

was 82–86% of the initial virus activity. The minimum indicators of the virus infectious activity at both temperatures were in media with sodium alginate and peptone.

Taking into account that only sucrose-supplemented medium showed significant efficacy compared to the medium without additives at  $-80^{\circ}\text{C}$ , the protective medium based on the virus growth medium with the addition of sucrose was recommended for long-term storage of the rabies virus standard strain CVS in manufacture of rabies biologicals (5–7.5%) and storage temperature of  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**Key words:** rabies virus, cell culture, long-term storage, protective media, virus preservation, virus infectious activity.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.  
Стаття надійшла 02.10.2019 року

DOI 10.29254/2077-4214-2019-4-1-153-211-213

УДК 57.083.1:57.086.132:579.861.2:57.083.182

Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А., Скляр Н. І., Крестецька С. Л., Большакова Г. М.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ВІДПОВІДНОСТІ ТАКСОНОМІЧНОМУ ПОЛОЖЕННЮ ЛІОФІЛІЗОВАНИХ КУЛЬТУР МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова Національної академії медичних наук України» (м. Харків)

lazamimus@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Робота є фрагментом фундаментальної НДР «Дослідження закономірностей еволюції антибіотикорезистентності у найпоширеніших різновидів збудників гнійно-запальних інфекцій», № державної реєстрації 0118U004052.

**Вступ.** Музей мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН» має одну з найбільших та найстаріших у Європі колекцій мікроорганізмів, яка існує з часу створення Інституту (з травня 1886 року). Колекція постійно поповнюється штамми, серед яких збудники нових та маловивчених інфекцій з авторських колекцій співробітників Інституту та зарубіжних наукових установ (США, Франції, Чехії, Бельгії, Швеції, Німеччини та ін.). В колекційному фонді музею зберігаються мікроорганізми III-IV груп патогенності, вилучені в різні історичні періоди починаючи з кінця XIX століття. Серед них є типові, еталонні, виробничі, контрольні та актуальні штамми. Колекція являє собою унікальний ресурс для виконання фундаментальних досліджень і дає широке поле діяльності для порівняння біологічних властивостей історичних та сучасних штамів, у тому числі, для вивчення еволюції мікроорганізмів.

Основним критерієм якості способів тривалого зберігання мікроорганізмів у колекціях є можливість відновлення їх життєздатності та стабільність їх морфологічних, фізіологічних та генетичних властивостей [1,2]. Відомо, що ліофілізація дозволяє підтримувати штамми колекційного фонду без втрати життєздатності тривалий час (понад 50 років) [3-6], проте роботи з вивчення ефективності консервації мікроорганізмів різних видів вкрай важливі, оскільки дозволяють вносити суттєвий теоретичний та практичний вклад в збереження видового різноманіття мікрофлори [7].

**Мета дослідження.** Оцінка ефективності ліофілізації *S. aureus*, як методу їх довготривалого збереження. Перевірка життєздатності та відповідності таксономічному положенню музейних штамів стафілококів, що тривалий час зберігались у колекції Музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН».

**Об'єкт і методи дослідження.** У дослідженні використано 25 ліофілізованих зразків 23-х штамів *S. aureus*, виділених у період з 1930 по 1986 роки. Штами зберігались у ліофілізованій формі від 17 до 62 років.

Ліофілізовані культури відновлювали шляхом розчинення вмісту ампули 1,0 мл поживного бульйону та висіву мікробної суспензії з десятикратних розведень на агаризоване середовище (кров'яний агар). Життєздатність визначали за методом Коха [8]. Реідентифікацію мікробних культур проводили з використанням API системи виробництва «Bio-Merieux», Франція (ID 32 STAPH). Фенотипову внутрішньоштамову гетерогенність популяції оцінювали за показником індексу дисоціації, який відображує частку (%) певних форм колоній (S-, R-, D- форм) відносно загальної їх кількості. Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою методів параметричної статистики з використанням комп'ютерних програм Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0. Встановлення взаємозв'язків між змінними проводили за допомогою кореляційного аналізу [9].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Серед взятих у дослід 25 ліофілізованих культур *S. aureus* відновлено життєздатність (92,0±5,4) % зразків. Не вдалось рекультивувати два зразки штаму *S. aureus* 75 (16553) 1971 року ліофілізації, але зазначений штам 1972 року ліофілізації було успішно відновлено. Таким чином, для подальших досліджень відібрано 23 штамми *S. aureus*. Встановлено, що кількість життєздатних клітин у відновлених штамів варіювала у межах від  $10^3$  до  $10^9$  КУО/мл. З урахуванням того, що при виготовленні ліофілізованих зразків використовують мікробні суспензії з вмістом мікроорганізмів не менш ніж  $10^9$  КУО/мл, середній показник виживання досліджених штамів склав (7,19±5,4) %.

Стовідсоткове виживання, що відповідає кількості життєздатних клітин  $10^9$  КУО/мл, виявлено у 2 (8,7± 5,9) % штамів, це штамми *S. aureus* 201 (16562) і *S. aureus* 456 (16571) 1967 та 1972 років ліофілізації відповідно. Найменший показник виживання – 0,0001 %, встановлено у 3 (13,0± 7,0) % штамів – *S. aureus* ІФ-3 (16570) 1969 року ліофілізації та *S. aureus* ВЛ (16576) і *S. aureus* 906 (16577) 2001 року ліофілізації. У переважній більшості штамів показники виживання коливались у межах від 0,5 % до 10,0 %. Кореляційної залежності між кількістю КУО та терміном зберігання зразка не виявлено ( $r=0$ ). Так, кількісний показник життєздатності штамів *S. aureus* 201 (16562), виділе-

ного у 1955 році та ліофілизованого у 1956 році, та *S. aureus* 456 (16571), виділеного у 1963 році та ліофілизованого у 1972 році, складав  $10^9$  КУО/мл, у той час, як у штамів *S. aureus* ВЛ (16576) та *S. aureus* 906 (16577) 2001 року ліофілізації – лише  $10^3$  КУО/мл.

При дослідженні морфологічних, тинкторіальних та культуральних властивостей рекультивованих штамів встановлено, що взяті у дослід культури відповідали типовим характеристикам роду *Staphylococcus*. На кров'яному агарі досліджені культури утворювали округлі, опуклі або плоскі колонії сірого, білого, кремового або жовтого кольору, переважна більшість штамів ( $78,3 \pm 8,6$ ) % – з зонами  $\alpha$ - ( $33,3 \pm 11,0$ ) % або  $\beta$ -гемолізу ( $66,7 \pm 11,0$ ) %. При посіві на жовточно-сольовий агар у ( $65,2 \pm 9,9$ ) % штамів виявлялась лецитовітелазна активність. Колонії досліджених стафілококів були представлені S-, R- та D-формами. Питома вага штамів з мономорфним S-фенотипом складала ( $17,4 \pm 7,9$ ) %, D-фенотипом – ( $8,7 \pm 5,9$ ) %, решта досліджених штамів ( $73,9 \pm 8,8$ ) % характеризувалась колоніальним поліморфізмом з превалюванням змішаного S-R фенотипу – ( $39,1 \pm 10,2$ ) %. Показники індексу дисоціації мікробних популяцій при рекультивуванні досліджених штамів стафілококів варіювали від 10,0 % до 90,0 %.

При статистичній обробці даних виявлено кореляційний зв'язок між показниками індексу дисоціації та терміном зберігання зразка у ліофілизованому стані. Коефіцієнт кореляції Спірмена (rs) дорівнював 0,573, зв'язок між досліджуваними ознаками прямий, сила зв'язку за шкалою Чеддока помірна, залежність ознак статистично значима ( $p < 0,05$ ).

Виявлений нами колоніальний поліморфізм досліджених штамів стафілококів, на наш погляд, обумовлений адаптацією до стресових умов існування та сприяє підвищенню виживання бактеріальної популяції при довготривалому зберіганні у ліофілизованій формі. На думку деяких дослідників [10] гетерогенна система виявляє більшу стійкість до впливу несприятливих факторів, й розподіл на різні колоніальні форми, як варіант цілеспрямованої перебудови популяції бактерій, призводить до розширення меж виживання виду. В цьому полягає біологічне значення процесу дисоціації.

За результатами вивчення біохімічних властивостей досліджених штамів встановлено відповідність ( $69,6 \pm 9,6$ ) % зразків первинній видовій ідентифікації *S. aureus*, зазначеній у паспорті штамів. Решта штамів ( $30,4 \pm 9,6$ ) % за своїм біохімічним профілем відносились до роду *Staphylococcus*, але до інших його видів

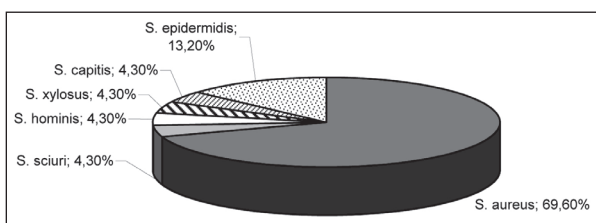


Рисунок – Розподіл стафілококів за видовою приналежністю.

(рис.). Так, штам *S. aureus* 1601 (16556), 1930 року виділення; *S. aureus* «Стоякін» (16566), 1964 року виділення; *S. aureus* ВЛ (16576), 1986 року виділення віднесено до *S. epidermidis*. Штам *S. aureus* 906 (16577), виділений у 1969 році, за біохімічним профілем відповідає *S. hominis*, штам *S. aureus* 228 (16563), виділений у 1955 році – *S. xylosum*, штам *S. aureus* ІФ-3 (16570), 1969 року виділення – *S. capitis*, а штам *S. aureus* «Курочка» (16567), 1964 року виділення – *S. sciuri*.

На наш погляд, виявлені таксономічні розбіжності можуть бути пов'язані з тим, що в середині минулого століття критерії біохімічної ідентифікації мікроорганізмів відрізнялись від положень сучасної мікробіологічної систематики. Крім того, до публікації у 1980 році першого видання «Затверджених списків назв бактерій» (Skerman et al., 1980) одні й ті ж самі мікроорганізми могли мати різні найменування.

### Висновки

1. Лофільне висушування бактерій є ефективним способом для довготривалого зберігання штамів мікроорганізмів у колекціях – при рекультивуванні музейних культур стафілококів, що зберігались у ліофілизованій формі від 17 до 62 років, відновлено життєздатність 92,0 % штамів. Показники виживання у відновлених культур коливались у межах від 0,0001 % до 100,0 %, кількісні показники життєздатності залежали не від термінів зберігання ліофілизованних зразків, а від якості проведеної ліофілізації.

2. У рекультивованих зразках музейних штамів стафілококів спостерігався колоніальний поліморфізм, ступінь дисоціації бактеріальної популяції залежав від тривалості зберігання ліофілизованної культури.

3. За результатами проведеної реідентифікації 23 музейних штамів стафілококів встановлена відповідність біохімічному профілю *S. aureus* у 69,6 % штамів. Для решти стафілококів уточнено видову приналежність, внесені корективи в паспорти штамів.

**Перспективи подальших досліджень.** Вивчити антибіотичну чутливість колекційних штамів стафілококів, вилучених у різні історичні періоди використання антибіотиків.

### Література

- Prakash O, Nimonkar Y, Shouche Y. Practice and prospects of microbial preservation. *Microbiology Letters*. 2013;339:1-9.
- Chervyakova NS, Valova TV, Osin AV. Ispol'zovanie liofil'ny'kh apparatov kamernogo tipa v kollektsiyakh patogenny'kh mikroorganizmov. *Problemy` osobo opasny'kh infektsij*. 2014;3:65-8. [in Russian].
- Pokhilenko VD, Baranov AM, Detushev KV. Metody` dlitel'nogo khraneniya kollektsionny'kh kul'tur mikroorganizmov i tendentsii razvitiya. *Izvestiya vy'sshikh uchebny'kh zavedenij. Povolzhskij region*. 2009;4(12):99-121. [in Russian].
- Zhurlov OS. Metod polucheniya i khraneniya bakterij so specyficheskimi fiziko-khimicheskimi svojstvami poverkhnostej. *Mezhdunarodny'j zhurnal prikladny'kh i fundamental'ny'kh issledovanij*. 2015;11(2):249-50. [in Russian].
- Sidorchuk AA. Sokhrannost` kul'tur bakterij razlichny'kh grupp pri dlitel'nom khranenii v liofilizirovannom sostoyanii. *RVZh SKhZh*. 2016;3:22-5. [in Russian].
- Kupletskaya MB, Netrusova AI. Zhiznesposobnost` liofilizirovanny'kh mikroorganizmov posle 50 let khraneniya. *Mikrobiologiya*. 2011;6(80):842-50. [in Russian].
- Grzegorzczak M, Kancelista A, Laba W, Piegza M, Witkowska D. The effect of lyophilization and storage time on the survival rate and hydrolytic activity of *Trichoderma* strains. *Folia Microbiologica*. 2018;63:433-41.
- Nikitina EV, Reshetnik OA. Metody` obshhej i speczial'noj mikrobiologii: uchebnoe posobie. Kazan: gos. tekhnol. un-t; 2006. 213 s. [in Russian].
- Lapach SN, Chubenko AV, Babich PN. Statisticheskie metody` v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniem Excel. K.: MORION; 2000. 320 s. [in Russian].

10. Milko ES, Krasilnikova EN, Milko DM. The value of the heterogeneity of the bacterial population created by the dissociation process for the growth of purple photosynthetic bacteria in their natural habitats. Bulletin of Moscow University. 2016;3:55-9.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИТТЄЗДАТНОСТІ ТА ВІДПОВІДНОСТІ ТАКСОНОМІЧНОМУ ПОЛОЖЕННЮ ЛІОФІЛІЗОВАНИХ КУЛЬТУР МУЗЕЙНИХ ШТАМІВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Перетятко О. Г., Ягнюк Ю. А., Скляр Н. І., Крестецька С. Л., Большакова Г. М.

**Резюме.** Основним критерієм якості способів тривалого зберігання мікроорганізмів у колекціях є можливість відновлення їх життєздатності та стабільність їх біологічних властивостей. Метою роботи була перевірка життєздатності та відповідності таксономічному положенню музейних штамів *S. aureus*, що тривалий час зберігались у колекції Музею мікроорганізмів ДУ «ІМІ НАМН». Об'єктом дослідження були 25 ліофілізованих зразків штамів *S. aureus*, які вилучені у період з 1930 по 1986 роки та зберігались у ліофілізованій формі від 17 до 62 років. Встановлено, що ліофільне висушування є ефективним способом для довготривалого зберігання штамів мікроорганізмів у колекціях, життєздатними виявились 92,0% зразків *S. aureus*. Встановлена відповідність біохімічному профілю *S. aureus* у 69,6% рекультивованих штамів.

**Ключові слова:** ліофілізація, музейні штами *S. aureus*, життєздатність, видова ідентифікація.

## ХАРАКТЕРИСТИКА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТІ И СООТВЕТСТВИЯ ТАКСОНОМИЧЕСКОМУ ПОЛОЖЕНИЮ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ КУЛЬТУР МУЗЕЙНЫХ ШТАММОВ STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Перетятко Е. Г., Ягнюк Ю. А., Скляр Н. И., Крестецкая С. Л., Большакова Г. М.

**Резюме.** Основным критерием качества способов длительного хранения микроорганизмов в коллекциях является возможность восстановления их жизнеспособности и стабильность биологических свойств. Целью работы была оценка жизнеспособности и соответствия таксономическому положению музейных штаммов *S. aureus*, длительно хранящихся в коллекции Музея микроорганизмов ГУ «ИМИ НАМН». Объектом исследования были 25 лиофилизированных образцов штаммов *S. aureus*, которые были выделены в период с 1930 по 1986 года и хранились в лиофилизированном виде от 17 до 62 лет. Установлено, что лиофилизация является эффективным способом для длительного хранения штаммов микроорганизмов в коллекциях, жизнеспособными выявились 92,0% образцов *S. aureus*. Установлено соответствие биохимическому профилю *S. aureus* у 69,6% восстановленных штаммов.

**Ключевые слова:** лиофилизация, музейные штаммы *S. aureus*, жизнеспособность, видовая идентификация.

## CHARACTERISTIC OF VITAL ACTIVITY AND CORRESPONDENCE TO THE TAXONOMIC POSITION OF THE LYOPHILIZED CULTURES OF THE MUSEUM STRAINS STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Peretyatko O. G., Yagnuk Y. A., Sklyar N. I., Krestetska S. L., Bolshakova G. M.

**Abstract.** The museum of microorganisms of SI «IMI NAMS» has one of the largest and oldest in Europe collections of microorganisms, that exists from the times of the creation of the institute. The basic criterion of the quality of the methods of the long-term storing of microorganisms in the collections is a possibility to renew their vital activity and stable their biological properties.

**Purpose of the research.** Estimation of effectiveness of the lyophilization as the method of their long-term storage. Checking vital activity and correspondence to the taxonomic position of the museum strains of *Staphylococcus*, which were stored in the collection of the museum of microorganisms of SI «IMI NAMS» for a long time.

**Object and the methods of research.** In the research 25 lyophilized samples of the 23rd strains *S. aureus*, isolated in the period since 1930 to 1986 the years were used. Strains were stored in the lyophilized form from 17 to 62 the years. The recultivation of strains and the estimation of their vital activity were conducted through Koch's method. Reidentification of microbial cultures was carried out with the use of API «Bio-Merieux», France (ID 32 STAPH). Statistical processing of obtained data was conducted with the use of methods of parametric statistics via Microsoft Excel 2007, STATISTICA 6.0.

**Results of the research and its consideration.** 92,0% of *S. aureus* renewed the vital activity. Affirmed, that a quantity of viable cells in the renewed strains varied from  $10^3$  to  $10^9$  CFU/ml, the average index of the survival of the investigated strains is 7,19%. The correlate dependence between a quantity CFU and the period of storage of the sample was not detected ( $r=0$ ).

When examining morphological, tinctorial and cultural properties of the recultivated strains it was established that the investigated strains corresponded to the standard characteristics of *Staphylococcus*. The investigated colonies of *Staphylococcus* were represented by S-, R-, D-forms. The index ratios of dissociation of microbial populations with the use of recultivation of the strains of *Staphylococcus* being investigated varied from 10,0% to 90,0%.

With the statistical processing of data, it was revealed that the correlation between the index ratios of dissociation and the period of storage of sample in the lyophilized state.

According to the results, the research of biochemical properties of the investigated strains the correspondence 69,6% of the samples of the primary specific identification to *S. aureus* was established. Remaining strains 30,4%, according to their biochemical profile, related to the type *Staphylococcus*, but to others species.

**Conclusion.** The lyophilization of bacteria is an effective method of the long-term storage of the strains of microorganisms in the collections. A colonial polymorphism was observed with the renewal of vital activity of the lyophilized samples of the museum strains of *Staphylococcus*. The dissociation degree of bacterial population with the use of recultivation was dependent on the duration of storage of the lyophilized culture. 69,6% of the recultivated strains corresponded to biochemical profile *S. aureus*.

**Key words:** lyophilization, museum strains of *S. aureus*, vital activity, species identification.

Рецензент – проф. Лобань Г. А.  
Стаття надійшла 04.10.2019 року