

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ ЗАХИСНОГО СЕРЕДОВИЩА З АЕРОСИЛОМ У ПРОЦЕСІ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ ТА ЗБЕРІГАННЯ НА ДОСЛІДЖУВАНІ КУЛЬТУРИ *YERSINIA SPP.*

А. М. Головка, д-р вет. наук, професор, академік НААН,

А. В. Ушкалов, аспірант¹,

Л. М. Виговська, канд. вет. наук,

В. А. Ковтун, канд. вет. наук

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів,
вул. Донецька, 30, м. Київ, 03510, Україна

У статті наведено результати впливу захисного середовища з аеросилом в процесі ліофілізації та зберігання на досліджувані культури *Yersinia spp.* із колекції НЦШМ ДНКІБШМ. Отримані дані свідчать про доцільність використання даного захисного середовища в процесі ліофілізації та зберігання досліджуваних культур *Yersinia spp.*

Ключові слова: *YERSINIA*, ЗАХИСНЕ СЕРЕДОВИЩЕ, АЕРОСИЛ, ЛІОФІЛІЗАЦІЯ.

Найбільш доцільним і доступним на даний час способом довготривалого зберігання більшості штамів мікроорганізмів у колекціях є ліофілізація [1]. Для заморожування і подальшого сублімаційного висушування краще використовувати клітини в стаціонарній фазі росту, коли досягається найбільший рівень накопичення бактерій, знижується інтенсивність обмінних процесів, спостерігається підвищення стійкості клітин до заморожування і висушування [2–4].

Важливе значення для успішної ліофілізації має вибір захисного суспензійного середовища [5–7]. Як правило, висушування мікроорганізмів проводять в колоїдних розчинах, наприклад, в молоці, желатині та ін. У склад суспензійних захисних середовищ вводять речовини, які знижують точку кристалізації води, що подовжує термін охолодження клітин і створюються умови для уникання пагубної дії кристалів льоду, а також прояву захисної дії при висушуванні [6, 7].

В останні роки набули актуальності дослідження щодо експериментального використання високодисперсних кремнеземів (діоксиду кремнію, аеросилу), у складі захисних середовищ для бактерій різних родів; він володіє хорошими адсорбційними властивостями, особливо до полярних речовин. В якості наповнювача аеросил знайшов багатостороннє застосування, яке повністю засноване на таких властивостях, як надзвичайно маленькі розміри частинок, їх однорідність, сферична форма і високий ступінь чистоти. З хімічної точки зору всі властивості аеросилу визначаються наявністю на його поверхні силанольних Si-OH і силосанових Si-O-Si груп. При додаванні аеросилу в рідкі системи спостерігається ефект загущення, у медицині та біотехнології вирішальне значення має той факт, що у водній фазі з поверхні аеросилу десорбуються всі раніше адсорбовані речовини. В ряді робіт (Гордієнко О.І., Постоєнко В.О., Ковтун В.А. та інш.) відмічено позитивний вплив на *Escherichia coli*, *Listeria*, *Bacillus subtilis* при використанні аеросилу А-300 у складі сахарозо-желатинового захисного середовища. Ґрунтуючись на результатах, отриманих при застосуванні аеросилу А-300 у складі захисних середовищ для бактерій зазначених вище родів нами проведено аналогічні дослідження при ліофілізації бактерій роду *Yersinia* [6–8].

Метою роботи було вивчення впливу захисного середовища з аеросилом в процесі ліофілізації та зберігання на досліджувані культури *Yersinia spp.*

¹Науковий керівник – д-р вет. наук, професор, академік НААН А. М. Головка.

Матеріали і методи. Об'єктом досліджень були 4 штами (*Yersinia enterocolitica* - 1 штама, *Yersinia pseudotuberculosis* – 2 штами, *Yersinia kristensenii* – 1 штама), виділені в Україні при проведенні бактеріологічних досліджень об'єктів ветеринарно-санітарного нагляду та 3 штами (*Yersinia enterocolitica*, *Yersinia ruckery* - 1 штама, *Yersinia kristensenii* – 1 штама), отримані з колекції “Microbiologos” (США).

Сублімаційне висушування проводили в апараті LP-3 фірми TelStar (Іспанія) з глибоким вакуумом 0,17 мВ і температурою конденсора 45-50 °С. Висушування проводили відповідно до «Методических рекомендаций по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов», (1981). Ліофілізовані культури контролювали за фізико-хімічними (зовнішній вигляд, колір, розчинність, наявність механічних домішок, ступінь вакууму у флаконах) біологічні (стерильність, культурально-морфологічні, біохімічні, концентрація живих клітин) показниками.

Дослідження по висушування культур *Yersinia spp.* в мовах вакууму із замороженого стану проводили за допомогою пристрою LP-3 компанії TelStar (вакуум - 0,17 мВ, температура конденсора 45-50 °С). Роботу виконували згідно до «Методических рекомендаций по разработке режимов замораживания-высушивания биологических препаратов» (1981), та методичних рекомендацій «Відновлення видових ознак ліофілізованих висушених штамів *E. coli* при тривалому зберіганні» [27] з використанням сахарозо-желатинового середовища, яке виготовляли відповідно до загальноприйнятої рецептури, а також захисного середовища, виготовленого з врахуванням результатів аспіранта ДНКІБШМ Ковтун В.А. стосовно розробки захисного середовища для ліофілізації культур роду *Listeria spp.* До складу захисного середовища Файбіча додатково внесено високодисперсний кремнезем двоокис кремнію (аеросилу А-300, з масовою долею діоксиду кремнію 99,9%, середніми розмірами частинок - 5-20 нм). З цією метою готували розчин аеросилу А-300 у дистильованій воді який стерилізували автоклавуванням (121 °С протягом 20 хвилин). Досліджували рівень збереженості культур за показником КУО в 1 см³, ліофілізованих з використанням контрольного середовища Файбіча (10% сахарози та 1% желатини) та дослідного (середовища Файбіча з 0,1% аеросилу); захисне середовище вносили до зависі мікробних клітин у співвідношенні 1:1 (за об'ємом). Збереженість культури визначали шляхом підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) до, після сублімації та через 12 місяців зберігання в однакових умовах (побутова холодильна камера 2-4 °С), а також обліковували культурально-морфологічні властивості досліджуваних культур у вказані періоди (кількість повторів - n=5). Вивчення культуральних властивостей проводили шляхом висіву дослідного мікроорганізму в рідкі (МПБ, бульйон Хоттінгера) та на щільні середовища (МПА, агар Хоттінгера, Ендо) і культивуванням за температури 25±1 °С та 37±1 °С протягом 24 годин. Морфологію культур вивчали шляхом виготовлення мазків з добової бульйонної та агарової культур і фарбуванням їх за Грамом. Біохімічну активність штаму визначали шляхом культивування в напіврідких середовищах Гісса з вуглеводами.

Результати й обговорення. Для дослідження по визначенню можливості використання нового пропису захисного середовища було відібрано штами *Yersinia enterocolitica* 27729 та 44/15 - 09, *Yersinia pseudotuberculosis* 108 та 197, *Yersinia ruckery* 29473, *Yersinia kristensenii* 33639 та 38/15-09.

Необхідно підкреслити, що всі відібрані для цих досліджень штами ієрсиній за культурально-морфологічними властивостями були типовими представниками відповідних видів, а штами *Yersinia enterocolitica* 27729, *Yersinia ruckery* 29473, *Yersinia kristensenii* 33639 – отримані з зарубіжної колекції (табл.).

Результати визначення КУО штамів *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia ruckery*, *Yersinia kristensenii* до висушування, після висушування та через 12 місяців зберігання (n=5, p<0,01)

Позначення штаму	КУО до висушування, в (мкЧ10 ⁸ /см ³)	КУО після ліофілізації, в (мкЧ10 ⁸ /см ³)			
		Файбіча		Файбіча+ аеросил 0,1%	
		Термін спостереження			
		0	12 міс.	0	12 міс.
<i>Y. enterocolitica</i> 27729	6,4 ±0,02	5,36 ±0,05	4,78 ±0,12	5,61±0,03	5,47±0,09
<i>Y. enterocolitica</i> 44/15-09	6,4 ±0,04	5,37 ±0,03	4,91 ±0,17	5,57±0,07	5,24±0,05
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 108	6,8 ±0,05	5,57 ±0,03	4,88 ±0,8	5,91±0,03	5,37±0,11
<i>Y. pseudotuberculosis</i> 197	6,7 ±0,03	5,63 ±0,05	5,12 ±0,08	5,96±0,05	5,25±0,07
<i>Y. ruckeri</i> 29473	5,9 ±0,06	4,83 ±0,03	4,02 ±0,02	5,34±0,03	5,07±0,12
<i>Y. kristensenii</i> 33639	6,5 ±0,05	5,47 ±0,08	4,85 ±0,15	5,96±0,03	5,37±0,05
<i>Y. kristensenii</i> 38/15-09	6,6 ±0,04	5,38 ±0,08	4,76 ±0,06	5,81±0,11	5,14±0,03
Середнє	6,47Ч10 ⁸	5,37Ч10 ⁸	4,76Ч10 ⁸	5,73Ч10 ⁸	5,27Ч10 ⁸
%	100	82,9	73,8	88,6	81,4

Аналіз результатів, наведених в таблиці, дає підстави вважати, що внесення до класичного захисного середовища Файбіча 0,1% аеросилу забезпечує більш ефективний рівень захисту усіх залучених до експериментів культур ієрсиній (різних видів) в середньому на 5,7% (тобто відразу після ліофілізації кількість життєздатних мікроорганізмів була вищою в середньому на 36 мільйонів мікробних клітин).

Результати визначення кількості життєздатних клітин через 12 місяців після ліофілізації мали аналогічну тенденцію. Так, на кінець періоду спостереження, кількість життєздатних мікроорганізмів, ліофілізованих у середовищі Файбіча знизилась в середньому на 26,2% (1,76 млрд. мкр. кл) в порівнянні з вихідною концентрацією, а у порівнянні з періодом «0» (відразу після ліофілізації) – на 17,1%, що становить 61 млн.мкр.кл. відповідно. В той же час, кількість життєздатних мікроорганізмів у культурах ієрсиній, ліофілізацію яких проводили у модернізованому захисному середовищі, через 12 місяців зберігання була значно вищою. Так, кількість життєздатних клітин через 12 місяців зберігання в середньому становила 5,27Ч10⁸, тобто знизилась на 18,6% (на 1,2 млрд. мкр. кл), у порівнянні з періодом «0» (відразу після ліофілізації) – на 11,4%, що становить 46 млн. мкр. кл. відповідно.

Іншими словами, наші дослідження підтвердили опубліковані раніше дані про можливість використання модернізованого шляхом внесення 0,1% аеросилу середовища Файбіча для підвищення рівня захисту культур при ліофілізації та тривалого збереження у ліофілізованому стані. Проте, в наших експериментах були використані інші біологічні об'єкти – культури *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia ruckery*, *Yersinia kristensenii*, що дає підстави розширити використання цього способу ліофілізації і на інші види мікроорганізмів.

Порівнюючи результати збереженості досліджених штамів ієрсиній через 12 місяців зберігання, ліофілізованих з використанням захисного середовища Файбіча та модернізованого захисного середовища, нами відзначено перевагу середовища що вміщувало 10% сахарози, 1 % желатини та 0,1% аеросилу, яка проявлялася у додатковому рівні збереження життєздатних клітин. Проте, рівень збереження коливався, що може пояснюватись особливостями біологічних властивостей використаних штамів ієрсиній (рис.).

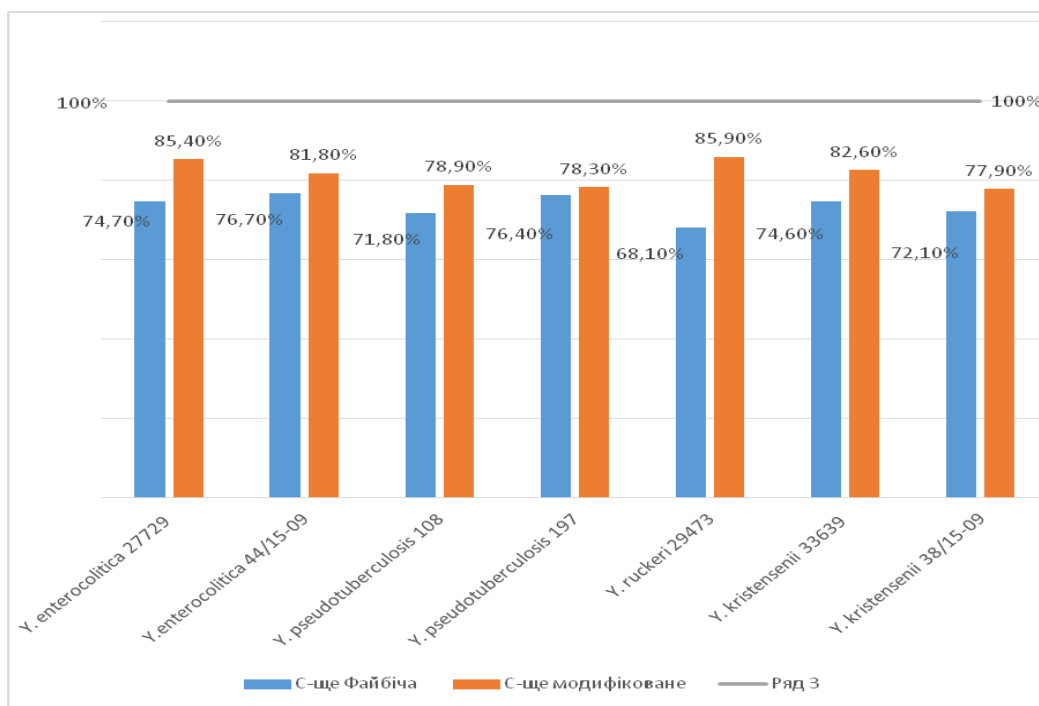


Рис. Динаміка збереженості *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia ruckeri*, *Yersinia kristensenii* після 12 місяців зберігання.

Окрім визначення кількості мікробних клітин, проводилися дослідження по визначенню біологічних властивостей штаму як після ліофільного висушування, так і через 12 місяців зберігання після ліофільного висушування.

Безпосередньо після ліофільного висушування культура не мала відмінностей в біологічних властивостях порівняно із результатами, що були визначенні перед сублімаційним висушуванням та від паспортних даних.

Результати вивчення біологічних властивостей штаму через 12 місяців зберігання свідчать про відсутність суттєвих змін в культурально-морфологічних властивостей. Проте, при дослідженні біохімічних властивостей зареєстровано зниження активності порівняно із контролем, що проявлялося у подовженому терміні ферментації вуглеводів.

Необхідно підкреслити, що в наших дослідженнях використовувались як референтні (*Yersinia enterocolitica* 27729, *Yersinia ruckeri* 29473, *Yersinia kristensenii* 33639 так і «польові» (отримані з об'єктів ветеринарно-санітарного контролю - *Yersinia enterocolitica* 44/15-09, *Yersinia pseudotuberculosis* 108 та 197, *Yersinia kristensenii* 38/15-09) штами ієрсиній. Тобто, набули розвитку результати наукових досліджень отриманих в попередні роки щодо використання аеросилу як компоненту захисних середовищ для ліофілізації з метою підвищення ефективності довготривалого зберігання в колекції НЦШМ.

ВИСНОВКИ

1. Таким чином, за результатами визначення рівня збереження тестових штамів ієрсиній підтверджено можливість використання розробленого раніше пропису захисного середовища (ефективність якого була доведена в експериментах з залученням штамів лістерій), використовувати для ліофілізації і зберігання мікроорганізмів із роду *Yersinia*.

2. Його використання забезпечувало достовірне підвищення збереженості відразу після ліофілізації в середньому на 5,7% після ліофільного висушування та 7,6% через 12 місяців зберігання.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення біологічних властивостей бактерій інших родів за застосування аеросилу А-300 у складі захисних середовищ.

STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECT OF THE MEDIUM WITH AEROSIL DURING LYOPHILIZATION AND STORAGE ON THE STUDIED CULTURES *YERSINIA SPP.*

A. Golovko, A. Ushkalov, L. Vygovska, V. Kovtun

State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms
30, Donetska str., Kiev, 03510, Ukraine

S U M M A R Y

The results of the effect of protecting the environment with the content of Aerosil during freeze-drying and storage on the studied cultures *Yersinia spp.* (Collection NCSM State Scientific Control Institute of Biotechnology and Strains of Microorganisms) during lyophilization and storage. The findings suggest the feasibility of using this protective environment in the process of freeze-drying and storage of crops *Yersinia spp.*

Keywords: YERSINIA, PROTECTIVE ENVIRONMENT AEROSIL, LYOPHILIZATION.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ С АЭРОСИЛ В ПРОЦЕССЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ И ХРАНЕНИЯ НА ИССЛЕДУЕМЫЕ КУЛЬТУРЫ *YERSINIA SPP.*

A. Н. Головки, А. В. Ушкалов, Л. Н. Выговская, В. А. Ковтун

Государственный научно-контрольный институт биотехнологии и штаммов
микроорганизмов
ул. Донецкая, 30, г. Киев, 03510, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты влияния защитной среды с содержанием аэросила в процессе лиофилизации и хранения на исследуемые культуры *Yersinia spp.* (коллекция НЦШМ ГНКИБШМ) в процессе лиофилизации и хранения. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности использования данной защитной среды в процессе лиофилизации и хранения культур *Yersinia spp.*

Ключевые слова: YERSINIA, ЗАЩИТНАЯ СРЕДА, АЭРОСИЛ, ЛИОФИЛИЗАЦИЯ,

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. Каталог культур: бактерії, мікоплазми, хламідії, дріжджоподібні гриби, міцеліальні гриби, культури клітин / уклад. О. П. Сельнікова [та ін.]; АМН України, Ін-т епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського АМН України, Музей патогенних мікроорганізмів. — К.: Знання України, 2003. — 35 с.

2. Гордиенко Е. А. Основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкаръ. — К.: Наук. думка, 1994. — 142 с.

3. Емцова Т. В. Влияние условий предварительного культивирования бактерий на их устойчивость и структуру клетки при замораживании и лиофилизации / Т. В. Емцова, Л. Н. Лаврова, Н. Д. Константинова // Микробиология. — 1991. — Т. 60, № 5. — С. 879–889.

4. *Нежута А. А.* Разработка научно–обоснованных режимов сублимационной сушки биопрепаратов / А. А. Нежута, Е. С. Сербис // Биотехнология. — 2001. — № 6. — С. 59–67.
5. *Цуцаева А. А.* Механизмы индукции и репарации нелетальных криповреждений / А. А. Цуцаева, А. О. Котляров, О. В. Кудокоцева [и др.] // Цитология. — 2004. — Т. 46, № 10. — С. 879.
6. Холодовой стресс и биологические системы / А. А. Цуцаева, Ю. Е. Микулинский, И. П. Высеканцев [и др.]. — К. : Наук. думка, 1991. — 176 с.
7. Криобиология и биотехнология / А. А. Цуцаева, В. Г. Попов, К. М. Сытник [и др.]. — К. : Наук. думка, 1987. — 215 с.
8. *Ценева Г. Я.* Лабораторная диагностика псевдотуберкулеза и иерсиниоза: Пособие для врачей. СПб., — 1997. — 61 с.
9. Конструювання захисного середовища для ліофілізації бактерій роду *Listeria* / В. А. Ковтун, В. О. Ушкалов, Л. М. Виговська, О. В. Мачуський // Вет. біотехнологія.

Рецензент — З. С. Клестова, д-р вет. наук, с. н. с., ДНКШІБ.