

КРИОКОНСЕРВАЦИЯ ЛЕПТОСПИР

*Зайцев В.В., *Усов Ю.П., **Дремач Г.Э.

*ГП «Витебская биофабрика»,

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

Обзор посвящен проблемам сохранения жизнеспособности и стабильности биологических свойств лептоспирозных бактерий. Рассматриваются основные механизмы повреждения клеток при замораживании и оттаивании, роль криопротекторов и других факторов, влияющих на выживаемость лептоспирозных бактерий при криоконсервации. Приведены собственные данные об оптимальных режимах замораживания и оттаивания лептоспир.

The survey is about the safety and stability of leptospiral bacteria. Some cell damage mechanisms have been considered during refrigeration and thawing, role of cryoprotectants and some other factors affecting the viability of leptospiral bacteria. The authors results have been demonstrated on the optimal regimes of the refrigeration and thawing leptospirae.

Введение. Криоконсервация – совокупность методов хранения биологических объектов при низких температурах.

Основной принцип криобиологии заключается в том, что степень повреждения при замораживании зависит от количества свободной воды в биологической системе и способности этой воды кристаллизоваться в ходе замораживания [4].

Вода – главный компонент всех живых клеток и должна присутствовать в организме для протекания химических реакций. При замораживании микроорганизмов большинство воды превращается в лед, и клеточный метаболизм прекращается. Поэтому с точки зрения теоретической криобиологии процесс криоконсервации рассматривают как способ перевода клетки в состояние глубокого холодого анабиоза с последующим возвратом в исходное состояние.

Разработка методов и технологических приемов криоконсервации микробиологических объектов требует предварительной многоплановой исследовательской работы, связанной с изучением механизмов криозащиты и криповреждения клеток, установлением закономерностей, характеризующихся изменением физиолого-биологических свойств микроорганизмов после криоконсервации. Большинство повреждений клеток возникает на этапах замораживания – отогрева, их частота и интенсивность зависит от скоростей отвода и подвода тепла, скорости кристаллизации и рекристаллизации, характера действия изменяющихся концентраций солей и т.д.

В ходе замораживания вода, окружающая клетку, замерзает раньше, чем внутри клетки [7, 8]. Это происходит за счет того, что концентрация цитоплазмы выше, чем концентрация окружающей среды. Более того, термодинамически в пространствах с большим объектом быстрее формируются центры кристаллизации. В результате замерзания воды возрастает концентрация солей в оставшейся жидкой фазе. Таким образом, формируется концентрированный фактор, который действует как осмотический шок, в результате которого внутриклеточная вода выходит из клетки в более концентрированный окружающий раствор [9].

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 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, так как для сверхбыстрого охлаждения необходимо погружать небольшое количество материала непосредственно в охлаждающий агент с очень низкой температурой.

По мнению сторонников механической теории, повреждение клеток при замораживании, быстрое и сверхбыстрое охлаждение является наиболее благоприятным для сохранения их жизнеспособности [1].

На жизнеспособность микроорганизмов и сохранение их физиолого-биохимических свойств при замораживании могут оказывать влияние различные факторы. Наиболее значимые из них – скорость охлаждения и отогрева, использование криопротекторов.

Устойчивость микроорганизмов к низким температурам в ряде случаев зависит от концентрации клеток в суспензии микроорганизмов. Это связано с тем, что при возрастании количества клеток в суспензии уменьшается содержание внеклеточной воды [2].

Криоустойчивость зависит также от схожего морфофункционального состояния клеток, которое определяется фазой роста. Клетка в стационарной фазе роста обладает наиболее высокой устойчивостью [5].

В результате многочисленных исследований установлено, что не только для каждого вида, но и для штаммов одного и того же вида микроорганизмов необходимо в ряде случаев подбирать оптимальные скорости замораживания и отогрева. Для большинства микробных клеток показаны два оптимума на шкале скоростей охлаждения, при которых отмечается максимальная выживаемость клеток при замораживании. Один из них наблюдается в зоне медленных скоростей, второй – в зоне сверхбыстрых скоростей охлаждения [Simione, FrankP., 1998]. При высоких скоростях замораживания снижается влияние

концентрированных градиентов в результате короткого времени их действия. При низких скоростях замораживания клетка теряет большое количество воды, что приводит к минимизации эффекта образования внутриклеточных кристаллов льда [3].

Скорость отогрева не менее важна, чем скорость замораживания. Наиболее оптимальны для бактерий быстрые скорости отогрева, при которых удастся максимально избежать процесса рекристаллизации [2].

Таким образом, определение криоустойчивости лептоспир является одним из важных начальных этапов разработки оптимального способа их криоконсервации с гарантией сохранения полезных свойств в течение длительного времени.

Цель настоящих исследований – определение криоустойчивости лептоспирозных штаммов для оптимизации способов их хранения в замороженном состоянии.

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). Модифицированную среду готовили путем добавления к буферному раствору 6% сыворотки барана и до 5% препарат БСТ.

С целью получения сыворотки кровь у баранов брали в стерильные бутылки вместимостью 3-5 дм³, увлажненные физиологическим раствором. После свертывания крови бутылки встряхивали для отделения кровяного сгустка от стенок и помещали для отстоя сыворотки на 24 часа при температуре 2-10^oC. Отстоявшуюся сыворотку сливали в стерильные бутылки, которые помещали в водяную баню с температурой 57-58^oC и прогревали при периодическом перемешивании в течение 30 минут.

Инактивированную сыворотку фильтровали через осветляющие и стерилизующие фильтры. Профильтрованную сыворотку проверяли на стерильность.

На основе приготовленной сыворотки в дальнейшем готовили соответствующие питательные среды.

Из одной пробирки с каждым штаммом лептоспир делали пересев в 4-5 пробирок, содержащих по 8-10 см³ питательной среды, внося в них по 0,5-1,0 см³ культуры. Накопление 80-100 млн.м.к. в см³ среды отмечалось через 7 суток культивирования при температуре 27-28^oC.

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

Производственные штаммы лептоспир, выращенные на питательных средах разного состава, контролировали на биологическую активность путем иммунизации кроликов и постановки РМА с гомологичной сывороткой.

Выращенные культуры замораживали при температуре -30^oC (режим № 1), при температуре -60^oC (режим № 2), в этаноле, предварительно охлажденном при -60^oC (режим № 3). Замороженные культуры лептоспир хранили в течение 30 суток.

Размораживание проводили быстрыми способами: при +37^oC в термостате (вариант А) и водяной бане (вариант В); медленным способом при +4^oC (вариант Б) до полного оттаивания образца. После чего культуры лептоспир помещали на сутки при температуре 28^oC.

Общее количество клеток в образцах подсчитывали под микроскопом до и после замораживания.

Жизнеспособность лептоспир определяли подсчетом числа выросших на плотной среде колоний из каждого образца до и после замораживания.

Результаты исследований. Для гарантии длительного сохранения жизнеспособности и свойств культур лептоспир необходимо было создать такие условия, которые обеспечивали бы оптимальную стабилизацию и замедление метаболических процессов в клетках.

Из результатов, сведенных в таблицах 1, 2, 3 и 4, видно, что способы замораживания и оттаивания оказывают влияние как на сохранение общего количества лептоспир, так и их процент жизнеспособности.

Таблица 31

Влияние режимов замораживания-оттаивания на криоустойчивость лептоспир *Pomona*, выращенных на сывороточной среде

Срок культивирования лептоспир, сутки	Кол-во лептоспир, млн/см ³	Кол-во жизнеспособных лептоспир, млн/см ³	Режим замораживания	Вариант оттаивания	Кол-во лептоспир после оттаивания	
					общее кол-во, млн/см ³	кол-во живых клеток, млн/см ³
7	92,0±2,4	66,2±1,2	1	А	9,4±0,5	3,6±0,3
				Б	8,6±0,4	3,5±0,3
				В	11,2±0,8	3,7±0,2
			2	А	13,6±0,6	4,1±0,4
				Б	12,1±0,7	3,6±0,4
				В	15,8±0,8	4,8±0,3
			3	А	16,6±1,0	4,9±0,4
				Б	14,6±1,0	4,3±0,4
				В	22,4±0,8	6,8±0,6
			1	А	10,8±0,6	4,2±0,4
				Б	10,2±0,5	4,0±0,3
				В	13,8±0,7	4,4±0,4

10	93,4±1,8	70,2±2,6	2	A	15,2±0,7	4,6±0,4
				Б	13,8±1,1	4,3±0,5
				В	18,7±1,3	6,0±0,5
			3	A	19,4±1,0	8,6±0,7
				Б	17,4±1,2	7,6±0,6
				В	26,3±1,4	10,3±0,7

При замораживании низкоконцентрированных культур лептоспир (табл. 31 и 32), выращенных на сывороточной среде, наиболее предпочтительно использовать режим № 3. При этом режиме замораживания в 7-дневных культурах *L. romona* и *L. tarassovi* сохраняется 17,4-25,3% микробных клеток, при этом из них 39-42% - жизнеспособных.

Таблица 32

Влияние режимов замораживания-оттаивания на криоустойчивость лептоспир *Tarassovi*, выращенных на сывороточной среде

Срок культивирования лептоспир, сутки	Кол-во лептоспир, млн/см ³	Кол-во жизнеспособных лептоспир, млн/см ³	Режим замораживания	Вариант оттаивания	Кол-во лептоспир после оттаивания	
					общее кол-во, млн/см ³	кол-во живых клеток, млн/см ³
7	93,2±2,8	69,2±1,4	1	A	9,6±0,6	3,8±0,3
				Б	8,2±0,4	3,1±0,2
				В	12,3±0,6	5,0±0,4
			2	A	14,1±0,8	5,2±0,4
				Б	12,6±0,7	4,7±0,3
				В	16,8±1,0	6,7±0,6
			3	A	18,3±1,0	7,3±0,6
				Б	16,3±1,0	6,4±0,5
				В	23,6±1,6	9,9±0,9
10	96,2±3,4	73,7±2,2	1	A	10,8±0,8	4,3±0,3
				Б	9,0±0,6	3,4±0,3
				В	14,1±0,8	5,7±0,5
			2	A	14,8±0,7	5,7±0,6
				Б	12,8±0,9	4,8±0,5
				В	18,3±1,0	7,4±0,6
			3	A	21,2±1,4	8,7±0,7
				Б	18,6±1,2	7,4±0,6
				В	26,8±1,8	11,8±1,0

В 10-суточной культуре, которая находилась уже в начальной стационарной фазе роста, эти показатели были несколько выше и составили соответственно 19,3-27,9% и 40-44%.

Наиболее низкие показатели сохранности клеток отмечались при замораживании культур лептоспир по режиму № 1. Так, у 7-суточных культур лептоспир сохранялось 8,8-13,2% общего количества клеток при их жизнеспособности 38-40%.

Следует особо отметить, что на криоустойчивость лептоспир оказывает влияние способ оттаивания. При всех вариантах замораживания медленное оттаивание (вариант Б) приводило к большему разрушению клеток лептоспир, чем быстрое (вариант В).

У культур лептоспир, замороженных по варианту № 1, при быстром оттаивании сохранялось около 13% клеток, при умеренном (вариант А) – около 10% и медленном (вариант Б) – около 8,8. Аналогичная тенденция просматривалась при оттаивании культур лептоспир, замороженных при режимах № 2 и № 3.

На результат криоконсервации может влиять концентрация клеток в суспензии микроорганизмов. Это связано с тем, что при возрастании количества клеток в суспензии уменьшается содержание внеклеточной воды.

Результаты замораживания и оттаивания концентрированных культур, выращенных на ССФР, сведены в таблицах 33 и 34.

Таблица 33

Влияние режимов замораживания-оттаивания на криоустойчивость лептоспир *Romona*, выращенных на модифицированной сывороточной среде

Срок культивирования лептоспир, сутки	Кол-во лептоспир, млн/см ³	Кол-во жизнеспособных лептоспир, млн/см ³	Режим замораживания	Вариант оттаивания	Кол-во лептоспир после оттаивания	
					общее кол-во, млн/см ³	кол-во живых клеток, млн/см ³
			1	A	78,6±2,0	18,9±2,2
				Б	71,1±1,6	14,2±0,6
				В	102,5±2,1	29,7±1,4

7	788,0±32,0	725,0±48,0	2	A	165,6±4,8	51,5±2,2
				B	126,5±3,5	30,4±1,2
				B	189,4±8,8	58,7±1,6
			3	A	181,4±10,2	70,8±1,8
				B	141,9±8,2	51,1±2,0
				B	157,8±12,4	78,9±1,6
10	862,4±43,0	784,0±52,0	1	A	95,2±4,4	26,7±1,8
				B	77,6±3,6	17,8±0,6
				B	121,2±5,8	40,1±2,0
			2	A	198,5±10,8	67,6±2,4
				B	146,7±8,6	42,6±2,2
				B	215,5±12,8	75,5±4,0
			3	A	224,4±15,0	96,6±4,2
				B	172,4±12,6	70,7±3,0
				B	276,2±15,6	154,8±5,6

Из данных таблиц 3 и 4 видно, что в целом криорезистентность лептоспир как в низкоконцентрированных, так и высококонцентрированных культурах при разных режимах замораживания и оттаивания схожа. Но эффект сохранности лептоспир в концентрированных культурах при быстром замораживании более ощутим.

Таблица 34

Влияние режимов замораживания-оттаивания на криоустойчивость лептоспир *Tarassovi*, выращенных на модифицированной сывороточной среде

Срок культивирования лептоспир, сутки	Кол-во лептоспир, млн/см ³	Кол-во жизнеспособных лептоспир, млн/см ³	Режим замораживания	Вариант оттаивания	Кол-во лептоспир после оттаивания	
					общее кол-во, млн/см ³	кол-во живых клеток, млн/см ³
7	846,0±48,0	778,0±52,0	1	A	89,7±3,2	20,7±0,4
				B	79,5±2,6	16,5±0,4
				B	108,4±4,8	31,2±0,6
			2	A	176,2±6,2	53,7±1,8
				B	134,7±5,4	33,2±0,5
				B	205,6±12,4	64,8±2,6
			3	A	199,2±10,8	78,4±3,6
				B	155,8±7,2	56,6±1,8
				B	174,3±4,8	88,2±3,2
10	912,0±58,0	820,0±66,0	1	A	96,7±2,6	26,6±0,5
				B	83,9±2,8	18,7±0,3
				B	132,3±4,4	44,4±1,2
			2	A	217,1±10,6	74,5±2,0
				B	152,4±4,4	45,2±0,8
				B	224,4±12,8	79,4±1,8
			3	A	242,7±14,8	107,3±4,6
				B	188,8±12,2	76,1±1,4
				B	288,2±15,4	165,2±5,6

Заключение. Несмотря на некоторые отличия в результатах исследований, проверенные нами штаммы лептоспир обладают достаточно низкой криорезистентностью. Для криоконсервации лептоспир необходимо подобрать криопротектор, замораживание проводить в этаноле, охлажденном до -60°C, а оттаивание – быстрым способом в водяной бане при температуре воды +37°C.

Литература. 1. Бланков, Б.И. Применение лиофилизации в микробиологии / Б.И. Бланков, Д.Л. Клебанов. – М.: Медгиз, 1961. – 263 с. 2. Криобиология и биотехнология / А.А. Цуцаева [и др.]; под общ. ред. А.А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1987. – 165 с. 3. A two factor hypothesis of freezing injury / P. Mazur [et al] // *Experimental Cell Research*. – 1972. – Vol. 71. – P. 345-355. 4. *Cryopreservation manual: a guide to cryopreservation techniques* / G.M. Kelvin – Brockbank; Thermo Electron Corporation, 2004. – 25 p. 5. Heckly, R.J. Preservation of microorganisms / R.J. Heckly // *Advances in Applied Microbiology*. – 1978. – Vol. 24. – P. 1-53. 6. Hubalek, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms / Z. Hubalek // *Cryobiology*. – 2003. – Vol. 46. – P. 205-229. 7. Farrant, J. General observations on cell preservation / J. Farrant // *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology*, Pitman Medical Limited, Kent, England. – 1980. – P. 1-18. 8. Mazur, P. *Cryobiology: the freezing of biological systems* / P. Mazur // *Science*. – 1970. - № 168. – P. 939-949. 9. Pegg, David E. Long-term preservation of cells and tissues a review / David E. Pegg // *J. Clin. Path.* – 1976. – Vol. 29. – P. 271-285. 10. Simione, Frank P. *Cryopreservation manual* / Frank P. Simione. – American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Naige Nunc International Corp. – 1998. – 8 p.

Статья передана в печать 05.09.2012 г.