

УДК: 636.09:60:620.2–181.4

В. А. КОВТУН

В. О. УШКАЛОВ, доктор ветеринарних наук, член-кореспондент НААН

О. В. МАЧУСЬКИЙ

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м.Київ

ДИНАМІКА ЗБЕРЕЖЕНОСТІ *LISTERIA IVANOVII* ПІСЛЯ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ РІЗНИХ КОНЦЕНТРАЦІЙ АЕРОСИЛУ А-300

*У статті наведено дані щодо використання діоксиду кремнію (аеросилу А-300) як однієї зі складових частин захисного середовища для ліофільного висушування бактерій роду *Listeria*. Визначено оптимальну концентрацію аеросилу, що дає високу збереженість мікробних клітин при ліофільному висушуванні, а також зберігання впродовж 12 місяців.*

Ключові слова: ліофільне висушування, аеросил, кріопротектор, збереженість.

Важливе значення при довгостроковому зберіганні мікроорганізмів належить підбраному методу збереження. При такому методі як висушування із замороженого стану один з головних моментів належить захисним середовищам [1].

У Національному центрі штамів мікроорганізмів (НЦШМ) зберігається колекція із понад 500 штамів, що підтримується у життєздатному стані. Тому, розробка нових захисних середовищ, що забезпечували б високий рівень збереженості мікробних культур на сьогоднішній день є актуальним.

Досить широке використання має діоксид кремнію (високодисперсний кремнезем), а саме аеросил, який застосовують у легкій, хімічній, нафтопереробній та нафтохімічній промисловості [2,3].

За літературними даними доцільним вбачається використання захисних середовищ з додаванням аеросилу, що забезпечує підвищення виходу мікробних клітин [4].

Метою досліджень було вивчення впливу різних концентрацій аеросилу у складі захисного середовища Файбіча на рівень збереженості *Listeria ivanovii* при ліофільному висушуванні та при зберіганні.

Матеріали і методи

Для дослідження було використано штам *Listeria ivanovii* 0811i, що депонований у НЦШМ, та високодисперсний кремнезем А-300, середній розмір частинок якого складав 5-20 нм [2, 5].

Об'єктом досліджень була збереженість штаму при сублімаційному висушуванні та впродовж 12 місяців, а також біологічні властивості штаму.

Ліофільне висушування *Listeria ivanovii* 0811i проводили в апараті фірми «Telstar LP3» з глибоким вакуумом 0,17 мВ і температурою конденсора 45-50⁰С.

В якості кріопротекторів використовували сахарозо-желатинові захисні середовища з різними концентраціями аеросилу А-300, розчин якого готували на дистильованій воді та автоклаували за температури 121⁰С протягом 20 хвилин. Контрольним середовищем було середовище Файбіча (10% сахарози та 1% желатини). При цьому кріопротектор додавали до культури лістерій у співвідношенні 1:1. Дослід було виконано в 5 повторах.

Збереженість культури визначали шляхом підрахунку кількості колонієутворюючих одиниць (КУО) до і після сублімації та розрахунком відсотка збереженості за загальноприйнятою методикою [6]. Підрахунок КУО проводили в 5 повторах.

Отримані результати обробляли статистично та математично методами варіаційної статистики з використанням програми «Microsoft Excel – 7,0» із обчисленням середнього арифметичного (М), стандартної помилки (m), та рівня вірогідності (p) за таблицею Стюдента. Для позначення кількості повторностей дослідів використовували латинську літеру «n» [7].

Вивчення біологічних характеристик штаму проводили за культуральними, морфологічними, біохімічними та гемолітичними властивостями.

Вивчення культуральних властивостей проводили шляхом висіву дослідного мікроорганізму в рідкі (МПБ, ГРБ-бульйон та бульйон Хоттінгера) і на щільні середовища (МПА, ГРБ-агар, агар Хоттінгера, Palcam та Oxford) та культивуванням за температури 37±1⁰С протягом 24 годин. МПБ, МПА, бульйон та агар Хоттінгера виготовляли із рН 7,2-7,4 за загальноприйнятими методиками [8].

Для виготовлення ГРБ бульйону та агару використовували стандартизоване комерційне середовище «ФГУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии». При цьому МПБ та ГРБ-бульйон збагачували шляхом додавання 10 відсотків інактивованої сироватки крові коня та 1-го відсотка 40%-го розчину стерильної глюкози. Для виготовлення Palcam та Oxford використовували стандартизовані комерційні середовища HiMedia.

Морфологію культур вивчали шляхом виготовлення мазків з добової бульйонної та агарової культур і фарбуванням їх за Грамом.

Біохімічну активність визначали шляхом культивування в напіврідких середовищах Гісса з вуглеводами (глюкозою, мальтозою, сахарозою, лактозою, ксилозою, рамнозою) протягом 10 діб за температури 37±1⁰С.

Визначення гемолітичних властивостей проводили шляхом культивування на щільному середовищі з додаванням дефібринованої крові барана та проведенням CAMP-test з використанням двошарового кров'яного середовища за температури 37±1⁰С. Методику постановки проводили відповідно до ДСТУ ISO 11290 [9].

Результати та обговорення

З попередньо опублікованих результатів наших досліджень [4], що відображали різнобічний вплив концентрацій аеросилу на збереженість *Listeria ivanovii* 0811i після ліофільного висушування, найбільший вихід мікробних клітин та, відповідно, найвищий відсоток збереженості було відмічено при використанні сахарозо-желатинового середовища із додаванням аеросилу А-300 в

концентрації 0,1 % та склав $(87,05 \pm 0,5)$, що достовірно ($p < 0,01$) вище на 3,68 % у порівнянні із контролем $(83,37 \pm 0,9)$. Найгірші результати були отримані при використанні в захисному середовищі лише аеросилу А-300 в концентраціях 0,001 %, 0,005 % та 0,01 %, де збереженість після ліофільного висушування склала менше 20 % [4].

Через 12 місяців зберігання штам *L.ivanovii 0811i* було повторно досліджено за показниками: кількість КУО в 1 см^3 , культурально-морфологічні, біохімічні та гемолітичні властивості (табл. 1).

Таблиця 1

Результати визначення кількості мікробних тіл *L.ivanovii 0811i* до висушування, при висушуванні та через 12 місяців зберігання (n=5)

Конц. аеросилу А-300, %	Захисні середовища						
	аеросил А-300		аеросил А-300+Файбіча		Файбіча		
	Термін спостереження						
	після ліофільного висушування	12 міс.	після ліофільного висушування	12 міс.	Після ліофіль. вис.	Через 12 міс.	
0,001	$(0,75 \pm 0,09) \times 10^8$	$(3,91 \pm 0,12) \times 10^7$	$(4,43 \pm 0,1) \times 10^8$	$(3,95 \pm 0,14) \times 10^8$	$(5,66 \pm 0,06) \times 10^8$	$(4,78 \pm 0,12) \times 10^8$	
0,005	$(1,04 \pm 0,07) \times 10^8$	$(5,14 \pm 0,16) \times 10^7$	$(4,53 \pm 0,26) \times 10^8$	$(4,08 \pm 0,06) \times 10^8$			
0,01	$(1,27 \pm 0,02) \times 10^8$	$(6,45 \pm 0,04) \times 10^7$	$(4,36 \pm 0,14) \times 10^8$	$(4,18 \pm 0,16) \times 10^8$			
0,02	$(2,95 \pm 0,1) \times 10^8$	$(2,1 \pm 0,08) \times 10^8$	$(4,64 \pm 0,04) \times 10^8$	$(4,33 \pm 0,18) \times 10^8$			
0,1	$(3,15 \pm 0,15) \times 10^8$	$(2,2 \pm 0,03) \times 10^8$	$(5,91 \pm 0,03) \times 10^8$	$(5,77 \pm 0,09) \times 10^8$			
0,15	$(3,38 \pm 0,08) \times 10^8$	$(2,5 \pm 0,18) \times 10^8$	$(4,86 \pm 0,06) \times 10^8$	$(4,68 \pm 0,07) \times 10^8$			
0,2	$(3,78 \pm 0,11) \times 10^8$	$(2,88 \pm 0,05) \times 10^8$	$(3,51 \pm 0,14) \times 10^8$	$(3,4 \pm 0,13) \times 10^8$			
0,3	$(3,95 \pm 0,06) \times 10^8$	$(2,96 \pm 0,1) \times 10^8$	$(3,28 \pm 0,18) \times 10^8$	$(3,14 \pm 0,12) \times 10^8$			
До висушування		$(6,8 \pm 0,05) \times 10^8$					

Так, за результатами досліджень, що відображені в табл. 1 та на рис. 1, найбільшу кількість КУО та найвищий відсоток збереженості $(84,92 \pm 0,3)$ після зберігання впродовж 12 місяців виявлено при використанні середовища Файбіча з додаванням аеросилу А-300 в концентрації 0,1 %, що достовірно вище на 14,5 % у порівнянні із контролем $(70,42 \pm 1,1)$. При додаванні аеросилу у концентрації 0,15 % відмічено менший відсоток збереженості порівняно із контрольним середовищем на 1,58 %. При використанні аеросилу А-300 як основного кріопротектору найвищий відсоток зберігання через 12 місяців відмічено при концентраціях 0,2 % та 0,3 % що становить $(42,42 \pm 1,2)$ та $(43,58 \pm 0,7)$ відповідно. Найнижчий відсоток збереженості відмічено при використанні концентрацій 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %.

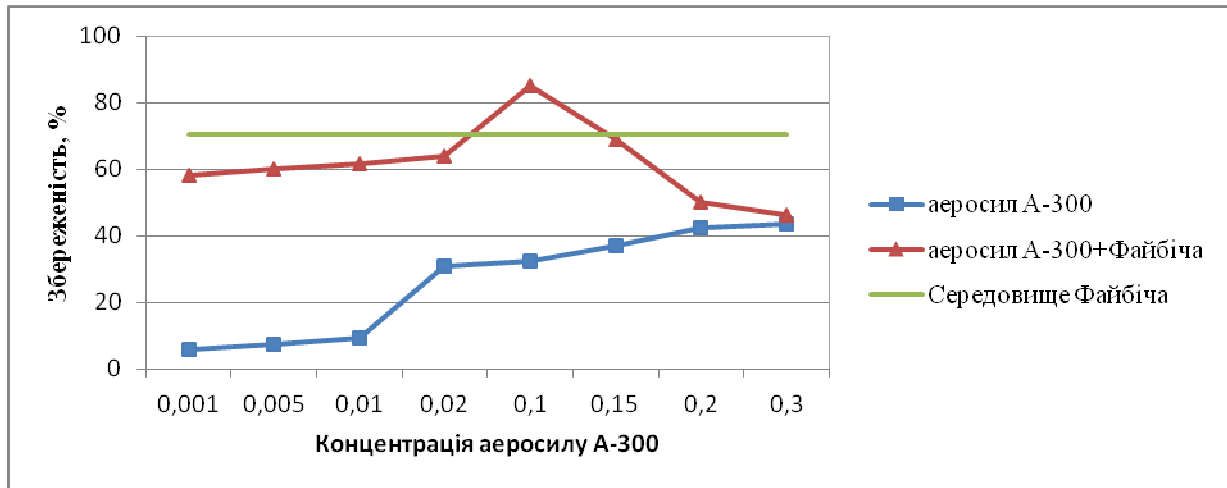


Рис. 1. Збереженість *L.ivanovii 0811i* через 12 місяців зберігання, (n=5)

Порівнюючи результати збереженості штаму після ліофільного висушування та через 12 місяців зберігання з використанням захисного середовища Файбіча з додаванням аеросилу А-300, що відображені в табл. 1 та на рис. 2, маємо зазначити, що відмічено стабільну динаміку збереженості відносно концентрації 0,1 %.

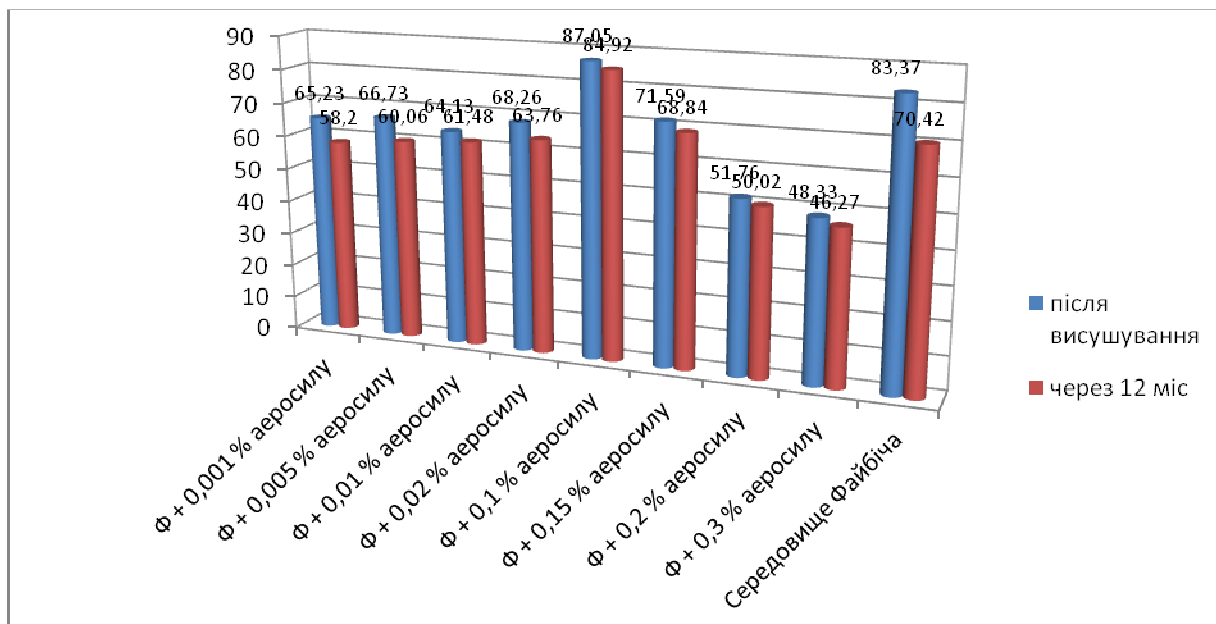


Рис. 2 Динаміка збереженості *Listeria ivanovii 0811i* після ліофілізації та після 12 місяців зберігання (захисне середовище – Файбіча + аеросил А-300)

Зведені результати впливу аеросилу А-300 на збереженість культури вказують на те, що дія кріопротектору була прямо пропорційною до його концентрації як після ліофілізації, так і через 12 місяців (табл. 1, рис. 3). Найвищий рівень збереженості спостерігався під час додавання 0,3% аеросилу до захисного середовища, найменший – при 0,001% аеросилу, але у всіх випадках аеросил А-300 виявляв кріопротекторну дію прямо пропорційно до його концентрації, що дає підстави на подальші дослідження.

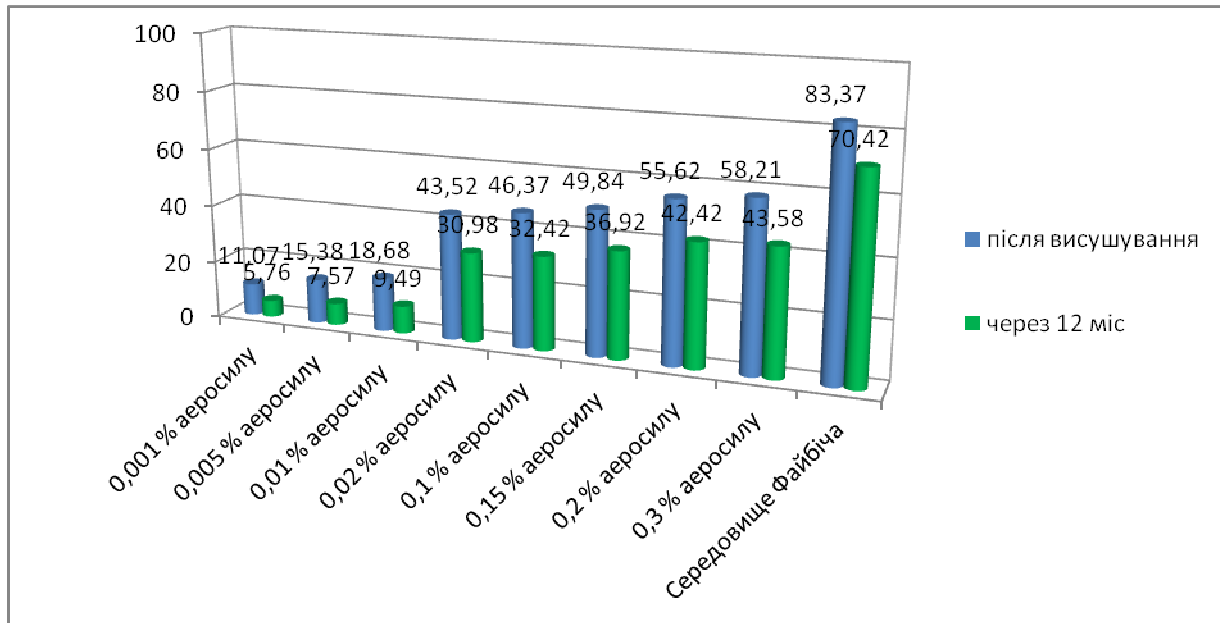


Рис. 3 Динаміка збереженості *Listeria ivanovii* 0811i після ліофілізації та після 12 місяців зберігання (захисне середовище – аеросил А-300)

Результати вивчення біологічних властивостей штаму через 12 місяців зберігання після висушування відображені в таблиці 2. Втрати в стабільності культуральних, морфологічних та гемолітичних властивостей не було відмічено. Проте, при дослідженні біохімічних властивостей дещо меншу активність порівняно із контролем відмічено при ферментації глюкози, лактози, мальтози та ксилози у наступних концентраціях аеросилу: 0,001 %, 0,005 % та 0,01 % (табл. 2).

Таким чином, в результаті проведених досліджень, найбільш ефективним кріопротектором для ліофільного висушування та збереження протягом 12 місяців виявилось середовище із додаванням 10% сахарози, 1% желатини та 0,1 % аеросилу А-300, яке достовірно підвищило збереженість на 3,68% після ліофільного висушування та 14,5 % через 12 місяців. Досить низькі результати отримані при використанні аеросилу А-300 як основного кріопротектору.

Таблиця 2

Біохімічні та гемолітичні властивості штаму *L.ivanovii* 0811i до та після сублімації через 12 міс. зберігання, (n=5)

Назва середовища		Біохімічні властивості						Гемолітичні властивості	
		Глюкоза	Лактоза	Мальтоза	Ксилоза	Сахароза	Рамноз	<i>R.equi</i>	<i>St.aureus</i>
аеросил А-300	0,001	++	++	+	+	+	-	+	-
	0,005	+++	++	++	+	+	-	+	-
	0,01	++	+++	++	+	+	-	+	-
	0,02	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,1	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,15	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,2	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,3	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-

Файбіча+аеросил А-300	0,001	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,005	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,01	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,02	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,1	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,15	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,2	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
	0,3	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-
Контроль (Файбіча)	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-	
До висушування	++++	++++	+++	+++	+	-	+	-	

Примітка: ступінь ферментативної активності визначали візуально за системою чотирьох плюсів, де «+» - відповідає розчепленню 25%, «++» - 50%, «+++» - 75%, «++++» - 100% середовища Гісса після 48 годин культивування штаму, «-» - відсутність ферментації. Гемолітична активність : «+» - позитивна реакція; «-» - негативна реакція.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1) Найбільш ефективним кріопротектором виявилось середовище із додаванням 10% сахарози, 1% желатини та 0,1 % аеросилу А-300, яке достовірно підвищило збереженість на 3,68% після ліофільного висушування та 14,5 % через 12 місяців зберігання.

2) Результати вивчення біологічних характеристик вказують, що культура через 12 місяців зберігання мала незначні відмінності в біохімічних властивостях, що полягали у послабленні ферментації глюкози, лактози, мальтози та ксилози при використанні аеросилу у концентраціях 0,001 %, 0,005 % та 0,01 %.

3) Перспективними вбачаються подальші дослідження із вивчення впливу наноматеріалів на збереженість мікробних популяцій інших представників роду *Listeria* під час ліофільного висушування та підбору оптимальних їх співвідношень.

Список використаної літератури:

1. Никитин Е. Е. Замораживание и высушивание биологических препаратов / Е. Е. Никитин, И. В. Звягин. – М. : – Колос, 1971. – 342 с.
2. Аэросил. Технические условия : ГОСТ 14922-77 / Б. А. Шихов, Е. Ф. Дубрава, Л. С. Желтобрюх. – Введ. 19.04.1977 взамен ГОСТ 14922-69. – М. : Изд-во стандартов, 1977. – 36 с. : табл. ; 21 см. – (Государственный стандарт Союза ССР).
3. Хаджиева З. Д. Технологические аспекты использования вспомогательных веществ в производстве лекарственных препаратов / З. Д. Хаджиева, А. В. Кузнецов, Д. В. Бирюкова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5. – С. 436–440.
4. Конструювання захисного середовища для ліофілізації бактерій роду *Listeria* / В. А. Ковтун, В. О. Ушкалов, Л. М. Виговська, О. В. Мачуський // Вет. біотехнологія : бюл. – 2013. – № 22. – С. 224–232.
5. Ковтун В. А. Порівняльне вивчення ізолятів роду *Listeria* з референтними штамами бельгійської колекції культур / В. А. Ковтун, В. О. Ушкалов, Л. М.

Виговська; Ін-т біології тварин, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок // Наук.-техн. бюл. – 2012. – Вип. 13, № 3-4. – С. 195-202.

6. Практикум по мікробіології: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук и др.; под ред. А. И. Нетрусова. – М. : Академия, 2005. – С. 100-110.

7. Мазур Т. Константні методи математичної обробки кількісних показників / Т. Мазур // Ветеринарна медицина України. – 1997. – № 9. – С. 35-37.

8. Справочник ветеринарного лаборанта / Ф. З. Андросов, И. Я. Беляев, Р. Т. Ключко и др.; под. ред. В. Я. Антонова. – М. – Колос, 1981. – С. 12-31.

9. Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод виявлення та підрахування *Listeria monocytogenes*. Частина 1. Метод виявлення : ДСТУ ISO 11290-1:2003 (ISO 11290-1:2003) – Увед. вперше ; чинний від 2003-10-02. – К. : Держспоживстандарт України, 2005. – IV, 18 с., включ. обкл. : табл. ; 29 см. – (Національний стандарт України).

ДИНАМИКА СОХРАННОСТИ *LISTERIA IVANOVII* ПОСЛЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АЭРОСИЛА А-300 / В. А. Ковтун, В. А. Ушкалов, А. В. Мачуский

*В статье приведены данные по использованию диоксида кремния (аэросила А-300) как одной из составных частей защитной среды для лиофильной сушки бактерий рода *Listeria*. Определена оптимальная концентрация аэросила, что дает высокую сохранность микробных клеток при лиофильном высушивании, а также хранение в течение 12 месяцев.*

Ключевые слова: лиофильное высушивание, аэросил, криопротектор, сохранность.

DYNAMICS OF CONSERVATION *LISTERIA IVANOVII* AFTER LYOPHILIZATION USING DIFFERENT CONCENTRATIONS OF AEROSIL A-300 / V.A. Kovtun, V.O. Ushkalov, O.V. Machys'kyu

*The article shows data on the use of Aerosil A 300 as an integral part of a protective environment for lyophilization bacteria of the genus *Listeria*. The optimum concentration of Aerosil, which gives a higher safety of microbial cells in the freeze-drying and storage for 12 months.*

Key words: freeze-drying, aerosil, cryoprotectant, preservation.

Рецензент – кандидат ветеринарних наук Л. М. Виговська