

ЗАЛЕЖНІСТЬ СТАБІЛЬНОСТІ ФІЗІОЛОГІЧНОГО СТАНУ КЛІТИН КОЛЕКЦІЙНОГО ВИРОБНИЧОГО ШТАМУ *E. COLI O55* ВІД КІЛЬКОСТІ ПАСАЖІВ НА ПОЖИВНОМУ СЕРЕДОВИЩІ

А. М. Головка, О. І. Гордієнко, Н. Г. Пінчук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

*Одним із багатьох факторів впливу на стабільність фізіологічного стану мікробної клітини, що зберігається у ліофільно-висушеному стані, є кількість подальших послідовних пересівів (пасажів культивування). Анабіотичний стан клітини при зберіганні у ліофільно-висушеному вигляді потребує чіткої характеристики її фізіологічного стану за культурально-морфологічними та біохімічними властивостями. Також важливим є визначення кількості допустимих пересівів культивування на поживних середовищах без зміни фізіологічних характеристик. Проведено дослідження по визначенню впливу кількості пасажів культивування на фізіологічний стан клітин виробничого колекційного ліофільно-висушеного штаму *E. coli O55*. Одержані результати нехарактерного ферментолізу цукрів Гіса свідчать, що кількість послідовних культивувань є обмеженою при закладанні колекційних штамів на довготермінове зберігання у ліофільно-висушеному стані.*

Розробка інноваційних технологій виробництва ветеринарних імунобіологічних засобів (ВІЗ) передбачає підвищення ефективності кожного з етапів біотехнологічного процесу та чітке визначення умов забезпечення стабільності фізіологічних властивостей біологічної складової при культивуванні. Це дає можливість стандартизувати кількісний показник культивування виробничих штамів мікроорганізмів без втрати їхніх фізіологічних властивостей.

У колекції Національного центру штамів мікроорганізмів ДНКІБШМ виробничі штами зберігаються в ліофільно-висушеному стані. Ці штами є біологічною складовою в біотехнології виробництва ВІЗ. Головною характеристикою будь-якого виробничого штаму мікроорганізму є стабільність фізіологічних властивостей на всьому ланцюгу біотехнологічного виробництва ВІЗ.

Живлення та дихання в мікробній клітині відбувається за участі ферментів — біологічних катализаторів, що впливають на швидкість та специфічність хімічних реакцій метаболічного процесу.

Фізіологічний стан клітин виробничих штамів, що закладаються на зберігання у колекцію має важливе значення [1, 2]. Стабільність фізіологічного штаму клітин залежить від багатьох факторів [2, 3]. Одним з таких факторів є кількість пересівів (пасажів) на поживних середовищах [4, 5].

Мета роботи — визначити вплив пасажування на фізіологічні процеси ферментолізу клітин виробничого штаму *E. coli O55*, який зберігається у ліофільно-висушеному стані у колекції НЦШМ ДНКІБШМ.

Матеріали і методи. Для досліджень було використано виробничий штам *E. coli O55*, що зберігається у колекції НЦШМ ДНКІБШМ у ліофільно-висушеному стані з 2005 року. Нами були перевірені збереження типових видових ознак цього штаму за культурально-морфологічними та біохімічними ознаками. Для культивування бактерії було використано селективне середовище Ендо, а для вивчення її біохімічних властивостей — набір середовищ з цурками Гіса.

Результати й обговорення. На чашки із середовищем Ендо висівали суспензію з ліофілізованого матеріалу, що культивували на ГРБ (гідролізат рибного борошна) бульоні. Посівна доза $0,5 \text{ см}^3$ з концентрацією клітин $\sim 1 \text{ млн/мл}$ за стандартом каламутності, експозиція культивування 24 год за температури $37 \text{ }^\circ\text{C}$. За результатами досліджень було визначено, що за культурально-морфологічними ознаками штаму *E. coli* O55 (2005 р.) відповідав типовим видовим ознакам. При культивуванні на диференційному середовищі Ендо колонії мали круглі з металевим блиском колонії (рис. 1).

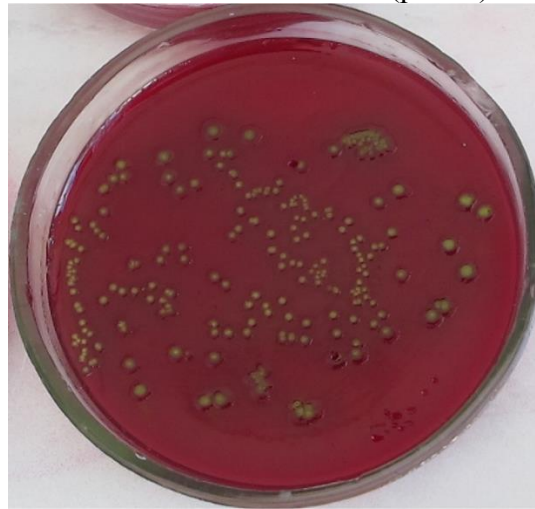


Рис. 1. Культурально-морфологічні ознаки *E. coli* O55 на диференційному середовищі Ендо

Визначення морфології клітин *E. coli* O55 (2005 р.) проводили методом фарбування за Грамом та мікроскопіюванням при збільшенні $100\times$. Спостерігали Грам-негативні палички з заокругленими кінцями (рис. 2), що відповідало типовості видових морфологічних ознак.



Рис. 2. Мікроскопія видових морфологічних ознак *E. coli*

Метаболічні процеси клітин штаму *E. coli* O55 (2005 р.) визначали методом ферментолізу цукрів Гіса.

Одержані дані свідчили про те, що ферментоліз цукрів Гіса був типовим (табл. 1).

Характерним для штаму *E. coli* O55 при ферментації цукрів Гіса були утворення кислоти та виділення газу на середовищах з глюкозою, лактозою, манітом. *E. coli* O55 не ферментували середовища Гіса з дульцитом та сахарозою. Також без змін були висіви на

середовище Гіса з інозитом. Реакція на індол була позитивна, а сірководень (H₂S) не утворювався на середовищі Клігlera. При культивуванні на середовищі Сімонса не росли бактерії *E. coli O55*.

Таблиця 1

Ферментоліз цукрів виробничого колекційного штаму *E. coli O55* після першого пасажу культивування

Назва культури	глюкоза	лактоза	сахароза	маніт	ксиліоза	інозит	дульцит	сорбіт	цит-ам	Клігlera	Олькеніц	маноза	арабіноза	Рамноза	мальтоза	індол
<i>E. coli O55</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
+ - повний ферментоліз цукру; - - відсутність ферментолізу цукру																

Перевірену культуру *E. coli O55* (перший пасаж) після зберігання у колекції з 2005 року у ліофільно-висушеному стані використали для отримання наступного пасажу. Отриману суспензію бактеріальної маси штаму було ліофілізовано із захисним середовищем Файбича (10 % сахарози та 1 % желатини). Ліофілізовану культуру (другий пасаж) було перевірено за культурально-морфологічними ознаками та біохімічними властивостями.

Було встановлено, що культурально-морфологічні ознаки колоній були типовими, а біохімічні властивості не відповідали типовим видовим властивостям за показниками асиміляції цукрів, а саме не типовими для *E. coli O55* були: відсутність ферментолізу лактози, асиміляція цитратно-амонійного середовища та негативна реакція на індол (табл. 2).

Таблиця 2

Ферментоліз цукрів виробничого колекційного штаму *E. coli O55* після другого пасажу культивування

Назва культури	глюкоза	лактоза	сахароза	маніт	ксиліоза	інозит	дульцит	сорбіт	цит-ам	Клігlera	Олькеніц	маноза	арабіноза	Рамноза	мальтоза	індол
<i>E. coli O55</i>	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
+ - повний ферментоліз цукру; - - відсутність ферментолізу цукру																

Враховуючи те, що виробничі штами які зберігаються у колекції НЦШМ ДНКІБШМ передаються на біофабрики для використання їх в технології виготовлення ветеринарних імунобіологічних засобів, яка передбачає послідовні етапи культивування штамів (посівна колба, інокулят, ферментер), актуальним є вивчення щодо ліміту пасажів культивування колекційного виробничого штаму (продуценту).

ВИСНОВКИ

1. Після першого пасажу культивування ліофілізованого колекційного штаму *E. coli O55* не виявлено культурально-морфологічних та біохімічних видових змін.
2. Після другого пасажу *E. coli O55* культурально-морфологічних видових змін також не виявлено.
3. За біохімічними властивостями було виявлено видові зміни мікроорганізму, а саме: відсутність ферментолізу цукру Гіса з лактозою; ферментоліз цитратно-амонійного агару Сімонса та негативна реакція на індол.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть проведені стосовно визначення ліміту пасажів для виробничих штамів мікроорганізмів та розроблення системи заходів щодо забезпечення стабільності їхніх властивостей.

DEPENDENCE OF STABILITY CELL PHYSIOLOGIC STATE COLLECTIBLE PRODUCTION STRAIN *E. COLI* O55 THE NUMBER PASSAGES ON NUTRIENT MEDIA

A. N. Golovko, O. I. Gordienko, N. G. Pinchuk

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms

S U M M A R Y

One of the many factors affecting the stability of the physiological state of a microbial cell which is stored in a freeze-dried state, a number of further successive subcultures (passages of culture). Anabiotic state of the cell when stored in freeze-dried form requires precise characteristics of its physiological state for culture-morphological parameters and biochemical properties. Also important is the determination of the number of admissible passages cultivation on nutrient media without changes physiological characteristics. Conducted a study to determine the effect of the number of passages in culture on the physiological state of the cells of the production of the collection of freeze-dried strain of *E. coli* O 55. The results obtained are unusual for enzymatic hydrolysis of sugars branch block indicate that the number of consecutive cultivation limited to the laying of collection strains deposited in the freeze-dried state, the changes in the physiological properties of microbial cells.

ЗАВИСИМОСТЬ СТАБИЛЬНОСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК КОЛЛЕКЦИОННОГО ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА *E. COLI* O55 ОТ КОЛИЧЕСТВА ПАССАЖЕЙ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

A. N. Головки, О. И. Гордиенко, Н. Г. Пинчук

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии
и штаммов микроорганизмов

А Н Н О Т А Ц И Я

Одним из многих факторов влияния на стабильность физиологического состояния микробной клетки, которая хранится в лиофильно-высушенном состоянии, является количество дальнейших последовательных пересевов (пассажей культивирования). Анабиотическое состояние клетки при хранении в лиофильно-высушенном виде требует четкой характеристики ее физиологического состояния по культурально-морфологическим показателям и биохимическим свойствам. Также важным является определение количества допустимых пересевов культивирования на питательных средах без изменений физиологических характеристик. Проведено исследование по определению влияния количества пассажей культивирования на физиологическое состояние клеток производственного коллекционного лиофильно-высушенного штамма *E. coli* O55. Полученные результаты несвойственного ферментализа сахаров Гисса свидетельствуют, что количество последовательных культивирований ограничена при закладке коллекционных штаммов на хранение в лиофильно-высушенном состоянии за изменениями физиологических свойств микробных клеток.

ЛІТЕРАТУРА

1. Загоскина Н. В. Биотехнология теория и практика / Н. В. Загоскина, Л. В. Назаренко, Е. А. Калашникова, Е. А. Живухина ; под редакцией Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. — М. : ОНИКС, 2009. — 115 с.
2. Головка А. М. Виробництво та контроль якості ветеринарних імунобіологічних препаратів в Україні [Текст] / А. М. Головка, О. Є. Айшпур // Ветеринарна медицина України. — 2003. — № 8. — С. 19–20.
3. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк ; под ред. проф. Е. Н. Кондратьевой ; пер. с англ. канд. биол. наук Г. П. Мирошниченко, Т. Ю. Переслени. — М. : Мир, 1982. — 312 с.
4. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. [Текст] : пер. с англ. / Ред. Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уильямс. — 9-е изд. — М. : Мир, 1997. — Т. 2. — 368 с.
5. Методы общей бактериологии в 3-х т. : пер. с англ. / Под ред. Ф. Герхарда и др. ; Пер. с англ. Е. Н. Кондратьевой, Л. В. Калакуцкого. — М. : Мир, 1984. — Т. 3. — 264 с.