

УДК 619:579.843.96:57.082.26

ХРАНЕНИЕ КУЛЬТУР *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* ПРИ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУРАХ

В. С. Русалеев¹, Д. А. Васильев²¹ Ученый секретарь, доктор ветеринарных наук, профессор, ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, e-mail: rusaleev@arriah.ru² Заведующий кафедрой, доктор биологических наук, профессор,

ФГБОУ ВО «Ульяновский государственный аграрный университет имени П. А. Столыпина», г. Ульяновск, e-mail: dav_ul@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Основные задачи хранения любых культур микроорганизмов, в том числе и *Actinobacillus pleuropneumoniae*, – это поддержание их жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков. В различных коллекциях жизнеспособность микроорганизмов поддерживается преимущественно следующими методами: периодическими посевами, лиофилизацией, хранением под минеральным маслом, в условиях низких и ультранизких температур. Перспективным методом длительного хранения микроорганизмов является криоконсервация, обладающая рядом преимуществ. В статье рассмотрены пути возможного совершенствования способов длительного хранения культур актинобацилл. Представлены экспериментальные данные по изучению влияния криогенной заморозки при помощи жидкого азота на жизнеспособность и некоторые биологические свойства актинобацилл. Показано, что культуры микроорганизмов, хранившиеся в течение года (срок наблюдения) при температуре –196 °С, сохраняют жизнеспособность и характерные для биологического вида культурально-морфологические и биохимические свойства. Описаны факторы, значимые на этапе подготовки культур *Actinobacillus pleuropneumoniae* к криоконсервированию и влияющие на исход хранения.

Ключевые слова: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, культивирование, жизнеспособность бактерий, криоконсервация, криопротекторы.

UDC 619:579.843.96:57.082.26

LOW TEMPERATURE STORAGE OF *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* CULTURES

V. S. Rusaleyev¹, D. A. Vasilyev²¹ Academic Secretary, Doctor of Science (Veterinary Medicine), Professor, FGBI "ARRIAH", Vladimir, e-mail: rusaleev@arriah.ru² Head of Chair, Doctor of Science (Biology), Professor,

FGBEU HE "Ulyanovsk State Agricultural University named after P. A. Stolypin", Ulyanovsk, e-mail: dav_ul@mail.ru

SUMMARY

Basic tasks during storage of any microorganism cultures including *Actinobacillus pleuropneumoniae* involve maintenance of their vitality and stable taxonomically relevant signs. In different collections the microorganism vitality is mainly maintained using the following methods: repeated passages, lyophilisation and storage with mineral oil at low and ultra low temperatures. Promising method of long-term storage of microorganisms includes cryopreservation that demonstrates a number of advantages. The paper examines approaches to possible improvement of means for long term storage of actinobacilli. Experimental data are reported that were obtained during research of potential effect of liquid nitrogen freezing on vitality and some biological properties of actinobacilli. After one year storage (observation period) at –196 °C the microorganism cultures were demonstrated to preserve vitality and species-specific cultural-morphologic and biochemical properties. Factors relevant for *Actinobacillus pleuropneumoniae* preparation for cryopreservation and affecting storage results are demonstrated.

Key words: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, cultivation, bacterial vitality, cryopreservation, cryoprotectors.

ВВЕДЕНИЕ

Лабораторной практике известен ряд способов хранения культур микроорганизмов.

1. Методы непродолжительного хранения – под минеральным маслом, в водно-солевых растворах, высушиванием на твердых носителях, путем периодических пересевов и замораживанием при температурах ниже точки кристаллизации воды.

2. Методы длительного хранения – лиофилизация и глубокое замораживание.

Из методов непродолжительного хранения повсеместное распространение получил метод периодических пересевов. Существенными недостатками данного способа являются: значительные затраты времени, потребность в большом количестве питательных сред и посуды, риск загрязнения и потери культур, ошибки при обозначении штаммов. При пересевах нельзя исключить возможность популяционных изменений, сопровождающихся морфологическими, антигенными, физиологическими и генетическими изменениями получаемых культур микроорганизмов [1].

Из способов длительного хранения широкую известность получил метод лиофилизации. Одним из его недостатков является то, что микробные клетки в процессе лиофилизации подвергаются воздействию стрессовых факторов – замораживанию, высушиванию и последующей регидратации, что приводит к значительному снижению количества жизнеспособных клеток в образцах [2, 4, 6].

Перспективным методом длительного хранения микроорганизмов является криоконсервация, преимуществами которой – небольшие временные и материальные затраты, малая вероятность загрязнения культур, сохранение в стабильном состоянии свойств микроорганизмов, возможность использования замороженных культур в качестве прямого инокулята [3, 5, 7].

Однако метод криоконсервации пока еще не получил широкого применения в ветеринарной лабораторной практике для хранения как музейных, так и производственных штаммов микроорганизмов.

Целью исследования было определение возможности использования криоконсервации для длительного хранения культур актинобацилл в лабораторных условиях и изучение влияния данного метода на жизнеспособность, культурально-морфологические и биохимические свойства бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали референтный штамм бактерий *A. pleuropneumoniae* серовар 1 № 27088, полученный из Американской коллекции типовых культур.

Для культивирования бактерий использовали бульон на основе мясного гидролизата по Хоттингеру (с содержанием около 300 мг% аминного азота) и агар на основе мясного гидролизата по Хоттингеру с добавлением 10% дрожжевого экстракта в качестве V-фактора роста и 10% эритроцитов крови лошади в качестве X-фактора роста. При выращивании бактерий *A. pleuropneumoniae* в жидкой питательной среде отмечали интенсивность роста и характер помутнения среды.

Контроль чистоты роста осуществляли посредством микроскопии окрашенных мазков. Световую микроскопию в мазках, окрашенных по Граму, проводили под микроскопом МБИ-15 при увеличении в 700 раз.

Жизнеспособность актинобацилл определяли посредством высева на агар с последующим подсчетом клеток к первоначальному количеству живых бактерий (до начала хранения), взятому за 100%. Количество живых микробных клеток вычисляли по формуле

$$M = \frac{a \times 10^n}{V},$$

где M – количество клеток в 1 см³;

a – среднее число колоний при высевах разведения;

V – объем суспензии, взятой для посева, см³;

10^n – коэффициент разведения.

Биохимические свойства *A. pleuropneumoniae* определяли на средах Гисса и с использованием системы индикаторной бумажной (СИБ) для идентификации микроорганизмов.

Культивирование актинобацилл проводили при температуре +37 °С в бульоне на шейкере в течение 6 ч, а на агаре – 18–20 ч.

В качестве криопротекторов использовали декстран, глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), которые добавляли в бульон в концентрации 10%. Глицерин и декстран стерилизовали автоклавированием при 1 атм. в течение 15 мин. Стерилизацию ДМСО осуществляли фильтрованием, используя пористые свечи «Села».

Замораживание актинобацилл проводили в пластиковые пробирки с завинчивающимися крышками с силиконовыми прокладками, объем замораживаемой суспензии составлял 1,0 мл. Пробирки помещали в сосуды Дьюара с жидким азотом.

Через разные сроки хранения суспензию в пробирках размораживали на водяной бане при температуре +40...41 °С и изучали влияние метода на различные свойства актинобацилл. В качестве контроля служили культуры, в которые вместо криопротектора добавляли аналогичное количество стерильного фосфатно-буферного солевого раствора с рН 7,2–7,4.

При проведении исследований использовали стандартные приемы обработки выборок варьирующих переменных. Эксперименты проводили в 3–5-кратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ввиду ограниченности данных по криоконсервации актинобацилл и применению криопротекторов в процессе замораживания, первая серия экспериментов была посвящена оценке жизнеспособности *A. pleuropneumoniae* до и после криоконсервации с различными криопротекторами. Опыты в этом направлении начали с отработки режима получения биомассы актинобацилл. Исходная посевная концентрация актинобацилл 3,0–3,5 × 10⁶ КОЕ/мл, вносимая в жидкую питательную среду, обеспечивала через 18–20 ч культивирования в стационарных условиях выход биомассы на уровне 3,8–9,2 × 10⁹ КОЕ/мл. Необходимо отметить, что низкая посевная концентрация актинобацилл и культивирование в стационарных условиях ведут к неоправданному удлинению времени культивирования до 18 ч. Использование же культивирования на шейкере, напротив, позволяет легко достигнуть требуемой исходной концентрации за 6 ч. При проведении экспериментов с криопротекторами в качестве стандартной условно была принята концентрация актинобацилл, равная 3,2 × 10⁶ КОЕ/мл. Данное условие

Таблица 1
Результаты культивирования криоконсервированных культур *A. pleuropneumoniae*, хранившихся при температуре –196 °С в жидком азоте в течение суток
n = 3

Криопротектор	Время культивирования, ч	Концентрация бактерий, КОЕ/мл	
		посевная	конечная
Без криопротектора	6	$3,2 \times 10^6$	$8,1 \times 10^9$
Глицерин	6	$3,2 \times 10^6$	$8,1 \times 10^9$
ДМСО	6	$3,2 \times 10^6$	$8,0 \times 10^9$
Декстран	6	$3,2 \times 10^6$	$8,0 \times 10^9$

способствовало стабильному выходу культуры на стационарную фазу роста через 5–6 ч культивирования. Для разбавления микробной суспензии до требуемой концентрации использовали фосфатно-буферный солевой раствор. Культуры разливали по 1,0 мл в полипропиленовые пробирки, добавляли криопротектор и после перемешивания помещали в жидкий азот.

Учитывая, что выживаемость криоконсервированных бактерий в значительной степени определяется скоростью размораживания, использовали метод быстрого отогрева замороженных культур на водяной бане при температуре +40...41 °С. При культивировании в жидкой питательной среде криоконсервированные актинобациллы со всеми тремя криопротекторами обеспечивали накопление биомассы в количестве $8,0 \times 10^9$ КОЕ/мл (табл. 1).

Следующая серия экспериментов показала, что выживаемость и сохранность криоконсервированных бактерий напрямую зависит от используемого криопротектора.

Следует отметить, что перед криозамораживанием биомассу актинобацилл смешивали с криопротектором и выдерживали при комнатной температуре 20 мин.

Количество жизнеспособных бактерий в пробах определяли до и после криозамораживания. Результаты опытов показали, что из трех препаратов, обладающих криопротективными свойствами, наиболее эффективными оказались ДМСО и глицерин, обеспечившие выживаемость при замораживании 98,6 и 95,7% акти-

нобацилл. Тогда как декстран обеспечивал сохранность 71,4% клеток, а выживаемость актинобацилл в среде без криопротектора составляла до 40% (табл. 2).

Проведенные исследования выявили статистически достоверное снижение количества живых клеток в образцах после замораживания без криопротектора. В образцах, консервированных с криопротекторами, концентрация жизнеспособных клеток также снижалась, однако показатели выживаемости оставались на высоком уровне.

Проведенные эксперименты не выявили изменений морфологических, культуральных и биохимических свойств актинобацилл после криозамораживания в течение 7 сут.

Следующие исследования касались установления концентрации живых клеток в образцах с различными криопротекторами в процессе их длительного хранения.

Образцы были помещены в сосуды Дьюара и хранились в жидком азоте в течение 12 месяцев, по прошествии которых был проведен анализ концентрации сохранившихся жизнеспособных клеток актинобацилл (табл. 3).

Полученные результаты свидетельствуют, что актинобациллы, криоконсервированные с глицерином и ДМСО, сохранили максимальное количество жизнеспособных клеток после 12 месяцев хранения, показатели их выживаемости составили 77,8 и 80,7%.

Жизнеспособность актинобацилл, криоконсервированных с использованием декстрана, оказалась значительно ниже и составила 59%.

Таблица 2
Количество жизнеспособных клеток и показатель выживаемости *A. pleuropneumoniae*, криоконсервированных в жидком азоте в течение 7 суток
n = 3

Криопротектор	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		Показатель выживаемости*, %
	до криоконсервации	после криоконсервации	
Без криопротектора	$7,0 \times 10^9$	$2,8 \times 10^9$	40
Глицерин	$7,0 \times 10^9$	$6,7 \times 10^9$	95,7
ДМСО	$7,0 \times 10^9$	$6,9 \times 10^9$	98,6
Декстран	$7,0 \times 10^9$	$5,0 \times 10^9$	71,4

* Отношение исходной концентрации клеток актинобацилл к таковой после криоконсервации, выраженное в процентах.

Таблица 3

Количество жизнеспособных клеток и показатель выживаемости *A. pleuropneumoniae*, криоконсервированных в жидком азоте в течение 12 месяцев
n = 3

Криопротектор	Количество жизнеспособных клеток, КОЕ/мл		Показатель выживаемости, %
	до криоконсервации	после криоконсервации	
Без криопротектора	$7,0 \times 10^9$	$0,92 \times 10^9$	13,1
Глицерин	$7,0 \times 10^9$	$5,45 \times 10^9$	77,8
ДМСО	$7,0 \times 10^9$	$5,65 \times 10^9$	80,7
Декстран	$7,0 \times 10^9$	$4,13 \times 10^9$	59,0

Культуры актинобацилл, замороженные без криопротектора, через 12 месяцев хранения при температуре -196°C содержали около 13,1% живых клеток от общего их количества, заложенного на консервацию.

После низкотемпературной консервации в течение 12 месяцев с ДМСО, глицерином и декстраном актинобациллы обеспечивали накопление биомассы в количестве $9,73 \pm 0,06$; $9,84 \pm 0,05$ и $9,51 \pm 0,08$ lg КОЕ/мл соответственно.

Культуры бактерий *A. pleuropneumoniae*, выращенные из исходного и криоконсервированных в течение 12 месяцев образцов, обладали одинаковыми культурально-морфологическими и биохимическими свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты показали, что культуры бактерий *Actinobacillus pleuropneumoniae*, хранившиеся при температуре -196°C , сохраняют жизнеспособность в течение 12 месяцев (срок наблюдения).

Проведен сравнительный анализ показателей жизнеспособности бактерий при применении различных криопротекторов. Полученные данные свидетельствуют, что из трех используемых в эксперименте препаратов, обладающих криопротективными свойствами, наиболее эффективными оказались диметилсульфоксид и глицерин, обеспечивающие максимальную выживаемость актинобацилл при замораживании.

Хранение культур актинобацилл при сверхнизких температурах обеспечивает сохранность культурально-морфологических и биохимических свойств микроорганизмов.

Проделанная работа указывает на эффективность предлагаемого метода длительного сохранения бактерий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Браун В. Генетика бактерий / под ред. С. И. Алиханяна. – М.: Наука, 1968. – 446 с.
2. Жизнеспособность лиофилизированных бактерий в зависимости от температуры охлаждения / М. В. Данилова, И. М. Надирова, Т. В. Емцева, Е. В. Кузнецова // Известия АН СССР. Серия биологическая. – 1981. – № 2. – С. 307–309.
3. Криоконсервация – перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей / О. А. Савкина, Г. В. Терновской, М. Н. Локачук [и др.] // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 4. – С. 112–119.
4. Осин А. В., Червякова Н. С., Валова Т. В. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 66–70.
5. Цуцаева А. А., Ананьина А. Е. Влияние условий хранения на свойства криоконсервированной и лиофилизированной культуры *Streptomyces fradiae* 25Ab12 // Проблемы криобиологии. – 2001. – № 1. – С. 52–59.
6. Ashwood-Smith M. J. Mechanisms of dehydration injury in bacteria // Int. J. Refrig. – 1980. – Vol. 3, No. 4. – P. 205–212.
7. Portner D. C., Leuschner R. G. K., Murray B. S. Optimising the viability during storage of freeze-dried cell preparations of *Campylobacter jejuni* // Cryobiology. – 2007. – Vol. 54, No. 3. – P. 265–270.