

А.Н.Малахаева, О.Ю.Ляшова, О.П.Плотников, А.В.Осин

ХРАНЕНИЕ ШТАММОВ *FRANCISELLA TULARENSIS* 15 НИИЭГ И *BRUCELLA ABORTUS* 19 ВА В ЖИЗНЕСПОСОБНОМ СОСТОЯНИИ ПУТЕМ ИХ ГЛУБОКОГО ЗАМОРАЖИВАНИЯ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В работе дана характеристика методов хранения микроорганизмов в различных условиях в жизнеспособном состоянии в течение двух лет. Проведено сравнение выживаемости тест-штаммов возбудителей туляремии и бруцеллеза (на примере *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА) при хранении на питательных средах при температурах от 0 до +8 °С и минус 70 °С в течение одного года наблюдения. Дана оценка жизнеспособности вакцинных штаммов при хранении при температуре минус 70 °С в течение двух лет наблюдения. Установлено, что наиболее оптимальными средами для хранения вышеуказанных микроорганизмов без изменения их морфологических признаков при температуре минус 70 °С являются СЖА и бульон Альбими с 10 % глицерином. Показано, что в рабочих коллекциях более эффективно консервировать микроорганизмы методом низкотемпературного замораживания.

Ключевые слова: патогенные биологические агенты (ПБА), *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, лиофилизация, криоконсервация, низкотемпературное замораживание.

A.N.Malakhaeva, O.Yu.Lyashova, O.P.Plotnikov, A.V.Osin

Maintenance of *Francisella tularensis* 15 RIEH and *Brucella abortus* 19 BA Strains in a Viable State by Means of Deep Freezing

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Assessed are the methods for storage of microorganisms in a viable state under various technological conditions for a period of two years. Compared is the survivability of the test-strains of tularemia and brucellosis agents (exemplified by *Francisella tularensis* 15 RIEH and *Brucella abortus* 19 BA) when stored on the nutrient media at temperatures ranging 0 °C up +8 °C and at -70 °C for over a year. Made has been an estimate of survivability of the vaccine strains stored at -70 °C within two years term. It is determined that optimum media for storing the stated above microorganisms with no changes in their morphological characteristics at -70 °C are sucrose-gelatin agar and Albimi broth with 10 % glycerin. Demonstrated is the fact that it is more efficient to conserve microorganisms stored in working collections by way of deep freezing.

Key words: pathogenic biological agents (PBA), *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, liophilization, cryo-conservation, low-temperature freezing.

Как известно, туляремия и бруцеллез относятся к зоонозным инфекциям и остаются одной из основных проблем инфекционной патологии человека в России. Это подтверждается постоянным выделением штаммов из природных очагов и регистрацией спорадических или групповых случаев заболевания людей [1, 4]. Основными причинами заражения людей являются нарушения санитарно-гигиенических и ветеринарных правил, несвоевременное выявление больных людей и животных и их изоляция. Частота плановых обследований зависит от эпизоотической ситуации. Результаты обследования объекта доводят до администрации для принятия соответствующих мер.

Одним из обязательных этапов лабораторной диагностики туляремии и бруцеллеза является проведение бактериологического анализа. В соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 «Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для

возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза» качество питательных сред, использующихся для исследования, должно быть проверено с помощью контрольных тест-штаммов [2]. При контроле диагностических питательных сред для возбудителей туляремии и бруцеллеза применяется ряд тест-штаммов, наиболее востребованными из которых являются *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА, поскольку, в отличие от своих вирулентных аналогов, относятся к III группе патогенности и могут использоваться в бактериологических лабораториях различного уровня, при наличии соответствующего санитарно-эпидемиологического заключения.

Сохранение микроорганизмов в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени является одной из важных проблем микробиологии. От умения культивировать и сохранять в жизнеспособном состоянии бактерии в лабораторных условиях в зна-

чительной степени зависят успехи микробиологов в изучении патогенных биологических агентов (ПБА).

В последние годы в большинстве коллекций микроорганизмов используют методы лиофилизации, криоконсервации и низкотемпературного замораживания [5]. Во всех случаях выбор способа консервирования конкретного объекта основывается на сохранении микроорганизмами жизнеспособности, морфологических признаков, физиологических характеристик, биохимической активности и генетической стабильности. При этом учитывается максимально возможное время хранения культуры, а также надежность реализации данного метода консервации и требования по обслуживанию в течение длительного времени. Культуры микроорганизмов, подготавливаемые к консервации, должны выращиваться в оптимальных условиях. Состав среды выращивания, температура, условия аэрации и другие факторы оказывают существенное влияние на устойчивость микроорганизма к стрессам, возникающим при длительном хранении (лиофилизации, криоконсервации или замораживании).

Сущность метода лиофилизации заключается в высушивании культур под вакуумом при низких температурах (минус 20 – минус 40 °С). Лиофилизированные культуры, если их хранить без доступа кислорода, влаги и света при пониженных температурах (от 0 до +8 °С), могут храниться в течение длительного времени – 50 лет наблюдения [3].

В настоящее время большое внимание уделяется методу криоконсервации (от греч. *κρύος* – холод и лат. *conservo* – сохраняю) – низкотемпературному хранению живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания. Время хранения в жидком азоте криоконсервированных микроорганизмов и других биологических объектов в стабильном и жизнеспособном состоянии практически не ограничено [5].

Для криозащиты плохо переносящих замораживание микроорганизмов применяют различные криопротекторы: низкомолекулярные вещества (глицерин, димексид, сахарозу и др.), высокомолекулярные соединения (декстран, крахмал, полиэтиленгликоль, поливинилпирролидон и др.), компоненты растительного и животного происхождения (сыворотку крови, желатин, обезжиренное молоко и др.).

Метод криоконсервации, как и метод лиофилизации, требует специального оборудования, но менее трудоемкий. Во время работы с жидким азотом требуется большая осторожность.

Известны способы длительного хранения микроорганизмов при низких температурах от минус 20 до минус 130 °С. Многие микроорганизмы могут храниться в холодильниках при температуре ниже минус 60 °С с сохранением высокого титра жизнеспособных клеток. Однако в коллекциях микроорганизмов, в том числе международных, этот прием используется как один из этапов лиофилизации культур [5]. Метод низкотемпературного замораживания также использу-

ется на носителях, что позволяет увеличить срок хранения микроорганизмов до 5 и более лет.

Целью данной работы является создание оптимальных условий для длительного хранения и определения жизнеспособности штаммов возбудителей туляремии и бруцеллеза в условиях низкотемпературного замораживания на примере тест-штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА.

Материалы и методы

В работе использованы: штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА; среды хранения: бульон Альбими с 10 % глицерином (рН 7,2), дистиллированная вода с 10 % глицерином (рН 7,2); сахарозо-желатиновый агар – СЖА – (рН 7,2); FT-агар (рН 7,2) и агар Альбими (рН 7,2).

Штаммы со средами хранения в криопробирках CRYO.S™ помещали в низкотемпературную морозильную камеру с температурой минус 70 °С. На каждый штамм брали по три криопробирки на каждую среду (всего 9 криопробирок на каждый штамм).

Штаммы на скошенном агаре (FT-агар и агар Альбими) в пробирках хранили при температуре от 0 до +8 °С.

Учет жизнеспособности (жизнеспособность – процент выросших колоний микроорганизмов от числа засеянных клеток) микроорганизмов проводили путем высева на соответствующие среды для каждого вида через 3, 6, 9, 12 и 24 месяцев из первых образцов. Другие образцы остались на более длительный срок без их вскрытия и подвержения процедуре замораживания-оттаивания. Контролем служили исходные штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА до их глубокого замораживания.

Процент выживаемости микроорганизмов определяли по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100 %.

Результаты и обсуждение

В соответствии с нормативными актами в научно-экспериментальной деятельности референтные штаммы *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Bruceella abortus* 19 ВА широко востребованы при изучении возбудителей туляремии и бруцеллеза. В начале каждого года экспериментаторы должны получать ампулы с лиофилизированной культурой микроорганизмов или чашки с агаром и пробирки со скошенным агаром первой генерации микроорганизмов.

Чашки агаровой культуры выдаются для того, чтобы экспериментаторы оценивали морфологию данного микроорганизма. На питательных средах при температуре от 0 до +8 °С их жизнеспособность сохраняется в течение 3–4 месяцев (хранение на скошенном агаре I генерации). В течение года при пересевах через 2–3 месяца микроорганизмы сохраняют свою жизнеспособность, но все научно-

экспериментальные работы ведутся, как правило, со второй генерацией.

Поскольку в рабочих коллекциях у микробиологов в различных лабораториях, имеющих разрешения на работу с микроорганизмами I–IV групп патогенности, штаммы хранятся на питательных средах при температуре от 0 до +8 °С, нас интересовал вопрос сохранения жизнеспособных клеток в процессе низкотемпературного замораживания без изменения их культурально-морфологических свойств.

Поддержание культур микроорганизмов регулярными пересевами имеет ряд существенных недостатков: основной из них – возможная утрата ряда морфологических и филогенетических признаков. Кроме того, частые пересевы нередко снижают биохимическую активность культур, повышают опасность контаминирования ее посторонними микроорганизмами. При частых пересевах, особенно на жидких питательных средах, велика вероятность возникновения спонтанных мутантов и их селекция.

Штамм *F. tularensis* 15 НИИЭГ через 3 месяца хранения на скошенном Ft-агаре при температуре от 0 до +8 °С при высеве на соответствующие питательные среды имел единичные колонии. Через 6 месяцев хранения при таких же условиях штамм не сохранил свою жизнеспособность. Аналогичные результаты получены и у штамма *B. abortus* 19 ВА при хранении на скошенном агаре Альбими при температуре от 0 до +8 °С (таблица).

Таким образом, микроорганизмы I генерации при температуре хранения от 0 до +8 °С на твердых питательных средах в течение 3 месяцев сохраняют небольшую жизнеспособность. Хранить штаммы в данных условиях более длительный период нецелесообразно.

Для широкого круга микроорганизмов лиофилизация обеспечивает большую стабильность, чем общеизвестные способы высушивания и периодические пересевы. Этот метод удобен для практических целей: во-первых, дает возможность иметь большое число образцов (ампул) каждого микроорганизма; во-вторых, лиофилизированные культуры некоторое время можно хранить при комнатной температуре без

изменений качества «таблетки». Пересылка штаммов микроорганизмов в лиофилизированном состоянии не требует дополнительных затрат и полностью соответствует требованиям СП 1.2.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I–IV групп патогенности». При сублимационной сушке влага перемещается в материале в виде пара, в результате чего удается в максимальной степени сохранить первоначальные специфические свойства микроорганизмов. Недостатком данного метода является то, что во время лиофилизации идет медленное удаление влаги из-за низкой температуры, узкого просвета в перешейках ампул, затруднения испарений из глубоких слоев биоматериала (дно и стенки ампул). Большим минусом процесса лиофилизации является его трудоемкость, длительность (до 12 ч), большой расход электроэнергии, использование дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала, что влечет за собой большие физические и материальные затраты.

Низкотемпературная консервация по сравнению с другими методами (лиофилизация и криоконсервация) для хранения микроорганизмов более универсальна в связи с наличием и доступностью низкотемпературных холодильников, способных надежно поддерживать необходимые температуры в течение длительного времени. Однако время хранения биоматериала при этих температурах также ограничено. По данным L.F.Gibson и J.T.Khoury [6], в холодильнике при температуре минус 70 °С время хранения разных видов бактерий колебалось в пределах 12–40 месяцев.

В процессе хранения при температуре минус 70 °С в течение всего времени наблюдения рост бактерий тестируемых штаммов *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА на всех средах хранения не отличался от исходного. Однако наблюдалось снижение количества жизнеспособных клеток каждого штамма (таблица).

В результате проведенных исследований при глубоком замораживании жизнеспособность штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ в течение года хранения составила в среднем: на бульоне Альбими с 10 %

Жизнеспособность *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА в течение 2 лет наблюдения

Время наблюдения, мес.	Среда хранения при температуре минус 70 °С						Среда хранения при температуре от 0 до +8 °С	
	Бульон Альбими с 10 % глицерином		Дистиллированная вода с 10 % глицерином		СЖА		Ft-агар	Агар Альбими
	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, мк/мл	<i>B. abortus</i> 19 ВА, мк/мл	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, мк/мл	<i>B. abortus</i> 19 ВА, мк/мл	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, мк/мл	<i>B. abortus</i> 19 ВА, мк/мл	<i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ, мк/мл	<i>B. abortus</i> 19 ВА, мк/мл
0	25·10 ¹⁰	38·10 ¹⁰	12·10 ¹⁰	20·10 ¹⁰	23·10 ¹⁰	56·10 ¹⁰	25·10 ¹⁰	38·10 ¹⁰
3	23·10 ¹⁰	34·10 ¹⁰	10,5·10 ¹⁰	12·10 ¹⁰	21·10 ¹⁰	48·10 ¹⁰	2·10 ³	4·10 ²
6	20·10 ¹⁰	32·10 ¹⁰	8,6·10 ¹⁰	10·10 ¹⁰	20·10 ¹⁰	43·10 ¹⁰	0	0
9	17·10 ¹⁰	27·10 ¹⁰	5,4·10 ¹⁰	5·10 ¹⁰	18·10 ¹⁰	10·10 ¹⁰	–	–
12	12·10 ¹⁰	25·10 ¹⁰	1,5·10 ¹⁰	3·10 ¹⁰	18·10 ¹⁰	21·10 ¹⁰	–	–
24	8·10 ¹⁰	13·10 ¹⁰	1·10 ¹⁰	1,8·10 ¹⁰	16,3·10 ¹⁰	12·10 ¹⁰	–	–

Примечание. «–» – опыт не проводили.

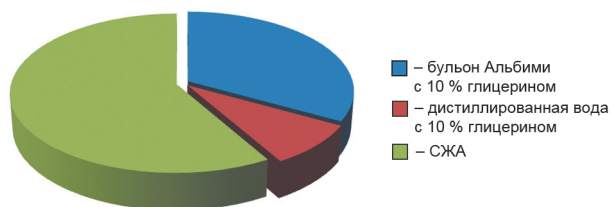


Рис. 1. Средний процент живых микробных клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ за 2 года наблюдения

глицерином – 48; дистиллированной воде с 10 % глицерином – 12,5; СЖА – 77,4 %. В течение двух лет хранения – на бульоне Альбими с 10 % глицерином – 32; дистиллированной воде с 10 % глицерином – 8,3; СЖА – 56,5 % (рис. 1).

Штамм *B. abortus* 19 ВА через год хранения в условиях низкотемпературного замораживания сохранял свою жизнеспособность в среднем: на бульоне Альбими с 10 % глицерином – 66; дистиллированной воде с 10 % глицерином – 15; СЖА – 64,3 %. В течение двух лет хранения – 34,2, 9 и 35,7 % соответственно (рис. 2).

Возможно, в других образцах концентрация клеток микроорганизмов будет идентична исходной, поскольку это связано с тем, что оставшиеся образцы не подвергались процедуре замораживания–оттаивания, тогда как первые были подвержены такой процедуре 4 раза за год.

Таким образом, в научно-экспериментальных отделах (лабораториях) при изучении возбудителей туляремии и бруцеллеза, выделенных из природных очагов и/или при диагностике заболеваний людей, при традиционных методах хранения на питательных средах жизнеспособность штаммов сохранялась в течение недолгого времени (I генерация – 3 месяца, при пересевах – максимально до 1 года). Нами показано на примере *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА, что штаммы необходимо более эффективно консервировать в рабочих коллекциях методом низкотемпературного замораживания. Наиболее оптимальными средами для хранения данных микроорганизмов при температуре минус 70 °С являются СЖА и бульон Альбими с 10 % глицерином.

Предлагаемый метод длительного хранения штаммов (на примере *F. tularensis* 15 НИИЭГ и *B. abortus* 19 ВА) при низкой температуре (минус 70 °С) позволяет практически полностью сохранять их жизнеспособность и неизменность морфологических признаков на протяжении 2 лет с относительно небольшими физическими и материальными затратами в экспериментальных лабораториях, а также в специализированных коллекциях на случай непредвиденных ситуаций и невозможности проведения процесса лиофилизации.

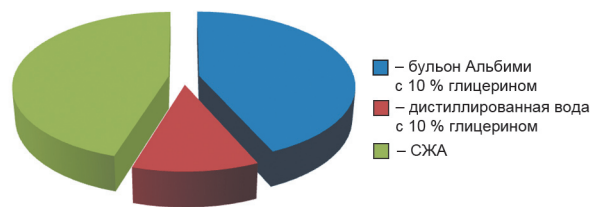


Рис. 2. Средний процент живых микробных клеток *B. abortus* 19 ВА за 2 года наблюдения

Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безсмертный В.Е., Попов В.П., Жуков В.И., Иванова С.М. Обзор эпизоотической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации во втором полугодии 2008 г. и прогноз на первое полугодие 2009 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2009; 2(100):11–3.
2. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. МУ 3.3.2.2124-06. М.; 2006. 29 с.
3. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. *Микробиология.* 2011; 80(6):842–6.
4. Лямкин Г.И., Тихенко Н.И., Манин Е.А., Русанова Д.В., Головнёва С.И., Вилинская С.В., Куличенко А.Н. Об эпидемической ситуации и заболеваемости бруцеллезом в Российской Федерации в 2011 г. и прогноз на 2012 г. *Пробл. особо опасных инф.* 2012; 1(111):26–9.
5. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденция развития. *Известия ВУЗов.* 2009; 4:99–121.
6. Gibson L.F., Khoury J.T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Lett. Appl. Microbiol.* 1986; 3(6):127–9.

References

1. Bezsmertny V.E., Popov V.P., Zhukov V.I., Ivanova S.M. [Review of tularemia epizootic situation in the Russian Federation territory in the second half of 2008 and prognosis for the first half of 2009]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2009; 2(100):11–3.
2. [Diagnostic nutrient media control against biological parameters for agents of plague, cholera, anthrax, tularemia, brucellosis, and legionellosis]. MR 3.3.2.2124-06. M.; 2006. 29 p.
3. Kupletskaya M.B., Netrusov A.I. [Viability of lyophilized microorganisms after 50 years of storage]. *Mikrobiologia.* 2011; 80(6):842–6.
4. Lyamkin G.I., Tikhenko N.I., Manin E.A., Rusanova D.V., Golovneva S.I., Vilinskaya S.V., Kulichenko A.N. [Brucellosis epidemiological situation and its morbidity in the Russian Federation in 2011, and prognosis for 2012]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111):26–9.
5. Pokhilenko V.D., Baranov A.M., Detushev K.V. [Methods of long-term storage of microorganisms' collection cultures and development trends]. *Izvestiya VUZov.* 2009; 4:99–121.
6. Gibson L.F., Khoury J.T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Lett. Appl. Microbiol.* 1986; 3(6):127–9.

Authors:

Malakhaeva A.N., Lyashova O.Yu., Plotnikov O.P., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapl@microbe.ru

Об авторах:

Малахаева А.Н., Ляшова О.Ю., Плотников О.П., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapl@microbe.ru

Поступила 04.02.15.