

Современное состояние проблемы криоконсервирования аспорогенных анаэробных бактерий

UDC 57.043:579.61

I.P. VYSEKANTSEV^{1*}, T.M. GURINA¹, A.L. KIRILYUK¹, E.V. KUDOKOTSEVA¹, S.V. BIRYUKOVA²

Current State in Cryopreservation of Asporogenic and Anaerobic Bacteria

Экспериментально обоснованы условия криоконсервирования аспорогенных анаэробных бактерий разных родов. Максимальную жизнеспособность в условиях экспериментов обеспечивала среда НЗТА с добавлением ДМСО и тиомочевины. Хранение образцов при температуре жидкого азота в течение 5 лет (срок наблюдения) не влияло на исходные биологические свойства бактерий.

Ключевые слова: криоконсервирование, анаэробные бактерии.

Експериментально обґрунтовані умови криоконсервування аспорогенних анаэробних бактерій різних родів. Максимальну життєздатність в умовах експериментів забезпечувало середовище НЗТА з додаванням ДМСО і тиомочевини. Зберігання зразків при температурі рідкого азоту протягом 5 років (термін спостереження) не впливало на вихідні біологічні властивості бактерій.

Ключові слова: криоконсервування, анаэробні бактерії.

The cryopreservation conditions for asporogenic anaerobic bacteria of different genera have been experimentally established. The NZTA medium provides a high viability at experimental conditions with adding DMSO and thiourea. The storage of samples at temperature of liquid nitrogen during 5 years (observation term) had no effect on initial biological properties of bacteria.

Key-words: cryopreservation, anaerobic bacteria.

Проблема гнойно-воспалительных инфекций приобрела социальную значимость в связи с их значительным распространением, трудностями диагностики, этиотропной терапии и специфической профилактики. Этиологическими агентами гнойно-воспалительных заболеваний наиболее часто являются аспорогенные анаэробные бактерии. Преимущественное количество анаэробных инфекций имеет эндогенный характер. Это обусловлено снижением иммунной реактивности макроорганизма и повышением множественной лекарственной устойчивости среди клинически значимых видов аспорогенных анаэробных бактерий [2, 5]. В связи с этим возросла необходимость создания коллекций клинических изолятов аспорогенных анаэробных бактерий, с помощью которых проводится эпидемиологический анализ участия разных родов и видов бактерий в заболеваемости населения, изучаются факторы вирулентности, патогенности и антибиотикорезистентности, исследуются механизмы патогенеза, разрабатываются рациональные схемы этиотропной терапии и специфической профилактики.

Наиболее распространенные методы хранения аспорогенных анаэробных бактерий – периодические пересевы с последующим хранением в условиях гипотермии под слоем минерального масла и лиофилизация [5]. Указанные методы имеют недостатки, приводящие к потере штаммов и контаминации хранящихся культур. Кроме того, срок хранения культур при использовании этих методов может быть ограничен. Для хранения аспорогенных анаэробных бактерий более перспективно криоконсервирование. Однако до настоящего времени технология криоконсервирования данных бактерий не разработана и недостаточно экспериментально обоснована вследствие сложности культивирования, необходимости соблюдения анаэробно-биоза при всех манипуляциях во время экспериментов. К тому же анаэробные бактерии не вырабатывают ферменты, расщепляющие токсические соединения кислорода, что является дополнительным повреждающим фактором.

Цель исследования – изучение влияния режимов охлаждения и состава защитной среды на жизнеспособность аспорогенных анаэробных бак-

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковская медицинская академия последипломного образования АМН Украины

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education of Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3126, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

терий различных родов; исследование жизнеспособности и сохранности их биологических свойств в процессе низкотемпературного хранения.

Материалы и методы

Объектом исследования служили клинические изоляты бактерий *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Fusobacterium necroforum*. Бактерии культивировали в течение 4 суток при 37°C на агаризированных средах [1] в анаэробных условиях. Газовая среда культивирования содержала 80% N₂, 10% H₂, 10% CO₂. Жизнеспособность бактерий определяли чашечным методом Коха [2]. В качестве среды консервирования применяли ростовую среду НЗТА с добавками менадиона, гемина, твина-80 [1]. При исследовании антиоксидантного действия тиомочевины последнюю добавляли в концентрации 2%. В экспериментах использовали ДМСО с конечной концентрацией 5, 10, 15%.

Образцы охлаждали по трем программам: 1 – охлаждение со скоростью 2°C/мин от 20 до –30°C с последующим погружением в жидкий азот; 2 – охлаждение со скоростью 2°C/мин от 20 до –30°C, затем со средней скоростью 20–25°C/мин от –30 до –80°C и погружение в жидкий азот; 3 – охлаждение со скоростью 2°C/мин от 20 до –30°C, затем со скоростью 1°C/мин от –30 до –80°C и погружение в жидкий азот.

Образцы замораживали в криопробирках (Nunc, США) объемом 1,8 мл на программном замораживателе “Cryoson” (Германия), отогревали на водяной бане при температуре 40°C.

Биологические свойства бактерий изучали по методикам, описанным в [1, 3–5].

При изучении возможного влияния колебаний температуры хранения на жизнеспособность криоконсервированных бактерий часть замороженных до –196°C образцов подвергали циклическому изменению температуры хранения. Один цикл – хранение образцов в течение 16 ч в жидком азоте с последующим переносом на 8 ч в пары жидкого азота при температуре –150 или –130, или –100°C, затем перенос образцов в жидкий азот.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым методам [6].

Результаты и обсуждение

Установлено, что наиболее высокой исходной криоустойчивостью обладают бактерии *P. anaerobius*. Количество жизнеспособных бактерий *B. fragilis* и *F. necroforum* после замораживания было достоверно ниже. При добавлении в среду консервирования НЗТА криопротектора ДМСО во всех использовавшихся концентрациях достоверно повышалась жизнеспособность бактерий изучаемых родов. Добавление в среду консервирования

антиоксиданта тиомочевины также обеспечивало повышение жизнеспособности бактерий после криоконсервирования. В экспериментах с использованием криопротектора ДМСО наиболее высокая жизнеспособность отмечена после охлаждения по программе 2. Количество жизнеспособных бактерий, охлажденных по программе 3, было достоверно ниже. Минимальные показатели жизнеспособности получены после охлаждения по программе 1.

Хранение при постоянной температуре жидкого азота образцов исследуемых видов бактерий в среде НЗТА и в среде НЗТА с добавлением димексида или тиомочевины дополнительной гибели бактерий в течение 5 лет (срок наблюдения) не вызывало.

При искусственно созданном циклическом колебании температуры хранения показано, что неоднократные циклы повышения температуры до –130 и –100°C приводили к дополнительной гибели клеток. Количество погибших клеток увеличивалось с повышением температурного градиента и возрастанием числа циклов колебания температуры. Изменение температуры хранения от –196 до –150°C к дополнительной гибели клеток не приводило.

Хранение образцов при постоянной температуре –196°C в течение 5 лет обеспечивало сохранность исходных генетически детерминированных свойств бактерий. Не изменялись способность к флюоресценции бактерий, характер роста на селективных средах, антибиотикочувствительность, а также синтез ферментов, которые участвуют в утилизации сахаров и многоатомных спиртов, продукции индола, сероводорода, каталазы, уреазы, редукции нитратов, гидролизе эскулина, крахмала и обеспечивают свертывание молока.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой эффективности технологии криоконсервирования при долгосрочном хранении аспорогенных анаэробных бактерий. Жизнеспособность аспорогенных анаэробных бактерий в процессе криоконсервирования зависит от исходных морфофункциональных свойств клеток, обусловленных принадлежностью к определенному роду или виду, а также от режима охлаждения, состава среды консервирования. Ростовая среда НЗТА обеспечивает высокие показатели жизнеспособности аспорогенных анаэробных бактерий в процессе криоконсервирования. При добавлении в эту среду антиоксиданта тиомочевины или криопротектора ДМСО увеличивается количество жизнеспособных криоконсервированных бактерий. В представленных исследованиях установлено, что режим охлаждения влияет на жизнеспособность бактерий при температуре ниже –40°C. Предполагается, что в субэвтектическом интервале температур воз-

можно кристаллизация раствора криопротектора эвтектической концентрации, в нашем случае раствора ДМСО. Скорость охлаждения в этом температурном интервале также влияет на формирование конечной структуры замораживаемого объекта и сохранность криоконсервированных клеток [7]. Колебания температуры хранения от -130°C и выше приводят к дополнительной гибели криоконсервированных клеток.

Выводы

1. Криоконсервирование обеспечивает высокую жизнеспособность и сохранность исходных биологических свойств аспорогенных анаэробных бактерий в течение срока наблюдения (не менее 5 лет).

2. На жизнеспособность криоконсервированных аспорогенных анаэробных бактерий влияют состав среды консервирования, режим охлаждения, родовые и видовые особенности строения и функциональной активности клеток. Высокие показатели сохранности исследованных криоконсервированных бактерий обеспечивала среда консервирования НЗТА с добавлением ДМСО в концентрации 5–10% и тиомочевина.

3. Достоверное влияние на жизнеспособность аспорогенных анаэробных бактерий оказывает скорость охлаждения в субэвтектическом интервале температур растворов криопротектора ДМСО. Наиболее высокая жизнеспособность бактерий была получена при охлаждении в этом интервале со скоростью $20\text{--}25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

4. Для долгосрочного хранения криолабильных бактерий необходимо поддержание стабильной температуры $-196\text{--}-150^{\circ}\text{C}$.

Исследование выполнено в рамках проекта Государственного фонда фундаментальных исследований Украины №14.4/027.

Литература

1. Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Т. та інш. Лабораторна діагностика гнійно-запалювальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаэробними мікроорганізмами: Методичні рекомендації.– Харків, 2000.– 35 с.
2. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов.– Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990.– 186 с.
3. *Определитель бактерий Берджи*. Т.1 / Под ред. Дж. Хоупта и др.– М.: Мир, 1997.– 432 с.
4. *Определитель бактерий Берджи*. Т.2 / Под ред. Дж. Хоупта и др.– М.: Мир, 1997.– 368 с.
5. Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под ред. акад. В.И. Покровского.– М.: ГЭОТАР – МЕД, 2001.– 768 с.
6. *Статистична обробка результатів біологічних експериментів*: Навч. посібник.– Донецьк, 1999.– 186 с.
7. Kyryliuk A.L., Osetsky A.I., Gurina T.M. Psysical substantiation of thee-step freeze-thawing as optimal regimen for changing temperature during biological system cryopreservation // Proceedings of the 43rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology CRYO 2006.– Hamburg, 2006.– P. 15.

Поступила 01.07.2008