb00654.x.
6. Philpot C.M. (1977) The use of nutritional tests for the differentiation of dermatophytes. *Sabouraudia*, vol. 15, no. 2, pp. 141–150. DOI: 10.1080/00362177785190221.
7. Robbins W.J., Ma R. (1945) A growth factor for *Trichophyton verrucosum*. *American Journal of Botany*, vol. 32, p. 509.
8. Arendrup M.C., Guinea J., Meletiadis J., Jorgensen K.M. (2018) EUCAST susceptibility testing of *Trichophyton rubrum*: chloramphenicol and cycloheximide supplemented growth medium improve assay performance. Meeting Abstract.
9. Patent RF № 2275631. Sposob diagnostiki dermatomikozov i pitatel'naya sreda dlya dermatofitov [Method for diagnosing dermatomycoses and culture medium for dermatophytes]. 2006. (In Russ.)
10. Aleshkevich V.N., Medvedev A.P., Kuleshov D.B. (2018) Stimulyatsiya rosta i razmnozheniya dermatofitov [Stimulation of growth and reproduction of dermatophytes]. *Veterinarnyi zhurnal Belarusi*, no. 1, pp. 41–45. (In Russ.)
11. Zaitseva V.V., Krasochko I.A. (2014) Vliyanie komponentov mikroorganizmov na produktivnost' dermatofitov na suslo-agare [Influence of microorganism components on dermatophyte productivity on wort agar]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo universiteta*, no. 8, pp. 45–51. (In Russ.)
12. Aly R. (1994) Culture media for growing dermatophytes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 31, no. 3, pp. S107–S108. DOI: 10.1016/S0190-9622(94)70277-0.

АРНАЙЫ ҚОСПАЛАРДЫҢ ДЕРМАТОФИТТЕРДІҢ ӨНДІРІСТІК ШТАМДАРЫН ӨСІРУ КЕЗІНДЕГІ СУСЛО-АГАРДЫҢ ӨСУ ҚАСИЕТТЕРІНЕ ӘСЕРІ

Ю.А. Костыркин , О.В. Лысинская, Ю.В. Никитин, В.В. Шаповал

«БиоХимФарм» ЖШС Фирмасы, Владимир қ., Ресей

* ignatosyanag@gmail.com

Аннотация. *Trichophyton* туысына жататын дерматофиттер, ең алдымен *Trichophyton verrucosum*, ірі кара мал трихофитиясының негізгі қоздырғыштары болып табылады. Бұл микроорганизмдерді қатты қоректік орталарда өсіру бірқатар қиындықтармен байланысты: *T. verrucosum* штамдарының көпшілігі өсуі үшін витаминдерге қатаң қажеттілік танытады, олардың өсінділері қатар жүретін бактериялық микрофлорамен жиі контаминацияланады, ал стандартты қоректік орталарда биомасса мен споралар түзілуінің өнімділігі вакциналарды өнеркәсіптік өндіру үшін жеткіліксіз болып қалады.

Зерттеу мақсаты – өндірістік *Trichophyton verrucosum* және *Trichophyton mentagrophytes* штамдарын өсіру кезінде глицериннің, инозитолдың, L-гистидиннің және хлорамфениколдың сусло-агардың өсу қасиеттеріне әсерін бағалау.

Материалдар мен әдістер. Негізгі қоректік орта ретінде стандартты сусло-агар пайдаланылды. Тәжірибелік үлгілерге глицерин (0,5-2,5%), инозитол (0,005-0,1%), L-гистидин (0,005-0,2 г/л) және хлорамфеникол (0,01-0,05 г/л) қосылды. Өсу қасиеттері сызықтық өсу жылдамдығы, спора түзілу қарқындылығы және мицелий өнімділігі бойынша бағаланды.

Нәтижелер. 1,5-2,0% концентрациядағы глицерин *T. verrucosum* № 123 штаммының сызықтық өсу жылдамдығын бақылаумен салыстырғанда 28,3%-ға, ал мицелий өнімділігін 25,6%-ға арттырды. 0,02–0,03% концентрациядағы инозитол микроконидиялар санын 45,2-ден 73,0 млн/см³-ге дейін арттырды. 0,02-0,04 г/л концентрациядағы L-гистидин *T. mentagrophytes* өсуіне орташа ынталандырушы әсер көрсетті. 0,025 г/л концентрациядағы хлорамфеникол дерматофиттердің өсуін тежемей, контаминациялаушы бактериялық микрофлораның көзге көрінетін өсуін толық басып тастады. Қоспаларды кешенді қолдану стандартты сусло-агармен салыстырғанда микроконидиялардың жалпы шығымын 53,4%-ға арттырды.

Қорытынды. Сусло-агар құрамына глицеринді (*T. verrucosum* үшін 1,5-2,0% және *T. mentagrophytes* үшін 2,0-2,5%), инозитолды (0,02-0,03%), L-гистидинді (0,02-0,04 г/л) және хлорамфениколды (0,025 г/л) енгізу қоректік ортаның өсу қасиеттерін айтарлықтай жақсартуға, дерматофиттердің өндірістік дақылдарының өнімділігін арттыруға және бактериялық контаминациядан сенімді қорғауды қамтамасыз етуге мүмкіндік береді.

Түйінді сөздер: *Trichophyton verrucosum*; *Trichophyton mentagrophytes*; дерматофиттер; ірі қара мал трихофитиясы; қоректік орта; сусло-агар; глицерин; инозитол; L-гистидин; хлорамфеникол.

EFFECT OF SPECIFIC SUPPLEMENTS ON THE GROWTH PROPERTIES OF WORT AGAR DURING CULTIVATION OF PRODUCTION STRAINS OF DERMATOPHYTES

Yu.A. Kostyrkin *, O.V. Lysinskaya, Yu.V. Nikitin, V.V. Shapoval

BioKhimFarm LLC, Vladimir, Russia

* ignatosyanag@gmail.com

Abstract. Dermatophytes of the genus *Trichophyton*, particularly *Trichophyton verrucosum*, are the main causative agents of trichophytosis in cattle. Cultivation of these microorganisms on solid nutrient media is associated with several difficulties: most *T. verrucosum* strains have stringent vitamin requirements for growth, their cultures are frequently contaminated by bacterial microflora, and biomass and spore productivity on standard media remain insufficient for industrial vaccine production. Therefore, optimization of the basal wort agar medium through the addition of specific supplements that improve its growth-promoting properties is an important objective.

Objective. To evaluate the effects of glycerol, inositol, L-histidine, and chloramphenicol on the growth-promoting properties of wort agar during cultivation of production strains of *Trichophyton verrucosum* and *Trichophyton mentagrophytes*.

Materials and Methods. Standard wort agar was used as the basal medium. Experimental media were supplemented with glycerol (0.5-2.5%), inositol (0.005-0.1%), L-histidine (0.005-0.2 g/L), and chloramphenicol (0.01-0.05 g/L). Growth properties were assessed based on linear growth rate, sporulation intensity, and mycelial productivity.

Results. Glycerol at a concentration of 1.5-2.0% increased the linear growth rate of *T. verrucosum* strain No. 123 by 28.3% and mycelial productivity by 25.6% compared with the control. Inositol at a concentration of 0.02-0.03% increased the number of microconidia from 45.2 to 73.0 million/cm³. L-histidine at a concentration of 0.02-0.04 g/L exerted a moderate stimulatory

effect on the growth of *T. mentagrophytes*. Chloramphenicol at a concentration of 0.025 g/L completely inhibited visible growth of contaminating bacterial microflora without suppressing dermatophyte growth. The combined use of these additives increased the total yield of microconidia by 53.4% compared with standard wort agar.

Conclusion. Supplementation of wort agar with glycerol (1.5-2.0% for *T. verrucosum* and 2.0-2.5% for *T. mentagrophytes*), inositol (0.02-0.03%), L-histidine (0.02-0.04 g/L), and chloramphenicol (0.025 g/L) significantly improves the growth-promoting properties of the medium, increases the productivity of production dermatophyte cultures, and provides effective control of bacterial contamination.

Keywords: *Trichophyton verrucosum*; *Trichophyton mentagrophytes*; dermatophytes; cattle trichophytosis; culture medium; wort agar; glycerol; inositol; L-histidine; chloramphenicol.