

DOI: 10.26693/jmbs02.05.175

УДК 579.862.083.1:57.086.13:57.043

Калашникова М. Н.

ИСХОДНАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ КЛЕТОК *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* КАК ОДИН ИЗ ФАКТОРОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, Украина

marina032003@rambler.ru

Задачей исследования было изучение возможности повысить сохранность бактерий *Streptococcus pneumoniae* в процессе криоконсервирования. Установлено, что на выживаемость данных бактерий оказывают влияние исходная концентрация и состав консервирующей среды, максимальную сохранность клеток отмечали в образцах с исходной концентрацией 10^{11} КОЕ/мл независимо от состава среды консервирования, а также при суспендировании в обогащенной среде (МПБ). На основе проведенного исследования показано, что выходящие из микробных клеток на этапе охлаждения внутриклеточные вещества оказывают криопротективное действие.

Ключевые слова: бактерии *Streptococcus pneumoniae*, криоконсервирование, бактериальные концентрации, криолизаты микробных клеток.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Данная работа является фрагментом НИР «Вивчення впливу умов криоконсервування і зберігання на дріжджоподібні гриби, постнатальні фібробласти і культуру клітин, що перевиваються», № гос. регистрации 0104U003919.

Введение. Бактерии *Streptococcus pneumoniae* – одни из основных возбудителей негоспитальных пневмоний, особенно среди детей и лиц пожилого возраста. [3,4] Серологическая диагностика и специфическая профилактика пневмококковых инфекций затруднены тем, что по капсульному антигену выделено более 90 сероваров возбудителя. [9] В связи с этим актуальной является проблема сохранности клинических изолятов, выделенных в различных географических зонах.

Наиболее часто для хранения микроорганизмов используют лиофилизацию и низкотемпературное консервирование в средах с добавлением криопротекторов.

В исследованиях, посвященных разработке способов криоконсервирования бактерий изучают, как правило, влияние режимов охлаждения, состава

консервирующей среды и исходного морфофункционального состояния клеток. [1] Вместе с тем, в ряде работ высказывалось предположение о защитной роли повышенных исходных концентраций клеток в замораживаемом образце [6-8, 10], при этом механизмы протективного действия высоких концентраций клеток *S. pneumoniae* мало изучены.

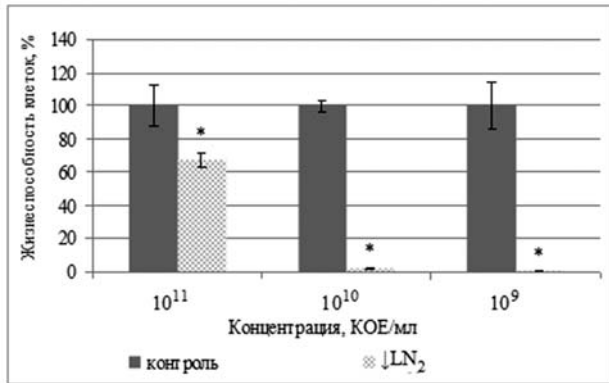
Целью настоящего исследования было изучение возможности повысить сохранность бактерий *Streptococcus pneumoniae* в процессе криоконсервирования за счет повышения исходной концентрации клеток в замораживаемых образцах.

Объект и методы исследования. Объектом исследования служил клинический изолят *Streptococcus pneumoniae*, выделенный из мокроты больного. Бактерии выращивали на 5% кровяном агаре при температуре 37°C в течение 20-24 часов в атмосфере, содержащей 8-10% CO₂. После выращивания бактерии трехкратно отмывали соответствующими суспензионными средами – дистиллированной водой, физиологическим раствором или мясопептонным бульоном (МПБ), после чего ресуспендировали в вышеуказанных суспензионных средах до концентраций 10^{11} , 10^{10} и 10^9 КОЕ/мл. Для проверки гипотезы о влиянии низкомолекулярных веществ, вышедших из клеток, на жизнеспособность бактерий часть клеток замораживали в криолизатах бактерий *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli B* и *Klebsiella pneumoniae*. Для их получения бактерии смывали дистиллированной водой с ростовых сред и трехкратно замораживали до -196°C. После отогрева образцы центрифугировали при 1500 g в течение 15 мин и надосадок фильтровали через миллипорный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Клетки *S. pneumoniae* суспендировали в полученных лизатах до концентрации 10^9 КОЕ/мл.

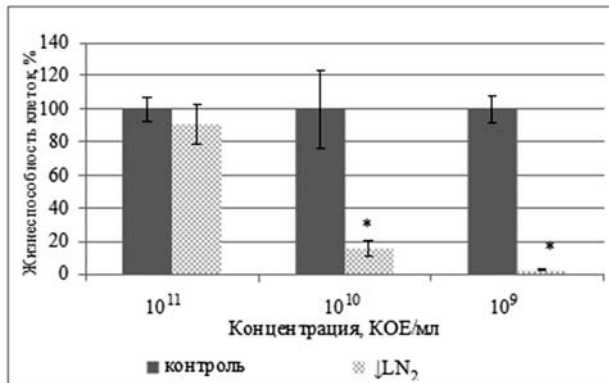
Все образцы клеток вносили в криопробирки объемом 2,0 мл и замораживали погружением в жидкий азот (\downarrow LN₂). Отогревали образцы на водяной бане при 37°C. Жизнеспособность пневмококков

определяли «чашечным» методом Коха по числу макроколоний, сформировавшихся на кровяном агаре. [2]

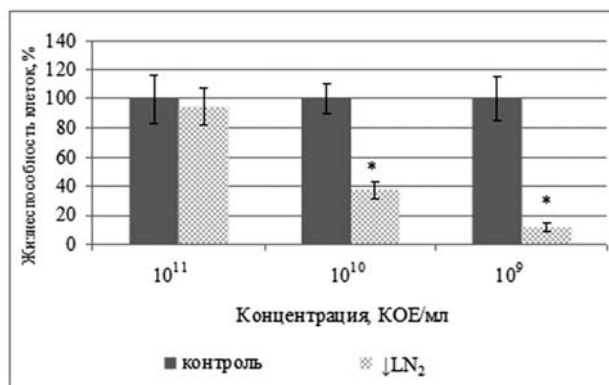
Для статистической обработки полученных данных использовали пакет программ MS Excel, значения $p \leq 0,05$ считались достоверными. Данные на графиках представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего.



А



Б



В

Рис. 1. Влияние исходной концентрации клеток *S. pneumoniae* на жизнеспособность при замораживании в физиологическом растворе (А), дистиллированной воде (Б), МПБ (В).

Примечание: * – Отличия статистически достоверны относительно показателя жизнеспособности для контроля (клетки до замораживания).

дартная ошибка среднего.

Результаты исследования и их обсуждение.

Было установлено, что жизнеспособность бактерий, суспендированных в физиологическом растворе, после замораживания до -196°C составила в образцах с исходной концентрацией 10^{11} КОЕ/мл 67,1%, с исходной концентрацией 10^{10} КОЕ/мл – 0,2% и при исходной концентрации 10^9 КОЕ/мл – 0,05% (**рис. 1А**).

В образцах, суспендированных в дистиллированной воде, жизнеспособность бактерий после замораживания составила соответственно 91,2; 15,7 и 2,8% (**рис. 1Б**), а после замораживания в мясоептонном бульоне – 94,6; 37,5 и 11,8% соответственно (**рис. 1В**).

Во всех образцах клеток, замороженных в лизатах бактерий, количество жизнеспособных клеток *S. pneumoniae* оставалось на исходном уровне (**рис. 2**).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при замораживании бактерий исходная концентрация клеток оказывает достоверное влияние на их жизнеспособность. При исходной концентрации 10^{11} КОЕ/мл отмечалась максимальная сохранность клеток, независимо от состава среды консервирования. С понижением исходной концентрации клеток до 10^{10} - 10^9 КОЕ/мл показатели жизнеспособности достоверно снижались. Установлено, что состав консервирующей среды также влиял на показатели жизнеспособности клеток, наиболее высокие результаты получены при замораживании суспензии клеток в МПБ, а наиболее низкие – при суспендировании бактерий в физиологическом растворе.

Вероятным защитным механизмом при этом является выход из клеток на этапе охлаждения различных внутриклеточных веществ, криопротективное действие которых реализуется при определенных концентрациях. [5] Физические механизмы

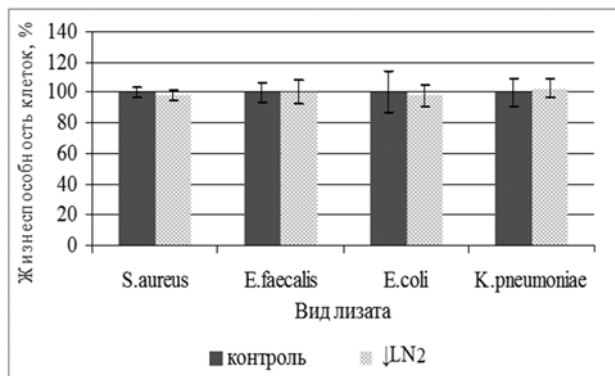


Рис. 2. Влияние низкомолекулярных лизатов разных видов бактерий на жизнеспособность клеток *S. pneumoniae* после замораживания

влияния высоких концентраций клеток на процессы кристаллизации-рекристаллизации предстоит изучить.

Выводы. Таким образом, для криоконсервирования бактерий, в частности, *S. pneumoniae*, целесообразно использовать высокие исходные концентрации клеток, 10^{11} КОЕ/мл и больше.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования данного направления позволят разработать технологические процессы низкотемпературного хранения бактериальных концентратов для различных биотехнологических производств.

References

1. Goltsev AN, red. *Aktualnye problemy kriobiologii i kriomeditsiny*. Kharkov: Vidavnichiy dim Rayder, 2012. 768 s. [Russian].
2. Lusta KA, Fikhte BA. *Metody opredeleniya zhiznesposobnosti mikroorganizmov*. Pushchino: ONTI NTsBI AN SSSR, 1990. 186 s. [Russian].
3. Pertseva TA, Bontsevich RA, Bratus EV. Klinicheski znachimye vzbuditeli infektsiy dykhatelnykh putey. Konspekt vracha-klinitsista i mikrobiologa. Chast 1. Pnevmonokokk. *Klinichna imunologiya. Alergologiya. Infektologiya*. 2006; 3 (4): 20-6. [Russian].
4. Strachunskiy LS, Belousov YuB, Kozlov SN, red. *Prakticheskoe rukovodstvo po antiinfektsionnoy khimioterapii*. Moskva: Borges, 2002. 384 s. [Russian].
5. Tsutsaeva AA, red. *Kriobiologiya i biotekhnologiya*. Kiev: Naukova dumka, 1987. 216 s. [Russian].
6. Aulet de Saab OC, de Castillo MC, de Ruiz Holgado AP, de Nader OM. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001 May; 96 (4): 583-6.
7. Berner D, Viernstein H. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. *Sci Pharm*. [Internet]. 2006 [cited 2017 Sept 16]; 74 (3): 137-49. Available from: <http://www.scipharm.at/download.asp?id=189>. doi:10.3797/scipharm.2006.74.137.
8. Calcott PH. *Freezing and Thawing Microbes*. Durham: Meadowfield Press Ltd; 1978. 68 p.
9. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 1995 Oct; 33 (10): 2759-62.
10. Yang L, Ma Y, Zhang Y. Freeze-drying of live attenuated *Vibrio anguillarum* mutant for vaccine preparation. *Biologicals*. 2007 Oct; 35 (4): 265-9. DOI: 10.1016/j.biologics.2007.03.001.

УДК 579.862.083.1:57.086.13:57.043

ВИХІДНА КОНЦЕНТРАЦІЯ КЛІТИН *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* ЯК ОДИН ІЗ ЧИННИКІВ, ЩО ВПЛИВАЮТЬ НА ЕФЕКТИВНІСТЬ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ

Калашникова М. М.

Резюме. Завданням дослідження було вивчення можливості підвищити збереженість бактерій *Streptococcus pneumoniae* в процесі криоконсервування. Встановлено, що на життєздатність даних бактерій впливають їх вихідна концентрація і склад консервуючого середовища, максимальне збереження клітин відзначали в зразках з вихідною концентрацією 10^{11} КУО/мл, незалежно від складу консервуючого середовища, а також при суспендуванні в збагаченому середовищі (МПБ). На основі проведеного дослідження показано, що внутрішньоклітинні речовини, які виходять з мікробних клітин на етапі охолодження, надають кріопротективну дію.

Ключові слова: бактерії *Streptococcus pneumoniae*, криоконсервування, бактеріальні концентрації, криолізати мікробних клітин.

UDC 579.862.083.1:57.086.13:57.043

Initial Concentration of *Streptococcus pneumoniae* Cells as One of the Factors Influencing Cryopreservation Efficiency

Kalashnykova M.

Abstract. The *Streptococcus pneumoniae* bacteria are among the main respiratory disease agents worldwide. Nowadays one can secure about 90 pneumococcal serotypes with different prevalence and medical significance according to the structure of capsular polysaccharides, thereby complicating serological diagnosis and prevention of pneumococcal infections. Therefore, the tasks of the integrity of *S. pneumoniae* clinical isolates, obtained in different geographical areas, are topical for designing diagnostic and specific prophylaxis agents. Freeze-drying and freezing down to low temperatures (cryopreservation) are currently considered to be the most efficient methods of storage.

Numerous research papers on microorganism cryopreservation reported towards the following factors affecting microbial cell integrity: the structure and functional characteristics stipulated by taxonomic position of a microorganism, freeze-thawing regimens, preservation medium composition, culture conditions (growth medium composition, aeration, cultivation temperature), as well as the growth phase of a batch culture. However, in some cases it is not advisable to include the widely used cryoprotective substances into the preservation medium. Therefore the search for conditions of microorganism cryopreservation in the media free from these substances is now in progress.

Concentrations of microbial cells per unit of volume were suggested to have a significant effect on the final cryopreservation result. However, this problem is still poorly understood. The findings obtained by different authors are contradictory. We assumed the viability of microbial cells with a high initial concentration as might be affected by intracellular substances released from cells during cooling and by a change in crystallization processes.

This paper deals with the study of the *S. pneumoniae* cell viability after freezing in the samples with different initial cell concentrations, as well as those frozen in cryolysates, obtained via threefold freezing down to -196°C of bacteria *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli B* and *Klebsiella pneumoniae*.

During *S. pneumoniae* bacteria freezing the initial cell concentration was first shown to cause a significant effect on their viability. Under initial concentration of 10^{11} CFU/ml the maximum cell survival after freezing was observed, regardless of the preservation medium composition, and when reducing the initial cell concentration down to 10^{10} - 10^9 CFU/ml the viability indices decreased significantly. The composition of preservation medium was established to affect the indices of cell viability as well, the highest results were achieved when freezing cell suspension in meat-peptone broth, and the lowest ones were obtained during bacteria suspending in physiological saline.

The findings on *S. pneumoniae* freezing in cryolysates of other bacterial species testify to the fact that the different intracellular substances released from bacterial cells at cooling stage have a cryoprotective effect.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae* bacteria, cryopreservation, bacterial concentration, microbial cell cryolysates.

Стаття надійшла 17.09.2017 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування