

Таблица 3 - Лейкограмма у поросят, вакцинированных с натрия тиосульфатом

Поросята, вакцинированные с натрия тиосульфатом	Базофилы	Эозинофилы	П/яд	С/яд	Лимфоциты	Моноциты
1	1	8	6	29	50	6
2	1	9	10	26	51	3
3	2	9	8	24	53	4
М	1,33	8,67	8,00	26,33	51,33	4,33
М	0,577	0,577	2,000	2,517	1,528	1,528
Р в-с	0,686	0,804	0,145	0,006	0,005	0,468
Р к-с	0,274	0,012	0,092	0,104	0,029	0,184

Заключение. Уменьшение количества лимфоцитов крови у животных, вакцинированных с натрия тиосульфатом, по-видимому, связано с трансформацией В- лимфоцитов в плазматические клетки.

Достоверное увеличение числа сегментоядерных лейкоцитов в лейкограмме крови у поросят, вакцинированных с применением натрия тиосульфата, по сравнению с животными, вакцинированными без него, говорит о том, что натрия тиосульфат стимулирует пролиферацию клеток крови нейтрофильного ряда, которые способствуют очищению организма от антигенных раздражителей и выделяют биологически активные вещества, стимулирующие восстановление поврежденных тканей.

Литература. 1. Русалеев В.С., Бактериальные вакцины в свиноводстве /В.С. Русалеев, В.М.Гневашев, О.В.Прунтова//Ветеринария. – 2001. - №6 – С. 18-21. 2. Карпуть И.М., Гематологический атлас сельскохозяйственных животных. – Мн.: Ураджай, 1986. -183 с. 3. Тузова – Юсковец Р.В., Классическая и современная иммунология. /Р.В. Тузова – Юсковец, Н.А.Ковалев – Минск: Беларус. Навука, 2006. – 691 с. 4. Заволока А.А. Патогенетические аспекты гемо- и иммунодепрессивных состояний при инфекционной патологии и их коррекция /А.А.Заволока // Повышение продуктивности сельскохозяйственных животных: Тез. докл. науч. конф. –Харьков, 1991. – С. 120 – 121. 5. Воронин Е.С., Петров А.М., Серых М.М. Девристов Д.А., Иммунология/ Под ред. Е.С.Воронина, - М.: Колос - - Пресс, 2002. – 408с. 6. Мельникова Н.В. Фармакодинамика иммуностимуляторов при вакцинации поросят / Н.В.Мельникова// Международный вестник ветеринарии.–2008.- №2.–С.47–48 7. Красочко П.А. Современные подходы к классификации иммуностимуляторов /П.А.Красочко// Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2006. – №2. – С.35 – 40.

Статья передана в печать 22.02.2012 г.

УДК 619 : 579.834.115

ПОДБОР ПРОТЕКТОРОВ ДЛЯ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЛЕПТОСПИРОЗНЫХ БАКТЕРИЙ

*Зайцев В.В., **Дремач Г.Э., **Зайцева А.В.

*УП «Витебская биофабрика»

** УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

Для длительного сохранения культур производственных штаммов лептоспир подобраны протекторы, обеспечивающие их жизнеспособность в процессе длительной консервации при температуре -60°C. Лучшими протекторами явились желатин и бутафосфан.

For persistent cultivation of leptospirae strains some protectors have been selected which maintain their viability at -60°C. The best protectors are gelatin and butofosphan.

Введение. В процессе промышленной ферментации, при использовании в составе многокомпонентных препаратов и при длительном хранении бактерии постоянно подвергаются стрессовым воздействиям, включающим экстремальные температуры, повышение концентрации солей, воздействие кислорода и других факторов. Такие технологические приемы как охлаждение, замораживание, лиофилизация, распылительная сушка и термообработка могут вызвать структурные и физиологические повреждения бактериальных клеток и привести к существенной потере жизнеспособности и биологической активности культур.

Клеточная поверхность бактерий является первым барьером, защищающим микроорганизмы от антимикробных веществ и стрессов, вызванных изменениями в окружающей среде.

В окружающей среде бактерии постоянно подвергаются стрессовым воздействиям низкими или высокими температурами, недостатку питательных веществ, низким и высоким рН, различных токсических соединений и т.д. Стрессовые воздействия индуцируют в клетке процессы, способствующие выживанию в неблагоприятных условиях – изменяется уровень транскрипции определенных генов, усиливается синтез специфических стрессовых белков [15].

В ответ на воздействие как высоких температур, так и высоких концентраций соли индуцируется синтез одних и тех же шоковых белков. Синтез белков гликолитического цикла также индуцируется и низкими температурами.

Выявлены различия в спектре ферментов микроорганизмов, находящихся в условиях анабиоза и физиологической активности [1, 4, 6, 7].

Для сохранения жизнеспособности бактериальных клеток в условиях адаптации к стрессовым воздействиям особенно важна роль ферментных белков клеточной поверхности микроорганизмов.

По настоящее время для поддержания фонда культур лептоспир в жизнеспособном состоянии используют метод периодического пересева на питательные среды. В ведущих же коллекциях мира для длительного хранения промышленно-ценных культур применяют методы лиофилизации и криоконсервации с использованием жидкого азота ($t -196^{\circ}\text{C}$) или ультранизких морозильников ($t -40-70^{\circ}\text{C}$).

Метод криоконсервации имеет ряд преимуществ, поскольку сохраняемые таким образом микроорганизмы могут использоваться в технологическом процессе сразу же после отогрева, в то время как применение лиофилизированных объектов требует длительной процедуры репарации. В связи с этим перспективным направлением является разработка технологии криоконсервации лептоспирозных бактерий, т.е. низкотемпературного консервирования с криопротекторами, не требующими их удаления из клеточной суспензии перед использованием в ветеринарной медицине.

Сложность низкотемпературного консервирования микроорганизмов заключается в том, что необходимо подбирать условия не только для каждого вида, но часто и для разных штаммов одного и того же вида, поскольку их индивидуальная устойчивость к холоду различна. Перед замораживанием культуры должны быть выращены на оптимальной питательной среде до зрелой стадии развития, так как плохо развитые лептоспиры не выдерживают воздействия низких температур. Необходимо знать наиболее подходящие скорости замораживания и оттаивания, правильно выбрать температуру хранения, использовать эффективные криопротекторы, поскольку ни одна защитная среда не может быть универсальной.

Процесс оттаивания замороженного материала считается более опасным для микроорганизмов по сравнению с предшествующим охлаждением, причем процент гибели микробных клеток зависит от взаимосвязанного влияния минимальной температуры охлаждения, скоростей охлаждения и отогрева микробной суспензии, а также от среды суспендирования. Это доказано при замораживании микроорганизмов, принадлежащих к разным систематическим группам и отличающихся разной степенью криорезистентности [2].

Когда установлены оптимальная скорость замораживания и оттаивания, температура хранения, используются эффективные криопротекторы, культуры микроорганизмов могут сохраняться длительное время без морфологических, физиологических и генетических изменений [16].

Криопротекторами принято называть вещества, которые при их добавлении в суспензию клеток обладают способностью повышать устойчивость микроорганизмов к криоповреждениям, увеличивают их выживаемость при заморозке и последующем отогреве.

Отдельные представители лептоспир обладают низкой устойчивостью к криоконсервированию [5, 8, 9, 10, 13, 18]. По данным отдельных авторов [3, 11, 19] в качестве криопротекторов для культур лептоспир были использованы следующие химические соединения:

- диметилсульфоксид (ДМСО) 5% об., $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$, $M_m = 78,13$ – в криобиологии широко используется как эффективный, быстро проникающий в клетки криопротекторный агент [14];

- глицерол, 10% об. $(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{OH})_3$, $M_m = 92,09$ [12] – скорость его проникновения в клетки несколько ниже, чем у ДМСО;

- лактоза 10%, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11} \cdot \text{H}_2\text{O}$, $M_m = 360,31$ – дисахарид с низкой скоростью проникновения в клетки [10].

Кроме того, криопротекторным действием обладают декстраны, крахмал, поливинилпирролидон (ПВП), а также многокомпонентные вещества, в том числе такие, как молоко, яичный желток, элективные среды, мясо-пептонный бульон и др. [11].

Несмотря на то, что криопротекторы являются предметом многочисленных исследований во всем мире на протяжении более чем пятидесяти лет, механизм их действия окончательно не установлен. Среди наиболее вероятных приводятся следующие:

- подавление возрастания концентрации солей в растворах;
- снижение поражения поверхности клеток при дегидратации;
- уменьшение количества кристаллов образующегося льда внутри клетки.

Для криопротекторов внутриклеточного действия важно определение отрезка времени после смешивания с бактериальной суспензией, необходимого для эффективного проникновения протектора в клетку. Этот отрезок времени называют эквilibрацией. Если время эквilibрации слишком велико, это, как правило, приводит к токсическому действию криопротектора на микроорганизм. Оптимальное время эквilibрации устанавливается эмпирически для каждого вида клеток [17].

Цель настоящих исследований – произвести подбор криопротекторов для лептоспирозных бактерий разных серогрупп, обеспечивающих их жизнеспособность при длительном хранении в состоянии «холодового анабиоза».

Материал и методы исследований. В работе использовали следующие производственные штаммы лептоспир: *Leptospira pomona* ВГНКИ-6; *Leptospira tarassovi* ВГНКИ-4.

Для культивирования лептоспир в опыте использовали следующие питательные среды: сывороточную среду (СС) и сывороточную модифицированную среду с фактором роста (ССФР).

С целью получения сыворотки кровь у баранов брали в стерильные бутылки вместимостью 3-5 дм³. После свертывания крови бутылки встряхивали для отделения кровяного сгустка от стенок и помещали для отстоя сыворотки на 24 часа при температуре 2-10⁰С. Отстоявшуюся сыворотку сливали в стерильные бутылки, которые помещали в водяную баню с температурой 57-58⁰С и прогревали при периодическом перемешивании в течение 30 минут.

Инактивированную сыворотку фильтровали через осветляющие и стерилизующие фильтры.

На основе приготовленной сыворотки в дальнейшем готовили соответствующие питательные среды.

Для посева культуру лептоспир из одной пробирки переносили в 4-5 пробирок, содержащих по 8-10 см³ питательной среды.

Для оценки влияния концентрации лептоспир на криорезистентность их выращивали далее на СС и ССФР. Срок культивирования – 7 и 10 суток.

Разные сроки выращивания лептоспир также необходимы при определении их криорезистентности.

Подвижность и морфологию микроорганизмов изучали в темном поле микроскопа при увеличении 40 x 7-10.

В образцы культур добавляли протекторы. В качестве последних использовали ДМСО, 5% глицерол, 10% лактозу, 0,5-2,0% желатин, 0,001-0,005% бутофосфан и 5% сахарозу. Контролем служили образцы нативной культуры.

Флаконы с культурой выдерживали 2 часа при температуре +4°C, затем помещали в низкотемпературную морозильную камеру в этанол при температуре -60°C. Для определения жизнеспособности культур и эффекта действия протекторов образцы отбирали через 1, 3, 6 и 12 месяцев. Размораживали культуры в воде, подогретой до температуры +37°C.

Извлеченную из флаконов культуру лептоспир пересевали на сывороточную среду. Для определения жизнеспособности готовили разведения лептоспир и засевали на плотную сывороточную среду.

Микроскопически в размороженных культурах лептоспир изучали морфологию, количество клеток в поле зрения микроскопа и их подвижность.

Через 15 суток на плотной сывороточной питательной среде учитывали количество колоний и рассчитывали количество жизнеспособных клеток.

Результаты исследований. В ходе проведенной работы нами установлено что, несмотря на некоторые отличия в результатах исследований, все испытанные штаммы лептоспир достоверно низкоустойчивы к действию низких температур и могут быть заложены на хранение только после подбора криопротекторов.

Так, низкоконцентрированные культуры лептоспир (табл. 1), так же как и высококонцентрированные (табл. 2) без протекторов были способны достигать первоначальной концентрации через 10 суток после посева на свежие среды соответственно после 3 и 6 месяцев консервации.

В первоначальных опытах было установлено, что ДМСО и лактоза при добавлении к культурам лептоспир вызывают снижение их жизнеспособности, и они были исключены из дальнейших исследований.

Из данных, помещенных в таблицах 1 и 2, видно, что испытанные криопротекторы по-разному влияют на криорезистентность лептоспир.

Наиболее выраженный защитный эффект отмечался при использовании желатина и бутофосфана. При этом предпочтительно в культуру добавлять до 1,0% желатина или 0,0025% бутофосфана.

Глицерол не повышал криорезистентность культур лептоспир вообще, а сахароза даже снижала жизнеспособность клеток относительно контроля.

Низкоконцентрированная культура лептоспир в присутствии 1% желатина через 3, 6 и 12 месяцев сохраняла соответственно $42,2 \pm 1,8$ млн. м.к./см³, $36,8 \pm 1,8$ млн. м.к./см³ и $15,5 \pm 0,7$ млн. м.к./см³.

Жизнеспособность культур лептоспир в присутствии 1% желатина через 3, 6 и 12 месяцев составила соответственно 51,8%, 39,6% и 15,4%. При этом через 3, 6 и 9 месяцев криохранения пересейанные культуры через 10 суток давали хороший рост.

Из высококонцентрированной культуры лептоспир, выращенных на модифицированной среде (табл. 2) в присутствии 1% желатина через 3, 6 и 12 месяцев криоконсервирования сохранялось соответственно $436,0 \pm 18$ млн. м.к./см³, $356,1 \pm 15$ млн. м.к./см³ и $134,0 \pm 6,2$ млн. м.к./см³.

Высококонцентрированные культуры лептоспир через 3, 6 и 9 месяцев криохранения и последующего посева на свежие среды через 10 суток обеспечивали хороший рост. Их жизнеспособность была на уровне 29,2-52,2%.

Использование желатина как в более низкой (0,5%), так и более высокой (2%) концентрациях нецелесообразно, так как отмечается более низкая криорезистентность клеток, чем при его 1,0%-ной концентрации.

Из данных таблиц 1 и 2 явствует, что бутофосфан, особенно в оптимальной концентрации (0,0025%), существенно повышает устойчивость лептоспир к стрессам. При этом повышается устойчивость лептоспир к лизису.

Повышение жизнеспособности лептоспир, очевидно, происходит за счет того, что бутофосфан обеспечивает стабильность клеточных ферментов.

Следует отметить, что глицерол в процессе замораживания и оттаивания проявлял токсичность и поэтому относительно контроля не повышает резистентность лептоспир в процессе криоконсервации.

Таким образом, опыты по криоконсервированию лептоспир показали, что при использовании протекторов (желатин, бутофосфан) повышается их устойчивость к воздействию низких температур за счет снижения их лизиса и повышения жизнеспособности. Данный способ хранения может успешно применяться в биотехнологии наряду с традиционно используемым методом периодического посева, поскольку значительно экономит время, исключает возможность диссоциации и контаминацию лептоспирозных бактерий.

Таблица 1 – Влияние разных криопротекторов на криорезистентность лептоспир, выращенных на сывороточной питательной среде

Наименование штаммов	Наименование криопротектора	Концентрация криопротектора, %	Количество лептоспир											
			до замораживания		после 1 мес. замораживания		после 3 мес. замораживания		после 6 мес. замораживания		после 9 мес. замораживания		после 12 мес. замораживания	
			млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ромона	без протектора	-	92,0±2,4	66,2	26,3±1,4	39,1	23,6±0,6	30,2	18,2±0,8	22,2	8,6±0,3	10,8	4,3±0,2	0
	глицерол	5,0			20,1±0,6	25,5	16,4±0,4	22,3	9,6±0,2	10,8	6,8±0,2	4,2	4,1±0,2	0
	сахароза	5,0			18,2±0,4	23,2	15,3±0,3	8,5	13,5±0,4	0	-	-	-	-
	желатин	0,5			40,2±1,5	48,4	30,6±1,0	30,2	23,5±0,8	18,5	11,3±0,3	14,8	9,4±0,3	8,4
		1,0			50,6±2,0	62,2	42,2±1,8	51,8	36,8±1,8	39,6	20,5±0,8	27,5	15,5±0,7	15,4
		2,0			46,8±2,4	51,8	38,5±1,6	36,4	31,6±1,2	30,5	16,8±0,6	18,8	10,8±0,7	10,2
	бутофосфан	0,001			50,1±1,8	58,6	45,2±2,8	55,5	38,2±1,5	50,8	22,8±0,6	26,6	16,6±0,4	18,2
		0,0025			56,2±2,8	66,5	50,4±1,6	64,2	43,5±2,5	56,2	28,5±1,2	35,8	22,8±0,8	21,4
		0,005			52,5±2,4	60,4	46,8±2,4	56,8	33,5±2,0	46,8	22,0±0,5	24,3	15,1±0,7	18,6
Tarassovi	без протектора	-	96,2±3,4	76,6	26,8±1,8	44,0	23,3±0,8	35,8	18,6±0,4	24,8	10,5±0,5	12,5	7,2±0,4	0
	глицерол	5,0			22,3±1,0	26,8	18,8±0,8	23,0	10,2±0,5	9,6	6,3±0,3	5,8	5,2±0,4	0
	сахароза	5,0			20,8±0,5	25,3	16,6±0,6	10,8	11,8±0,5	0	-	-	-	-
	желатин	0,5			43,8±1,6	48,6	32,4±1,2	32,2	25,8±0,8	21,5	14,0±0,5	15,4	10,4±0,5	12,2
		1,0			53,2±2,3	61,6	45,5±1,5	52,5	40,5±1,8	38,4	22,5±0,6	26,8	17,5±0,6	17,8
		2,0			48,9±2,0	52,4	40,8±1,8	37,5	32,6±1,0	29,8	18,2±0,5	18,2	13,3±0,4	13,5
	бутофосфан	0,001			51,3±2,2	59,3	46,6±2,4	54,8	37,7±1,2	48,6	21,5±0,4	26,1	15,5±0,5	17,8
		0,0025			58,5±3,0	68,3	52,3±2,6	65,7	45,3±2,0	58,2	30,4±1,6	36,5	24,5±1,0	22,5
		0,005			53,8±2,8	64,0	47,2±2,6	52,3	35,2±1,6	45,5	23,3±0,8	23,2	16,6±0,6	18,2

Таблица 2 – Влияние разных криопротекторов на криорезистентность лептоспир, выращенных на модифицированной сывороточной питательной среде

Наименование штаммов	Наименование криопротектора	Концентрация криопротектора, %	Количество лептоспир											
			до замораживания		после 1 мес. замораживания		после 3 мес. замораживания		после 6 мес. замораживания		после 9 мес. замораживания		после 12 мес. замораживания	
			млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%	млн/см ³	%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Ромона	без протектора	-	862±43,0	91,0	276,2±15,6	56,0	232,2±12,8	33,8	168,3±8,4	24,8	108,2±3,2	15,6	52,8±2,8	10,8
	глицерол	5,0			224,2±12,0	36,2	158,4±7,6	20,6	92,6±4,8	12,6	40,6±2,2	6,2	23,3±2,0	3,2
	сахароза	5,0			212,8±8,2	30,6	148,3±10,0	10,6	108,4±6,2	6,2	58,8±2,5	5,6	29,8±2,2	0
	желатин	0,5			440,6±20,2	48,1	326,2±18,0	32,3	238,0±12,0	20,2	126,0±6,6	15,5	82,2±4,0	10,6
		1,0			564,0±22,0	60,4	436,0±18,0	52,2	356,1±15,0	40,5	188,2±8,0	29,2	134,0±6,2	18,5
		2,0			466,1±20,0	50,6	382,0±15,0	38,1	312,0±15,0	31,6	162,1±8,0	20,1	112,4±4,8	10,4
	бутофосфан	0,001			512,2±18,0	57,5	456,1±22,0	56,2	378,5±18,0	51,4	202,1±14,0	27,8	146,6±8,6	17,6
		0,0025			582,1±28,0	62,8	522,6±26,0	61,0	446,0±24,0	55,5	266,3±14,0	34,2	218,5±12,0	22,1
		0,005			532,0±22,0	58,4	462,3±22,0	57,5	372,2±15,0	48,2	205,5±12,0	25,1	136,3±10,0	18,2
Tarassovi	без протектора	-	912±58,0	89,9	288,2±15,4	57,3	245,3±14,0	33,1	177,5±8,8	25,3	115,8±5,6	16,8	58,2±3,2	11,2
	глицерол	5,0			262,4±12,0	38,4	172,2±10,4	22,8	115,6±8,4	14,2	58,4±8,2	7,6	25,8±2,0	4,5
	сахароза	5,0			248,2±10,0	32,3	155,8±8,8	12,8	114,2±6,4	7,8	56,5±2,8	4,9	35,3±2,6	0
	желатин	0,5			452,0±22,0	49,0	338,4±24,0	31,7	256,3±18,0	22,5	132,1±8,2	16,2	91,1±4,2	12,2
		1,0			578,8±20,0	61,3	450,2±18,0	53,1	372,0±16,0	41,8	196,4±10,8	30,6	152,0±9,4	19,3
		2,0			471,8±24,0	52,4	390,8±16,0	37,6	325,0±15,0	32,4	175,5±9,0	20,8	122,2±6,6	11,6
	бутофосфан	0,001			505,8±16,0	58,2	460,2±20,0	55,4	385,4±16,0	50,5	209,0±11,0	28,4	153,0±9,2	17,2
		0,0025			590,2±30,0	62,1	530,5±24,0	60,5	451,0±26,0	56,1	274,4±12,0	33,7	227,7±16,0	22,6
		0,005			528,5±21,0	58,4	471,3±18,0	56,8	386,6±16,0	47,5	212,1±11,0	24,7	140,1±11,0	18,5

Заключение. Наряду с субкультивированием для длительного гарантированного сохранения целесообразно проводить криоконсервацию штаммов лептоспирозных бактерий.

Для увеличения срока хранения культур лептоспир в замороженном состоянии следует использовать в качестве криопротектора желатин или бутофосфан в оптимально подобранных концентрациях.

Литература 1. Биологически активные соединения бифидобактерий: продукция и свойства / Н.И. Астапович [и др.] Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы III Московского международного нар. конгресса, Москва, 14-18 марта 2005 г. / ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. – Москва, 2005. – Ч.2. – С. 82-83. 2. Бланков, Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б.И. Бланков, Д.Л. Клебанов. – М.: Медгиз, 1961. – 263 с. 3. Важинская, И.С. Лиофилизация – эффективный метод длительного хранения дейтеромицетов / И.С. Важинская, А.В. Кантерова // Современное состояние и перспективы развития микробиологии и биотехнологии: материалы междунар. науч. конф., Минск-Раков, 1-2 июня 2006 / НАН Беларуси. Ин-т микробиол.; редкол.: Алещенкова З.М. [и др.]. – Минск, 2006. – С. 26-27. 4. Влияние источника углерода на рост и продукцию гликозидов молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* / В.В. Денисенко [и др.] // Перспективы и проблемы развития биотехнологии в реальных условиях единого экономического пространства стран содружества: материалы Междунар. науч.-практ. конф., Минск-Нарочь, 25-28 мая 2005 г. / Бел. гос. ун-т; сост. и общ. ред. А.Н. Евтушенко. – Минск, 2005. – С. 57-58. 5. Оптимизация защитных сред для хранения актиномицетов в жидком азоте / С.Н. Филиппова [и др.] // Микробиология. – 2007. – Т. 76, №4. – С. 573-576. 6. Особенности роста и образования β -галактозидаз бифидобактерий / Н.И. Астапович [и др.] // Микробиология, 2006. – Т. 75. – № 3. – С. 329-333. 7. Щетко, В.А. Сравнительная характеристика активности роста некоторых представителей рода *Bifidobacterium* / В.А. Щетко, Н.А. Головнева, Н.И. Астапович // Вес. Нац. акад. Беларуси: Сер. біял. навук. – 2002. – № 3. – С. 57-61. 8. Dahmen, H. Technique for long-term preservation of Phytopathogenic fungi in liquid nitrogen / H. Dahmen, T. Staub, F.J. Schwinn // Phytopathology. – 1983. – Vol. 73. – P. 241-246. 9. Daily, W.A. Preservation and storage of microorganisms in the gas phase of liquid nitrogen / W.A. Daily, C.E. Higgins // Cryobiology. – 1973. – Vol. 10. – P. 364-367. 10. Declerck, S. Cryopreservation of entrapped monoxenically produced spores of an arbuscular mycorrhizal fungus / S. Declerck, M.G. Angelo-van Coppenolle // New Phytol. – 2000. – Vol. 148. – P. 169-176. 11. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms / Z. Hubalek // Cryobiology. – 2003. – Vol. 46. – P. 205-229. 12. Hwang, S.-W. Effects of ultralow temperature on the viability of selected fungus strains / S.-W. Hwang // Mycologia. – 1960. – Vol. 52. – P. 527-529. 13. Hwang, S.-W. Investigation of ultralow temperature for fungal cultures I / S.-W. Hwang // Mycologia. – 1968. – Vol. 60. – P. 613-621. 14. Hwang, S.-W. Investigation of ultralow temperature for fungal cultures II / S.-W. Hwang // Mycologia. – 1968. – Vol. 60. – P. 622-626. 15. Inactivation of the stress – and starvation inducible *gls 24* operon has a pleiotrophic effect on cell morphology, stress sensitivity, and gene expression in *Enterococcus faecalis* / J.-C. Giard A [et al] // J. of Bacteriology. – 2000. – Vol. 182, № 16. – P. 4512-4520. 16. Morris, G.J. A comparative study of the changes in the morphology of hyphae during freezing and viability upon thawing for twenty species of fungi / G.J. Morris, D. Smith, G.E. Coulson // J. of General Microbiology. – 1988. – Vol. 134. – P. 2897-2906. 17. Simone, Frank P. Cryopreservation manual / Frank P. Simone. – American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Naige Nunc International Corp. – 1998. – 8 p. 18. Tetsuka, Y. Storage of sporangia of hop and vine downy mildews in liquid nitrogen / Y. Tetsuka, K. Katsuya // Ann. Phytopath. Soc. Jap. – 1983. – Vol. 49. – P. 731-735. 19. Use of Commercially Available Cryogenic Vials for Long-Term Preservation of Dermatophyte Fungi / M. Baker [et al] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44, № 2. – P. 617-618.

Статья передана в печать 23.02.2012 г.

УДК 579.2 579.6:573.6

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ЗАЩИТНОЙ СРЕДЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ СПОР ДЕРМАТОФИТОВ

Зайцева В.В.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского»,
г. Минск, Республика Беларусь

Разработан состав защитной среды, обеспечивающий сохранение жизнеспособности микроконидий сублимированных грибов дерматофитов до 90,2-95,2 % в течение 24 месяцев хранения.

A protective medium has been developed maintaining up to 90,2-95,2 % of freeze-dried dermatophytes microconidia viable for 24 months.

Введение. Наиболее щадящим способом перевода биопрепарата в сухое состояние принято считать сублимационное высушивание, т.е. высушивание под вакуумом из замороженного состояния. Известны способы консервации микроорганизмов путем их сублимации [1,6].

В настоящее время лиофильное высушивание применяется для всех несовершенных грибов.

При изучении устойчивости микроорганизмов к замораживанию необходимо в первую очередь учитывать действие двух факторов: понижение температуры при замораживании и последующее ее повышение при сублимационном высушивании. При этом важно исключить процесс микроподтаивания продукта, так как процесс оттаивания замороженного материала считается более опасным для микроорганизмов по сравнению с предшествующим охлаждением. Гибель спор зависит от взаимосвязанного влияния минимальной температуры охлаждения, скорости охлаждения и подогрева грибной суспензии, а также от среды суспендирования. Это доказано при замораживании микроорганизмов, принадлежащих к разным систематическим группам и отличающихся разной степенью криорезистентности.

Одной из наиболее распространенных теорий, объясняющих гибель клеток при замораживании, является теория механического повреждения. Считается, что гибель клеток обусловлена воздействием на них крупных кристаллов льда, образующихся вне или внутри клеток при медленном охлаждении.

Предполагается, что степень повреждения клеток снижается по мере увеличения скорости охлаждения и уменьшения величины образующихся кристаллов. При этом наиболее благоприятными условиями считаются такие, при которых вода замерзает в витрифицированном состоянии, т.е. в виде аморфной стекловидной массы. Перевести воду, содержащуюся в биологическом материале, в витрифицированное состояние сложно.