

Опыт хранения аспорогенных анаэробных бактерий при температуре жидкого азота

И.П. ВЫСЕКАНЦЕВ, В.Ф. МАРЦЕНЮК, Е.В. КУДОКОЦЕВА, С.В. КОШИЙ, Т.Ф. ПЕТРЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Одно из ведущих мест в этиологии гнойно-воспалительных заболеваний человека занимают аспорогенные анаэробные бактерии [3, 10]. Существует острая потребность в создании коллекций клинических изолятов таких бактерий для разработки эффективных диагностических тест-систем, рациональных схем антибиотикотерапии и профилактических препаратов. В настоящее время в коллекциях микроорганизмов для хранения аспорогенных анаэробных бактерий используют метод пересевов. Информация о лиофилизации и криоконсервировании этих объектов отсутствует. По-видимому, это обусловлено тем, что анаэробные бактерии не вырабатывают ферменты, расщепляющие токсические соединения кислорода (каталаза, супероксид дисмутаза) [10], а, как известно, продукты перекисного окисления являются одним из повреждающих факторов, сопровождающих процессы замораживания – отогрева и лиофилизации [1, 4, 9, 12]. И оба способа консервирования данных микробов требуют разработки специальных подходов. Одним из таких подходов является внесение в среду консервирования антиоксидантов [2, 12].

Целью данного исследования являлось изучение возможности криоконсервирования и сохранности жизнеспособности и биологических свойств аспорогенных анаэробных бактерий после хранения при температуре жидкого азота в течение 3-х лет (срок наблюдения) в защитной среде с добавлением антиоксиданта.

Материалы и методы

Объектом исследования служили клинические изоляты бактерий *Bacteroides fragilis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium necroforum*, *Mobiluncus curtisii*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Veilonella parvule*. Выделение и идентификацию штаммов проводили в соответствии с положениями [3, 6, 7]. Выращивали бактерии на анаэробном гемагаре [3] в анаэроостате в трехкомпонентной газовой смеси (азот – 80%, водород – 10%, углекислый газ – 10%). Газовую среду в анаэроостате создавали с помощью газогенераторов Hi Gas Pack с низкотемпературными катализаторами Catalist (Himedia, Индия). Бактерии культивировали

Адрес для корреспонденции: Высеканцев И.П., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

в течение 4-х суток. Выросшие колонии бактерий снимали с поверхности агара бактериологической петлей и суспендировали в среде консервирования. В качестве среды консервирования использовали среду НЗТА с добавками менадиона, гемина, твина-80 [3]. В среду НЗТА добавляли в качестве антиоксиданта 2% тиомочевины (хч). Суспензии бактерий вносили по 1мл в криопробирки “Nunc”, которые дополнительно упаковывали по разработанному ранее способу [8]. Образцы замораживали до –196°С и хранили в жидком азоте в низкотемпературном хранилище ХБ-0,5. Отогревали образцы на водяной бане при 40°С. Жизнеспособность бактерий определяли “чашечным методом” Коха по количеству сформировавшихся макроколоний [5]. Биологические свойства бактерий изучали с использованием методик, описанных в [3]. Статистическую обработку полученных результатов проводили по общепринятым в биологии методам [11]. Достоверность расчетов 95%.

Результаты и обсуждение

Изучение сохранности количества жизнеспособных бактерий в процессе хранения при –196°С показало, что хранение при постоянной температуре жидкого азота в предложенной среде консервирования обеспечивает сохранность жизнеспособности аспорогенных анаэробных бактерий в течение 3-х лет (срок наблюдения). Количество жизнеспособных бактерий на 1мл суспензии всех изучавшихся штаммов после кратковременного хранения в течение 1 месяца (контроль) и последующих 3-х лет достоверно не отличалось (табл. 1).

Криоконсервирование обеспечивало также сохранность исходных генетически детерминированных биологических свойств всех штаммов бактерий. Не изменялись способность к флюоресценции колоний, выработка пигментов, рост на селективных средах, продукция различных ферментов, спектр сахаролитических ферментов, чувствительность к маркерным антибиотикам (табл. 2-4).

Выводы

Представленные результаты свидетельствуют о возможности применения криоконсервирования для длительного хранения аспорогенных анаэ-

Таблица 1. Жизнеспособность бактерий *Bacteroides fragilis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium necrophorum*, *Mobiluncus curtisii*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Veilonella parvule* после хранения при температуре жидкого азота в течение 3-х лет

Бактерии	Количество жизнеспособных клеток после хранения в течение :						
	1 месяца	1 года		2-х лет		3-х лет	
	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	P	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	P	$\bar{x} \pm S\bar{x}$	P
<i>B. fragilis</i>	$(4,0 \pm 0,5) \times 10^4$	$(3,9 \pm 0,8) \times 10^4$	0,05	$(3,8 \pm 0,6) \times 10^4$	0,05	$(3,8 \pm 0,6) \times 10^4$	0,05
<i>P. melaninogenica</i>	$(2,8 \pm 0,7) \times 10^3$	$(2,9 \pm 0,6) \times 10^3$	0,05	$(2,8 \pm 0,6) \times 10^3$	0,05	$(2,7 \pm 0,8) \times 10^3$	0,05
<i>F. necrophorum</i>	$(8,4 \pm 0,6) \times 10^3$	$(8,2 \pm 0,7) \times 10^3$	0,05	$(8,3 \pm 0,7) \times 10^3$	0,05	$(8,2 \pm 0,6) \times 10^3$	0,05
<i>M. curtisii</i>	$(3,5 \pm 0,5) \times 10^4$	$(3,0 \pm 0,8) \times 10^4$	0,05	$(3,2 \pm 0,9) \times 10^4$	0,05	$(3,1 \pm 0,8) \times 10^4$	0,05
<i>P. anaerobius</i>	$(2,1 \pm 0,4) \times 10^5$	$(2,0 \pm 0,6) \times 10^5$	0,05	$(2,0 \pm 0,7) \times 10^5$	0,05	$(2,0 \pm 0,8) \times 10^5$	0,05
<i>V. parvule</i>	$(6,8 \pm 0,7) \times 10^3$	$(6,3 \pm 0,7) \times 10^3$	0,05	$(6,2 \pm 0,9) \times 10^3$	0,05	$(6,4 \pm 0,5) \times 10^3$	0,05

Примечания: \bar{x} – среднее арифметическое; $S\bar{x}$ – среднее квадратичное отклонение; p – уровень доверительной вероятности между значениями x после хранения в течение 1 месяца и 1, 2, 3 лет.

Таблица 3. Сохранность биологических свойств бактерий *Mobiluncus curtisii* после хранения при температуре жидкого азота в течение 3-х лет

Биологические свойства		Срок хранения		
		До замораживания	1 месяц	3 года
Продукция	индола	–	–	–
	каталазы	–	–	–
	оксидазы	–	–	–
	NH ₄ из аргинина	+	+	+
Редукция нитратов		–	–	–
Гидролиз	эскулина	–	–	–
	крахмала	+	+	+
	гипурата	+	+	+
Продукция кислоты из	глюкозы	+	+	+
	мальтозы	+	+	+
	фруктозы	–	–	–
	рибозы	–	–	–
	крахмала	–	–	–
	лактозы	–	–	–
	манитола	–	–	–

Примечание: “+” – наличие признака; “–” – отсутствие признака

робных бактерий. Этот способ консервирования обеспечивает сохранность жизнеспособности и биологических свойств анаэробных бактерий.

Авторы выражают благодарность и признательность проф. Светлане Васильевне Бирюковой за консультативную и методическую помощь при выполнении работы.

Литература

1. *Актуальные проблемы криобиологии* / Под общ. ред. Н.С. Пушкаря и А.М. Белоуса. – К.: Наукова думка, 1981. – 608 с.
2. *Высеканцев И.П., Степанюк Л.В.* Влияние условий хранения на сахаролитические свойства криоконсервированных и лиофилизированных бактерий *Escherichia coli* // Пробл. криобиологии. – 1999. – №4. – С. 48-52.

Таблица 2. Сохранность биологических свойств бактерий *Bacterioides fragilis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium necrophorum* после хранения при температуре жидкого азота в течение 3-х лет

Биологические свойства		<i>B.fragilis</i>			<i>P.melaninogenica</i>			<i>F.necrophorum</i>		
		Срок хранения			Срок хранения			Срок хранения		
		до замора – живания	1 месяц	3 года	до замора – живания	1 месяц	3 года	до замора – живания	1 месяц	3 года
Флюоресценция		-	-	-	+	+	+	+	+	+
Рост на среде с желчью		+	+	+	-	-	-	-	-	-
Продукция	индола	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	сероводорода	+	+	+	-	-	-	+	+	+
	каталазы	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	уреазы	-	-	-	-	-	-	н/о	н/о	н/о
	пигмента	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Ферментация желатина		-	-	-	+	+	+	н/о	н/о	н/о
Редукция нитратов		-	-	-	-	-	-	н/о	н/о	н/о
Гидролиз	эскулина	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	крахмала	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Продукция кислоты из	глюкозы	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	арабинозы	-	-	-	-	-	-	н/о	н/о	н/о
	рибозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ксилозы	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	рамнозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	глицерола	-	-	-	-	-	-	н/о	н/о	н/о
	лактозы	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	целобиозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	мальтозы	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	мелибиозы	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	сахарозы	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	трегалозы	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	рафинозы	+	+	+	+	+	+	н/о	н/о	н/о
	салицина	-	-	-	-	-	-	-	-	-
мелецитозы	-	-	-	-	-	-	н/о	н/о	н/о	
Чувствительность к:	канамицину	R	R	R	R	R	R	S	S	S
	полимиксину	R	R	R	S	S	S	S	S	S
	ристомоцину	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Примечание: + наличие признака; - отсутствие признака; R – устойчивый; S – чувствительный; н/о – не определялся.

Таблица 4. Сохранность биологических свойств бактерий *Peptostreptococcus anaerobius* и *Veilonella parvule* после хранения при температуре жидкого азота в течение 3-х лет

Биологические свойства		Срок хранения					
		<i>P.anaerobius</i>			<i>V.parvule</i>		
		До замораживания	1 месяц	3 года	До замораживания	1 месяц	3 года
Продукция	индола	–	–	–	–	–	–
	сероводорода	+	+	+	+	+	+
	каталазы	–	–	–	–	–	–
	пигмента	–	–	–	–	–	–
Ферментация	желатина	–	–	–	–	–	–
	пептона до уксусной кислоты	+	+	+	+	+	+
Редукция нитратов		+	+	+	+	+	+
Гидролиз эскулина		–	–	–	–	–	–
Свертывание молока		–	–	–	–	–	–
Продукция кислоты из	глюкозы	+	+	+	–	–	–
	фруктозы	–	–	–	–	–	–
	лактозы	–	–	–	–	–	–
	мальтозы	+	+	+	–	–	–
	сахарозы	–	–	–	–	–	–

Примечание: “+” – наличие признака; “–” – отсутствие признака

- Дяченко В.Ф., Бірюкова С.В., Старобінець З.Т. та ін. Лабораторна діагностика гнійно-запалювальних захворювань, обумовлених аспорогенними анаеробними мікроорганізмами (Методичні рекомендації).– Харків, 2000.– 35 с.
- Литовская И.А., Аграненко В.А. Изменение индуцированного ионами железа перекисного окисления липидов мембран тромбоцитов при консервировании и криоконсервировании // Пробл. гематол.– 1982.–Т. 27, №10.– С. 24-28.
- Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К Ерошина.– Пущино.– 1990.– 186 с.
- Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т.1 / Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.– М: Мир, 1997.– 432 с.
- Определитель бактерий Берджи. Т. 2 / Под. ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.– М: Мир, 1997.– 368 с.
- Патент на винахід 37995, Україна, МПК⁷ с12 №1/04, А61L 2/18. Спосіб зберігання і транспортування біоматеріалу / І.П. Висеканцев, Т.М. Гуріна. Опубл. 15.01.2004. Бюл. №1.– С. 3.108.
- Перекисное окисление липидов и холодовой фактор / В.Ю. Куликов, А.В. Семенюк, Л.И. Колесникова.– Новосибирск: Наука, 1988.– 192 с.
- Поздеев О.К. Медицинская микробиология / Под. ред. акад. РАМН В.И. Покровского.– М., 2001.– 768 с.
- Приседський Н.Г. Статична обробка результатів біологічних експериментів : Навч. посіб.– Донецьк.– 1999.– 210 с.
- Matthes G., Hackensellner H.A., Richter E. The role of lipid peroxidation as a factor of cryoinjury // Cryobiology.– 1983.– Vol.20, N6.– P. 726-731.