

**В. А. КОВТУН**, аспірантка

**В. О. УШКАЛОВ**, доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН

**Л. М. ВИГОВСЬКА**, кандидат ветеринарних наук

**О. В. МАЧУСЬКИЙ**

*Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м.Київ*

## **КОНСТРУЮВАННЯ ЗАХИСНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ БАКТЕРІЙ РОДУ *LISTERIA***

*У статті наведено експериментальні дані по застосуванню аеросилу А-300 в складі захисного середовища для сублімації мікроорганізмів роду *Listeria* виду *L. ivanovii*. Визначено вплив різних концентрацій аеросилу на збереженість мікробних клітин та мінливість біологічних властивостей під час ліофільного висушування. Визначено найкраще, серед дослідних варіантів, захисне середовище для культури *L. ivanovii*, яке забезпечило високу життєздатність та стабільність біологічних властивостей.*

*Ключові слова: ліофілізація, аеросил, захисне середовище, збереженість.*

Проблема зберігання мікроорганізмів, зі збереженням початкових біологічних властивостей, залишається актуальною, незважаючи на велику кількість досліджень проведених в цьому напрямку. Основними методами збереження на тривалий термін є консервування при позитивних температурах, висушування та заморожування. В останні роки висушування стало одним із надійних способів збереження біологічного матеріалу. Висушування поділяється на: висушування у вакуумі, висушування розпиленням за умов часткового вакууму та висушування в атмосфері гарячого повітря із розпиленого стану. Висушування із замороженого стану в умовах вакууму (ліофілізація, сублімація) являється найбільш поширеним методом консервування мікроорганізмів [1]. Цей процес потребує індивідуальних підходів з визначенням необхідних оптимальних параметрів для кожного виду бактерій, враховуючи їх потреби.

Важливе значення при сублімаційному висушуванні належить захисним середовищам, які впливають не тільки на самий процес, а й на збереження властивостей культури. Питання правильного вибору захисного середовища дуже важливе в роботі Національного центру штамів мікроорганізмів (НЦШМ), оскільки його робота пов'язана із постійним підтриманням у життєздатному стані колекції із понад 500 штамів. Загальноприйнятим, згідно літературних джерел та відповідно в роботі НЦШМ, кріопротектором є середовище Файбіча, що виготовляється за стандартною методикою [2,3]. Проводиться науковий пошук з метою створення захисних середовищ, що забезпечують високий рівень виживання клітин зі збереженням біологічних властивостей після ліофілізації та при довгостроковому зберіганні. Встановлено, що на ефективність захисного середовища впливає не лише якісний, а й кількісний його склад [4].

За ступенем стійкості до висушування лістерії належать до другої групи, що володіють середньою чутливістю до процесу сублімації та виходом життєздатних клітин до 30-70%. (Є.С Нікітін, І.В. Звягін) [1].

Є дані щодо конструювання середовища для висушування при виготовленні лістеріозної вакцини, в якій до сахарозо-желатинової основи додавався декстран. За даними авторів, це дало змогу при довгостроковому збереженні підвищити вихід життєздатних мікроорганізмів на 20% [5]. Також є дані по використанню нормальної сироватки коня в якості захисного середовища для лістерій, за результатами яких вихід живих клітин складав до 80% через дев'ять місяців зберігання в ліофільному стані [6].

Здійснюючи огляд літературних джерел, нас зацікавили експериментальні дані по використанню високодисперсних кремнеземів (діоксиду кремнію), а саме аеросилу, у складі захисних середовищ для різних бактерій. При цьому усі марки аеросилу представляють собою білі дрібнодисперсні аморфні порошки, що складаються із високочистого кремнію діоксиду. Його широке використання ґрунтується на таких властивостях, як нанорозмірні частинки, їх однорідність і сферична форма, висока ступінь чистоти.

Ще в XVII ст. Спалланцані встановив, що пісок (кремнію діоксид) являвся середовищем, необхідним для висушування коловраток, захищаючи їх від прямих дій зовнішніх факторів [1].

За даними О. І. Гордієнко, В. О. Постоєнка та ін., використання аеросилу А-300 в кількості 0,3% до сахарозо-желатинового середовища для *E.coli* підвищило показник мікроорганізмів, що вижили, порівняно з контрольними середовищами [7]. А. І. Осадча також описує позитивний вплив додавання аеросилу в кількості 0,1% до захисного середовища для *B.subtilis* [8]. Є дані про максимальну збереженість життєздатних клітин з використанням аеросилу (3%) в захисному середовищі для молочнокислих бактерій [9]. Таким чином, літературні дані свідчать про доцільність використання діоксиду кремнію у складі захисних середовищ. Проте, даних щодо безпосереднього впливу діоксиду кремнію на мікроорганізми, в доступній нам літературі, не знайдено.

Саме тому, враховуючи актуальність даного питання, нами було обрано даний напрямок досліджень на моделі: «захисне середовище – діоксид кремнію – *Listeria ivanovii*».

**Метою** досліджень було вивчення впливу діоксиду кремнію у складі захисного середовища на рівень збереженості мікроорганізмів роду *Listeria* після ліофілізації.

### **Матеріали і методи**

Для дослідження було використано штамп *Listeria ivanovii* 0811i із завідомих біологічними властивостями [10], отриманий із Національного центру штамів мікроорганізмів, високодисперсний кремнезем А-300 з наступними характеристиками:

- середній розмір частинок складає 5-20 нм;
- масова доля діоксиду кремнію 99,9%;
- питома поверхня по методу БЕТ  $300 \pm 30$  м<sup>2</sup>/г;
- масова доля великих частинок не більше 0,04%.

Об'єктом досліджень була збереженість мікроорганізмів під час сублимації, а також культурально-морфологічні, біохімічні та гемолітичні властивості штаму. Ліофільне висушування *Listeria ivanovii* 0811i проводили в апараті фірми «Telstar LP3» з глибоким вакуумом 0,17 мВ і температурою конденсора 45-50°C. Під час процедури сублимації в якості кріопротекторів було використано захисні середовища з різною концентрацією аеросилу А-300 (Таблиця 1). Розчин аеросилу А-300 готували на дистильованій воді та піддавали автоклавуванню за температури

121<sup>o</sup>C протягом 20 хвилин. Контрольним середовищем було середовище Файбіча (10% сахарози та 1% желатини). При цьому кріопротектор додавали до культури лістерій у співвідношенні 1:1. Дослід було виконано в 5 повторах.

Збереженість культури визначали шляхом підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) до і після сублимації та розрахунком відсотка збереженості за загальноприйнятою методикою [11]. Підрахунок КУО проводили в 5 повторах.

Таблиця 1

**Перелік варіантів захисних середовищ,  
що були використані для дослідження**

	Варіанти захисних середовищ		
	I-Аеросил + дистильована вода (А)	II- Файбіча + аеросил (Ф+А)	III- Контроль (середовище Файбіча)
Вміст аеросилу	0,001	0,001	
	0,005	0,005	
	0,01	0,01	
	0,02	0,02	
	0,1	0,1	
	0,15	0,15	
	0,2	0,2	
	0,3	0,3	

Отримані результати обробляли статистично та математично методами варіаційної статистики з використанням програми “Microsoft Excel – 7,0” із обчисленням середнього арифметичного (М), стандартної помилки (m), та рівня вірогідності (р) за таблицею Стьюдента. Для позначення кількості повторностей досліді використовували латинську літеру «n».

Вивчення культуральних властивостей проводили шляхом висіву дослідного мікроорганізму в рідкі (МПБ, ГРБ-бульйон та бульйон Хоттінгера) і на щільні середовища (МПА, ГРБ-агар, агар Хоттінгера, PALCAM та OXFORD) та культивуванням за температури 37±1<sup>o</sup>C протягом 24 годин.

МПБ, МПА, бульйон та агар Хоттінгера виготовляли із рН 7,2-7,4 за загально прийнятими методиками [12].

Для виготовлення ГРБ бульйону та агару використовували стандартизоване комерційне середовище «ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». При цьому МПБ та ГРБ-бульйон збагачували шляхом додавання 10 відсотків інактивованої сироватки крові коня та 1-го відсотка 40%-ї стерильної глюкози. Для виготовлення PALCAM та OXFORD використовували стандартизовані комерційні середовища HiMedia.

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 (глюкозою, мальтозою, сахарозою, лактозою, ксилізою, рамнозою) протягом 10 діб за температури 37±1<sup>o</sup>C.

Визначення гемолітичних властивостей проводили шляхом культивування на щільному середовищі з додаванням дефібринованої крові барана та проведенням CAMP-test з використанням двошарового кров'яного середовища за температури 37±1<sup>o</sup>C. Методику постановки проводили відповідно до ДСТУ ISO 11290 [13].

## Результати та обговорення

Попередньо, перед проведенням ліофілізації, культуру було досліджено за біологічними властивостями на відповідність до паспортних даних. В рідких поживних середовищах МПБ, ГРБ-бульйон та бульйон Хоттінгера культура *L.ivanovii* 0811i через 24 години культивування утворювала ріст у вигляді помутніння з невеликою кількістю білого осаду, а через 7 днів на дні пробірки утворювався осад, який при струшуванні піднімався у вигляді косички. На щільних середовищах МПА, ГРБ-агар, агар Хоттінгера культура мала вигляд округлих, напівпрозорих, випуклих колоній S-форми молочно-білого кольору з цільними краями та гладенькою поверхнею. На середовищі PALCAM був виявлений ріст темно-зелених колоній з чорним ореолом. На OXFORD агарі спостерігався ріст типових колоній сіруватого кольору чорним ореолом.

Добові колонії *L.ivanovii* 0811i під мікроскопом виглядали як грампозитивні дрібні короткі палички правильної форми з заокругленими кінцями. Розміщені в мазках поодинокі або в коротких ланцюжках у вигляді римської літери «V» чи штахетника. В мазках з рідкого середовища більшість мікроорганізмів мали кокоподібну форму.

Через 24 години культивування спостерігалася ферментація з утворенням кислоти без газу лактози, глюкози, мальтози, ксилози, слабка ферментація сахарози. Не спостерігалася ферментація рамнози.

При визначенні гемолітичних властивостей на кров'яному агарі культура *L.ivanovii* 0811i навколо колоній давала широку зону β-гемолізу.

У CAMP-test штам *L.ivanovii* 0811i давала позитивну реакцію з *Rhodococcus equi* у вигляді широкого стрілкоподібного гемолізу.

Отримані результати повністю відповідали паспортним характеристикам даного штаму.

Після проведення вищезгаданих досліджень, було накопичено бактеріальну масу штаму, визначено кількість КУО в 1 мл культури (Таблиця 2) та проведено серію процесів сублимації (n=5).

Таблиця 2

### Результати визначення кількості мікробних тіл та відсотку збереженості *L.ivanovii* 0811i до та після ліофільного висушування, (n=5).

Конц. аеросилу, %	I – Аеросил		II – Файбіча+Аеросил		III – Файбіча	
	Абс.к-ть, КУО	Збереженість, %	Абс.к-ть, КУО	Збереженість, %	Абс.к-ть, КУО	Збереженість, %
0,001	$(0,75 \pm 0,09) \times 10^8$	11,07±1,4	$(4,43 \pm 0,1) \times 10^8$	65,23±1,6	$(5,66 \pm 0,06) \times 10^8$	83,37±0,9
0,005	$(1,04 \pm 0,07) \times 10^8$	15,38±1,1	$(4,53 \pm 0,26) \times 10^8$	66,73±3,9		
0,01	$(1,27 \pm 0,02) \times 10^8$	18,68±0,4	$(4,36 \pm 0,14) \times 10^8$	64,13±2,1		
0,02	$(2,95 \pm 0,1) \times 10^8$	43,52±1,6	$(4,64 \pm 0,04) \times 10^8$	68,26±0,6		
0,1	$(3,15 \pm 0,15) \times 10^8$	46,37±2,3	$(5,91 \pm 0,03) \times 10^8$	87,05±0,5		
0,15	$(3,38 \pm 0,08) \times 10^8$	49,84±1,2	$(4,86 \pm 0,06) \times 10^8$	71,59±1,0		
0,2	$(3,78 \pm 0,11) \times 10^8$	55,62±1,7	$(3,51 \pm 0,14) \times 10^8$	51,76±2,1		
0,3	$(3,95 \pm 0,06) \times 10^8$	58,21±0,9	$(3,28 \pm 0,18) \times 10^8$	48,33±2,7		
До висушування		$(6,8 \pm 0,05) \times 10^8$				

Через 1,5 міс. після ліофільного висушування, штам *L.ivanovii* 0811i було повторно досліджено за показниками: кількість КУО в 1 см<sup>3</sup>, культурально-морфологічні, біохімічні, гемолітичні властивості.

Визначення кількості життєздатних клітин після процесу ліофільного висушування проводили методом серійних десятикратних розведень, а відсоток збереження визначали за наступною формулою:

$$\frac{\text{Кількість КУО після сублімації}}{\text{Кількість КУО до сублімації}} \times 100$$

У таблиці 2 та на рисунку 1 наведено результати досліджень, що відображають різнобічний вплив концентрацій аеросилу на збереженість культури, де найбільший вихід мікробних клітин та, відповідно, найвищий процент збереженості відмічено при використанні сахарозо-желатинового середовища із додаванням аеросилу А-300 в кількості 0,1% та склав (87,05±0,5), що достовірно ( $p < 0,01$ ) вище на 3,68% у порівнянні із контролем (83,37±0,9). Найгірші результати отримані при використанні в захисному середовищі лише 0,001%, 0,005% та 0,01% аеросилу А-300.

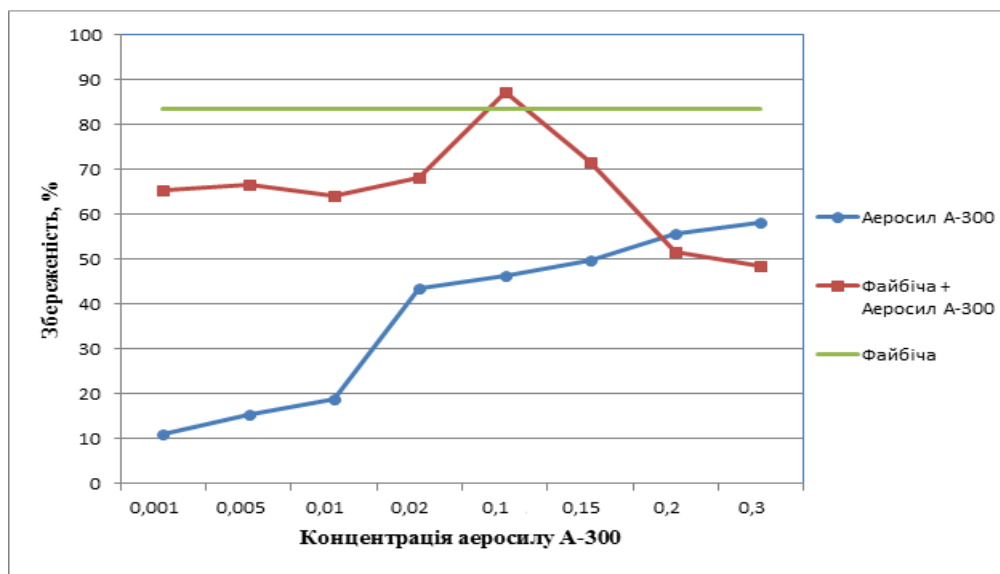


Рисунок 1 – Збереженість *L. ivanovii* 0811i після ліофільного висушування, (n=5).

Рівень збереженості, в залежності від концентрації аеросилу, у кріопротекторному середовищі варіанту I відображено на рисунку 2. Найвищий рівень збереженості спостерігається під час додавання 0,3 % аеросилу до захисного середовища, найменший – при 0,001% аеросилу, але у всіх випадках аеросил А-300 виявляв кріопротекторну дію прямо пропорційно до його концентрації, що дає підстави на подальші дослідження.

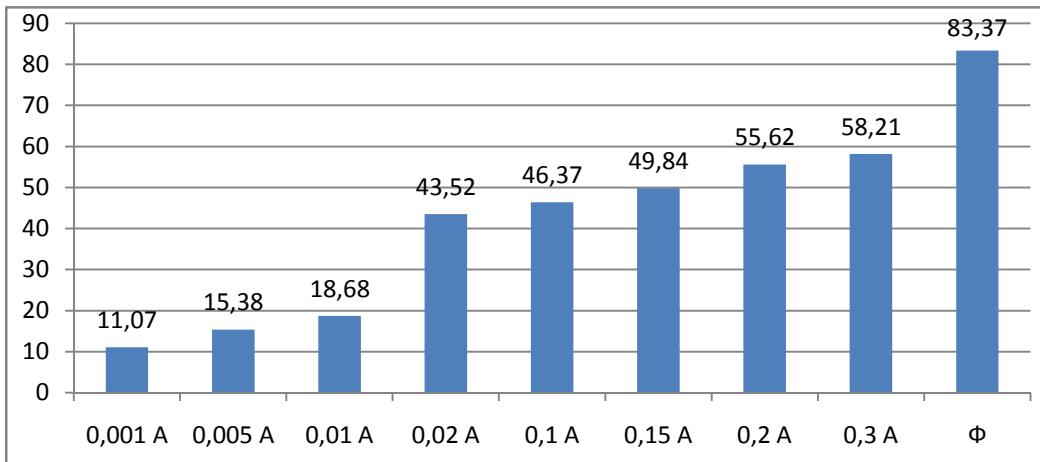


Рис. 2 – Залежність концентрації аеросилу А-300 на збереженість *Listeria ivanovii* 0811i

Характеристика культурально-морфологічних властивостей ліофілізованих зразків не мала відмінностей, не залежно від виду захисного середовища: культури в рідких поживних середовищах (МПБ, ГРБ-бульйон та бульйон Хоттінгера) через 24 години культивування утворювали ріст у вигляді помутніння з невеликою кількістю білого осаду, який на 7-му добу при струшуванні піднімався у вигляді косички.

На щільних поживних середовищах (МПА, ГРБ-агар та агар Хоттінгера) культури мали вигляд округлих, напівпрозорих, випуклих колоній S-форми молочно-білого кольору з цільними краями та гладенькою поверхнею.

При мікроскопії мазків виявлено грам-позитивні дрібні короткі палички правильної форми з заокругленими кінцями, що розміщувалися в мазках поодинокі або в коротких ланцюжках у вигляді римської літери «V» чи штахетника. В мазках з рідкого середовища культура мала також кокоподібну форму.

Результати визначення біохімічних та гемолітичних властивостей наведено в таблиці 3.

Зведені результати вказують, що відмінностей за цими показниками культура до та після ліофільного висушування з різними захисними середовищами (в т.ч. з контролем) не мала. Всі експериментальні зразки з однаковою активністю ферментували глюкозу, лактозу, мальтозу, ксилозу і слабо сахарозу, не ферментували рамнозу та мали позитивну реакцію з *Rhodococcus equi* при дослідженні на гемолітичні властивості

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1) Найбільш ефективним кріопротектором виявилось середовище із додаванням 10% сахарози, 1% желатини та 0,1 % аеросилу А-300, яке достовірно підвищило збереженість на 3,68%.

2) Не залежно від кількісного вмісту А-300 у складі захисного середовища, біологічні властивості штаму *L.ivanovii* 0811i залишилися без змін після ліофілізації та відповідали паспортним характеристикам.

**Біохімічні та гемолітичні властивості штаму *L.ivanovii* 0811i до та після сублімації, (n=5).**

Назва середовища		Біохімічні властивості						Гемолітичні властивості	
		Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Ксилоза	Сахароза	Рамноз	R.equi	S.aureus
Аеросил	0,001	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,005	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,01	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,02	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,1	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,15	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,2	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,3	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
Файбіча+аеросил	0,001	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,005	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,01	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,02	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,1	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,15	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,2	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,3	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
Контроль (Файбіча)		++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
До висушування		++++	++++	+++	+++	+	-	+	-

**Примітки:** ступінь ферментативної активності визначали візуально за системою чотирьох плюсів, де «+» – відповідає розчепленню 25%, «++» – 50%, «+++» – 75%, «++++» – 100% середовища Гісса після 48 годин культивування штаму, «-»- відсутність ферментації. Гемолітична активність : «+» – позитивна реакція; «-» – негативна реакція.

3) Пошук нових, більш ефективних захисних середовищ є одним з пріоритетних напрямків в питанні збереження мікроорганізмів.

4) Перспективними вбачаються подальші дослідження із вивчення впливу наноматеріалів на збереженість мікробних популяцій інших представників роду *Listeria* під час ліофільного висушування та підбору оптимальних їх співвідношень.

### Список використаної літератури

1. Никитин Е. Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов / Е. Е. Никитин, И. В. Звягин. – М. : – Колос, 1971. – 342 с.
2. Влияние низких температур на жизнеспособность бактерий *Y.pestis* EV76 / А. Н. Терентьев, В. В. Кадетов, М. И. Богданова и др. // Криобиология. – 1990. – № 2. – С. 52-53.

3. *Супотницький М. В.* Очерки истории чумы: в 2-х кн. Кн. II: Чума бактериологического периода / М. В. Супотницький, Н. С. Супотницькая. – М., 2006. – 696 с.

4. *Скрипник В. Г.* Оптимізація умов ліофілізації тест-культури *Pseudomonas aeruginosa* 27/99 за допомогою стабілізуючих середовищ / В. Г. Скрипник, О. І. Гордієнко, Д. О. Ординська // Ветеринарна біотехнологія. – 2005. – № 7. – С. 160-164.

5. Оптимизация защитной среды высушивания используемой при изготовлении живой сухой вакцины против листериоза сельскохозяйственных животных / И. В. Павленко, А. А. Раевский, А. А. Нежута и др. // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13, № 5 (3). – С. 171-175.

6. *Маничев А. А.* Изучение свойств культуры листерий при хранении в лиофилизированном состоянии / А. А. Маничев, Б. И. Шморгун // Эпизоотология, эпидемиология, средства диагностики, терапии и специфической профилактики инфекционных болезней, общих для человека и животных : материалы Всесоюзной конференции. – Львов, 1988. – С. 242-243.

7. Оптимізація параметрів стадії досушування процесу ліофілізації *E.Coli* 0-55 при використанні модифікованих захисних середовищ. / О. І. Гордієнко, В. О. Постоєнко, Л. Й. Кравецький та ін. // Ветеринарна медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Харків : ІЕКВМ, 2011. – Вип. 95. – С. 51-53.

8. *Осадчая А. И.* Влияние некоторых факторов на криорезистентность сохранение жизнеспособности при лиофилизации культур *Bacillus subtilis* / А. И. Осадчая, В. А. Кудрявцев, Л. А. Сафронова // Биотехнология. – 2002. – № 3. – С. 45-54.

9. *Гужвинська С.* Захисне середовище для ліофілізації молочнокислих бактерій / С. Гужвинська // Продовольча індустрія АПК. – 2011. – № 1. – С. 13-16.

10. *Ковтун В. А.* Порівняльне вивчення ізолятів роду *Listeria* з референтними штамми бельгійської колекції культур / В. А. Ковтун, В. О. Ушкалов, Л. М. Выговська ; Ін-т біології тварин, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок // Наук.-техн. бюл. – 2012. – Вип. 13, № 3-4. – С. 195-202.

11. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. – М. : Академия, 2005. – С. 100-110.

12. Справочник ветеринарного лаборанта / Ф. З. Андросов, И. Я. Беляев, Р. Т. Ключко и др.; под. ред. В. Я. Антонова. – М. – Колос, 1981. – С. 12-31.

13. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення : ДСТУ ISO 11290-1:2003 (ISO 11290-1:2003) – Увед. вперше ; чинний від 2003-10-02. – К. : Держспоживстандарт України, 2005. – IV, 18 с., включ. обкл. : табл. ; 29 см. – (Національний стандарт України).

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ЛИОФИ-ЛИЗАЦИИ БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA*** / В. А. Ковтун, В. А. Ушкалов, Л. Н. Выговская, А. В. Мачуский

*В статье приведены экспериментальные данные по использованию аэросила А-300 в составе защитной среды для сублимации микроорганизмов рода *Listeria* вида *ivanovii*. Изучено влияние разных концентраций аэросила на сохранность микробных клеток и изменчивость биологических свойств во время*



лиофильного высушивания. Определена наилучшая, среди опытных вариантов, защитная среда для культуры *L.ivanovii*, которая обеспечила высокую жизнеспособность и стабильность биологических свойств.

*Ключевые слова:* лиофилизация, аэросил, защитная среда, сохранность.

**CONSTRUCTION OF PROTECTIVE MEDIUM FOR FREEZE-DRYING BACTERIA *LISTERIA SPECIES*** / V. A. Kovtun, V. O. Ushkalov, L. M. Vygovska, O. V. Machys'kyu

*The article shows data of experimental usage of aerosil A-300 as part of a protective medium for sublimation of microorganisms of the genus *Listeria ivanovii*. The effect of different concentrations of aerosil on the preservation of microbial cells and variability of biological properties during lyophilic drying. Determined the best among the experimental variants protective medium for the *L. ivanovii* culture, which provided high viability and stability of biological properties.*

*Key words:* lyophilization, aerosil, protective medium, preservation.

**Рецензент** – кандидат ветеринарных наук **Н. Г. Пінчук.**