

ВПЛИВ ТЕМПЕРАТУРНОГО ТА АТМОСФЕРНОГО ФАКТОРА НА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ ЛІОФІЛЬНО ВИСУШЕНОЇ КУЛЬТУРИ ГЕМОЛІТИЧНОЇ ПАСТЕРЕЛИ

*Т. В. Мазур, д-р вет. наук, професор,
Г. П. Сивовол, бакалавр 2-го року навчання*

Національний університет біоресурсів та природокористування України,
вул. Полковника Потехіна, 16, корпус 12, м. Київ, 03041, Україна

Дослідження властивостей ліофільно висушених зразків гемолітичної пастерели в атмосфері різного хімічного та фізичного стану після 12 місяців зберігання при 4-10⁰ С виявились наступними. Втрати живих клітин у зразках, закупорених в ампулах в атмосфері азоту становило 24,5%, аргону – 43,7%, а в запаяних ампулах з вакуумом – 14,7%. При температурі зберігання 20-22⁰ С ці показники відповідно становили – 76,8%, 80,6% та 67, 5%. Середні показники виживання пастерел дозволяють виявити вірогідну різницю ($p < 0,05$) між їх кількістю у ампулах з атмосферою інертних газів в порівнянні з ампулами, запаяними під вакуумом.

Отримані дані дозволяють стверджувати, що життєздатність бактерій в ампулах з атмосферою азоту має рівень, який відповідає міжнародним вимогам по роботі з біологічними бактерійними препаратами.

Ключові слова: ГЕМОЛІТИЧНА ПАСТЕРЕЛА, ЛІОФІЛІЗОВАНА КУЛЬТУРА, ТЕМПЕРАТУРНИЙ ЧИННИК, АТМОСФЕРА ЗБЕРІГАННЯ.

Більшість дослідників вважає, що найбільш важливими факторами, які впливають на забезпечення високої життєздатності клітин та частинок у висушених бактерійних та вірусних препаратах, є: температура та атмосфера зберігання (склад газового середовища, яким заповнені флакони або ампули) [1].

Підбір оптимального температурного режиму при зберіганні ліофілізованих мікроорганізмів не викликає у дослідників сумніву. Всі виходять із того, що чим нижче температура камери, тим більше ймовірність збереження максимальної кількості живих клітин. Як правило, автори, що вивчали вплив умов зберігання на життєздатність ліофілізованих мікроорганізмів, спостерігали їх при температурі від 0⁰С до 37⁰С [2].

Результати численних досліджень свідчать, що температуру від 0⁰С до 6⁰С можна вважати цілком задовільною для тривалого зберігання висушених бактеріальних культур [3].

В останні роки все більшого значення набув метод зберігання мікроорганізмів при низьких температурах (від -20⁰С до -85⁰С).

Вивчаючи переваги низькотемпературного зберігання, деякі дослідники відмічали, що генетичні зміни при використанні цього методу консервації – досить рідкісні, і культури мікроорганізмів, що зберігаються у замороженому стані при низьких температурах, виявляються менш пошкодженими та мають вищий рівень життєздатності, ніж при висушуванні та ліофілізації. При низьких температурах можна зберігати і ліофілізовані препарати [2].

Проте створення та підтримання низьких температур потребує спеціального холодильного обладнання, безперебійної його роботи та значної кількості енергії.

Іншим перспективним методом тривалого зберігання мікроорганізмів є кріоконсервація (заморожування та зберігання у рідкому азоті при температурі -196⁰С). Час зберігання кріоконсервованих культур дуже тривалий. Стосовно деяких мікроорганізмів

кріоконсервування є єдиним можливим способом їх тривалого зберігання, оскільки при ліофілізації та інших методах консервації мікроорганізмів можуть відбуватися порушення, що не відновлюються при реактивації: ушкодження клітинних мембран, ядерного апарату. Можливим є також виникнення мутацій, пов'язаних з процесами регідратації. Проте застосування кріоконсервації технічно можливе тільки для тривалого зберігання колекційних культур мікроорганізмів. Крім того, при великих обсягах виробництва ліофілізованих біопрепаратів це було б дуже дорого [4, 5, 6, 7].

Таким чином, найбільш оптимальним способом тривалого зберігання культур мікроорганізмів на сьогоднішній день є ліофілізація та подальше зберігання при температурах, близьких до 0°C [8, 9].

Метою досліджень стало співставлення результатів щодо стабільності ліофільно висушеної культури гемолітичної пастерели за різних температур та атмосфери зберігання. Оскільки під час зберігання допустимий певний відсоток відмирання клітин у ліофільно висушеному бактеріальному матеріалі, необхідно виявити, на якому етапі зберігання показник відмирання є найвищим.

Матеріали і методи. Тривале зберігання епізоотичних штамів гемолітичної пастерели досягали ліофільним висушуванням, яке проводили на базі ІВМ НААН. Висушені та запаєні в атмосфері вакууму ампули з культурою були закладені на зберігання при $t +4-10^{\circ}\text{C}$, $20-22^{\circ}\text{C}$ в умовах різної атмосфери.

Для визначення оптичної концентрації зразок попередньо ресуспендували фізіологічним розчином в 10 разів. Завись пастерел в об'ємі 0,5 мл вносили у пробірку малого діаметра, ретельно суспендували з попередньо мірно налитим у неї фізіологічним розчином (4,5 мл) та порівнювали з оптичним стандартом каламутності. У тому випадку, якщо корекція завись не була потрібна, визначали її загальну кількість у пробірці (0,5 мл + 4,5 мл = 5 мл), отримане число подвоювали, оскільки взято 0,5 мл суспензії, а помножуючи на десять (розведення зразка) та на 1,65 (коефіцієнт каламутності) визначали оптичну концентрацію (ОК) пастерел у даній серії зразків ($5 \times 2 \times 10 \times 1,65 = 16,5$) або ОК = 165 млрд м.к./мл [10].

Концентрацію життєздатних мікробних клітин у ліофільно висушених зразках визначали культуральним методом. Для цього зразки (по три ампули) ресуспендували стерильним фізіологічним розчином, охолодженим до 4°C, та змішували, переносячи в 200 мл флакони з фізіологічним розчином із розрахунку 1:10 (12-18 мл сухої вакцини в 120-130 мл фіз. розчину). Отриману суспензію розводили у пробірках послідовно, десятикратно до концентрації 10^{-3} та 10^{-9} , використовуючи для кожного розведення окрему піпетку. Завись культури пастерел із двох послідовних розведень у дозі по 0,1 мл висівали відповідно в три чи п'ять чашок Петрі, на агар, виготовлений на основі перевара Хотінгера, з попередньо перевіреними ростовими властивостями. Посіви інкубували у термостаті при 37°C протягом доби, колонії, що вирости, підраховували за допомогою електронного лічильника колоній фірми «ARTEKCOUNTER» (США).

Після початкового контролю життєздатності препарату виживаність мікробних клітин у зразку, що зберігалася при температурі 4-10°C та 20-22°C, перевіряли через певний період часу.

Результати й обговорення. Питання стабільності ліофільно висушеної культури, а саме – максимальне збереження її життєздатності – надзвичайно важливий показник мікробіологічної роботи. Особливу цікавість становить вивчення впливу на збереженість життєздатності ліофілізованої культури газового складу наповнювача ампул після власне ліофілізації. У зв'язку з цим був проведений аналіз та дана оцінка життєздатності клітин гемолітичної пастерели, ампули з якою були наповнені відповідно азотом, аргоном або просто були запаєні в атмосфері вакууму. В досліді використані матеріали, які відображають вміст живих пастерел в ампульованих ліофілізованих зразках при зберіганні їх протягом 12 місяців з моменту визначення початкової концентрації.

Інформація багатьох дослідників по визначенню впливу температури зберігання на життєздатність ліофілізованих культур гемолітичної пастерели дозволяє вважати цілком придатний для цього температурний режим від 4 до 10°C. Такі параметри порівняно легко створити та підтримувати з урахуванням значних обсягів ліофілізованих культур, які закладені на зберігання.

Враховуючи ці факти, ми перевіряли життєздатність ліофілізованого штаму гемолітичної пастерели, зберігаючи її при такій температурі (таблиця 1).

Таблиця 1

Вживання пастерел при температурі зберігання 4-10 °C

Атмосфера зберігання	К-сть зразків	Відсоток живих пастерел у термін дослідження				
		3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	16 міс.
Азот	15	87,4±2,8	82,3±4,9	79,0±4,5	75,5±3,9	62,7±3,8
Аргон	15	84,5±3,2	78,5±5,6	67,5±7,3	65,3±7,1	50,6±8,0
Вакуум	15	94,7±2,0	90,6±2,5	89,5±3,2	85,3±4,9	75,0±2,4

Дані таблиці 1 відображають динаміку відмирання мікробних клітин в залежності від термінів та атмосфери зберігання. Максимальне відмирання пастерел приходилося на перші три місяці зберігання ліофілізованих культур. Після цього періоду кількість відмерлих клітин становило : в ампулах, заповнених азотом – 12,6%, аргоном – 15,5%, запаяних під вакуумом – 5,3%, тоді як за наступні 9 місяців їх кількість виявилась такою, що відповідала 11,9%, 19,2% та 9,4%.

Отримані результати дозволили виявити вірогідну різницю ($p < 0,05$) між кількістю живих клітин в ампулі, запаяній в атмосфері інертних газів, у порівнянні з препаратом, запаяною в ампулах під вакуумом. Причому це спостерігалось після кожної перевірки, а саме через 3,6,9,12 та 16 місяців з моменту проведення початкової перевірки виживання пастерел.

Ці дослідження продемонстрували, що в ампулах з культурою пастерел, заповненої азотом, через 16 місяців збереглося в середньому $11,2 \times 10^{11}$ пастерел. Таким чином, в об'ємі препарату при перерахунку на його початкову концентрацію, було нараховано 49,8% живих клітин.

Отримані результати дозволили зробити висновок, що середня кількість живих пастерел в ампулах з ліофілізованим штамом з об'ємною концентрацією кисню 0,99-1,16%, вірогідно ($p > 0,05$) не відрізняється від кількості в ампулах, запаяних в атмосфері під вакуумом. В той час різниця між середнім числом живих пастерел у ампулах з вмістом 5,17-5,40% кисню, та кількістю живих клітин в контрольних зразках ампул виявилась суттєвою ($p < 0,05$).

Вибір діапазону температур 20-22°C для перевірки її впливу на життєздатність ліофілізно висушених штамів гемолітичної пастерели пояснюється тим, що більшість робіт з культурою здійснюються найчастіше саме за такого режиму. Крім того, така температура або наближена до неї може стати визначальною у разі відмови роботи холодильного обладнання або з інших причин.

Таблиця 2

Вживання пастерел в зразках при температурі зберігання 20-22° C

Атмосфера зберігання	К-сть серій	Відсоток живих пастерел у термін дослідження				
		3 міс.	6 міс.	9 міс.	12 міс.	16 міс.

Азот	15	49,4±3,2	39,2±3,9	29,0±3,9	23,1±3,4	11,5±2,7
Аргон	15	49,2±3,7	35,3±4,5	25,9±2,8	19,4±3,1	9,7±1,7
Вакуум	15	58,6±4,1	43,6±2,2	37,8±3,2	32,4±3,2	21,0±1,6

Результати, відображені в таблиці 2 свідчать про стабільне значне відмирання мікробних клітин в усіх серіях зразків ліофільно висушених ампульованих культур пастерел. Протягом перших трьох місяців зберігання середня кількість нежиттєздатних пастерел становила: в ампулах, запаяних в атмосфері азоту – 50,6%, аргону – 59,8%, а запаяних під вакуумом – 41,4%.

В подальшому по закінченні кожних трьох місяців зберігання кількість нежиттєздатних пастерел становила близько 10-15%, а після 16 місячного зберігання кількість життєздатних клітин становила в ампулах, заповнених азотом – 11,5±2,7, аргонном – 9,7±1,7, а в ампулах, запаяних під вакуумом – 21,0±1,6%. Результати кожної з перевірок дозволили виявити вірогідну різницю ($p < 0,05$) між середнім числом живих пастерел в дослідних та контрольних зразках ампул.

Порівняння результатів виживання пастерел в ліофільно висушеній культурі, запаяній в атмосфері азоту з вмістом 0,99-1,16% кисню з кількістю живих клітин в ампулах, запаяних під вакуумом, дозволило виявити відсутність між ними суттєвої різниці ($p > 0,05$).

Аналогічне порівняння між культурою з об'ємною концентрацією кисню 5,17-5,40% та контрольними серіями препарату свідчило про вірогідну різницю ($p < 0,05$). Така статистика була отримана після кожної перевірки життєздатності ліофільно висушеної культури за температури зберігання 20-22°C.

Таким чином, на підставі отриманих даних, складно часом займатись прогнозуванням стабільності ліофілізованих культур гемолітичної пастерели при температурі її зберігання 4-10 °C та 20-22°C.

Висновки.

1. Зразки ліофільно висушеної культури *Pasteurella haemolytica*, яка зберігалась 12 місяців при температурі 4-10 °C в атмосфері азоту, аргону та вакууму, втрачали відповідно 24,5%, 34,7% та 14,7% життєздатних клітин.

2. Зберігання аутентичних зразків ліофілізованої гемолітичної пастерели за тих же умов, але при температурі 20-22°C, призвели до втрати 76,8% життєздатних бактерій в атмосфері азоту; 80,6% бактерій в атмосфері аргону та 67,5% - під вакуумом.

3. Найбільший вплив на швидкість відмирання бактерійних клітин у ліофілізованих зразках мав температурний фактор, ступінь дієвості якого становила 91,3%.

Перспективи подальших досліджень. Перспективою роботи вважаємо вивчення впливу цих чинників на імуногенні властивості ліофілізовані пастерел, які зберігатимуться при різних температурних та газових режимах.

Анотація. Влияние температурного и атмосферного фактора на жизнеспособность лиофильно высушенной гемолитической пастереллы

Т.В.Мазур, доктор ветеринарных наук, профессор

Г.П. Сивовол, бакалавр 2-го года обучения

Киев, ул. Полковника Потехина, 16, корпус 12, НУБиП Украины

Исследование свойств лиофильно высушенных образцов гемолитической пастереллы в атмосфере разного химического и физического состояний после 12 месяцев сохранения при 4-10° C оказались следующими. Потери живых клеток в образцах, укупоренных в ампулах в атмосфере азота составило 24,5%, аргона – 43,7%, а в запаяных ампулах с вакуумом – 14,7%. При температуре хранения 20-22° C эти показатели соответственно равнялись – 76,8%, 80,6%

та 67, 5%. Средние показатели выживания пастерел позволяют выявить достоверную разницу ($p < 0,05$) между их количеством в ампулах с атмосферой инертных газов в сравнении с ампулами, запаянными под вакуумом.

Полученные данные позволяют утверждать, что жизнедеятельность бактерий в ампулах с атмосферой азота имеет уровень, который соответствует международным требованиям по работе с биологическими бактериальными препаратами.

Summary

Influence of temperature and atmospheric factor on the viability of lyophilically dried Haemolytic pasteurilla

T.V.Mazur, D.H., professor

G.P. Sivovol, student of 2nd year of training

Kiev, str. Polkovnyk Potekhin, 16, building 12, NULES of Ukraine

The study of the properties of lyophilically dried samples of hemolytic pasteuril in an atmosphere of various chemical and physical state after 12 months of storage at 4-10 ° C was as follows. Loss of living cells in specimens enclosed in ampoules under an atmosphere of nitrogen was 24.5%, argon - 43.7%, and in sealed vials with vacuum - 14.7%. At a storage temperature of 20-22 ° C, these indicators were 76.8%, respectively. 80.6% and 67.5%. The average survival rates of pasteurals make it possible to detect a probable difference ($p < 0,05$) between their number in ampoules with an atmosphere of inert gases compared with vials sealed under vacuum. The obtained data suggest that the viability of bacteria in ampoules with nitrogen atmosphere has a level that meets the international requirements for working with biological bacterial agents.

Література.

1. Голдовский А.М. Анабиоз. – Л.Наука.-1981.-136с.
2. Aschwood-Smith M.J. Preservation of microorganisms by freezing and desiccation //in: Low temperature preservation in medicine and biology /Ed. By M.J. Aschwood-Smith and J. Farrant.- London:Pitman Press.- 1980.- p.219-225.
3. Ветеринарные препараты /Справочник/ под ред. Д.Ф.Осидзе.- М.:Колос.-1981.-448с.
4. Пушкарь Н.С., Белоус А.М., Цветков И.Д. Теория и практика криогенного и сублимационного консервирования.-Киев, Наукова думка.- 1984.-295с.
5. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении. –Киев, Наукова думка .-1982.-255с.
6. Беккер М.Е., Далиберг Б.Е., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. – Рига, Зинантне.-1981.- 227с.
7. Тутова Э.Г., Куц П.С. Сушка продуктов микробиологического происхождения.// М.-В.О. «Агропромиздат».-1987 - 303с.
8. Герна Р. Хранение микроорганизмов. \\\ Методы общей бактериологии// М.Мир.- 1984.- т.1.- с.512-533.
9. Griffin C.W., Cook E.S. Predicting the stability of freeze-dried Fuzobacterium mortiferum proficiency testing samples by accelerated storage test // Cryobiology.- 1981.-v.18 - N.5.- p.420-425.
10. Герхард Ф. Растворы для разведения и измерения биомассы.// М.Мир.-1984.- т.3.- с.231-238

Рецензент: Яблонська Оксана Валентинівна, доктор ветеринарних наук, професор, кафедра мікробіології, вірусології та біотехнології НУБіП