

И.В.Грачева, А.В.Осин

НИЗКОТЕМПЕРАТУРНАЯ КОНСЕРВАЦИЯ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация*

Целью исследования является оценка устойчивости холерных вибрионов к замораживанию и хранению в замороженном состоянии при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в присутствии криопротекторов. В работе представлены результаты хранения семи штаммов *V. cholerae* в течение трех лет в пяти защитных средах, содержащих в качестве криопротектора глицерин или лактозу (10, 20, 30 % водные растворы глицерина, мясопептонный бульон с 10 % глицерина, среда с 15 % лактозы и 3 % желатина). Показано, что гибель холерных вибрионов происходит при замораживании-размораживании образцов и их хранении. После трех лет консервации количество живых клеток уменьшилось во всех средах, но в разной степени. Наиболее высокая выживаемость холерных вибрионов после замораживания-размораживания и хранения в замороженном состоянии по используемому протоколу отмечена в лактозо-желатиновой среде. При использовании в качестве протективной среды водного раствора глицерина оптимальной является концентрация криопротектора 20 %. После трех лет хранения при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ все штаммы, независимо от состава защитной среды, сохранили основные диагностически значимые фенотипические признаки. Таким образом, холерные вибрионы могут быть сохранены без пересевов в течение трех лет (срок наблюдения) без изменения основных диагностических признаков во всех тестируемых защитных средах при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ключевые слова: холерные вибрионы, замораживание, низкотемпературная консервация, криопротекторы, жизнеспособность.

I.V.Gracheva, A.V.Osin

Low-Temperature Conservation of Collection Cholera Vibrio Strains*Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation*

Objective of the study is to evaluate cholera vibrio resistance to freezing and freeze preservation at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the presence of cryoprotectors. The study outlines the results of storage of seven different *V. cholerae* strains within three-years term in the protective media containing glycerin or lactose (10, 20, 30 % aquatic solutions of glycerin, meat-peptone broth with 10 % of glycerin, a medium with 15 % of lactose and 3 % of gelatin) as cryoprotectors. Demonstrated is the fact that cholera vibrio death occurs during freezing-refreezing procedure and preservation of samples. After three-year conservation the numbers of living cells decrease in all types of media, but to different extent. The highest survival rate in cholera vibrios after freezing-refreezing procedure and freeze preservation in accordance with applicable protocols is observed in lactose-gelatin medium. When using aquatic solution of glycerin as protective medium, optimum turns out to be the cryoprotector concentration equal to 20 %. After three-year preservation at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ all the strains, irrespective of the protective medium composition, retain their basic diagnostically significant phenotypic characteristics. Thus, cholera vibrios can be conserved free from subcultures within three-year term (period of observation) without alterations to their basic diagnostic properties in all tested protective media but at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Key words: cholera vibrios, freezing, low-temperature conservation, cryoprotectors, survivability.

Выбор метода хранения бактерий зависит от задач, стоящих перед исследователем, и от технических возможностей лаборатории. Традиционным способом сохранения холерных вибрионов в бактериологических лабораториях является посев в столбики 0,4 % питательного агара для культивирования с последующим хранением культуры под слоем минерального масла при комнатной температуре. Метод позволяет сохранить холерные вибрионы без пересевов в течение 1–1,5 лет.

Распространенным методом консервации бактерий является замораживание и хранение при температурах в диапазоне от -20 до $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$, стабильное поддержание которых обеспечивают современные лабораторные холодильники [2, 5, 7, 10]. Метод позволяет сохранять бактериальные клетки без пересевов до 10 лет [8]. Длительность хранения бактерий при субну-

левых температурах зависит от двух групп факторов. Первая связана с биологическими особенностями и физиологическим состоянием клеток, вторая – с условиями замораживания и хранения, главными из которых являются скорость охлаждения, температура и среда хранения.

Перед практическим использованием метода низкотемпературной консервации в своей коллекционной практике мы провели исследование, целью которого является изучение устойчивости холерных вибрионов к замораживанию в присутствии двух криопротекторов – глицерина (проникающий криопротектор) и лактозы (непроникающий криопротектор), динамики гибели при низкотемпературном хранении в защитных средах, стабильности основных диагностических фенотипических признаков.

Материалы и методы

В работе использованы 7 штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы: 569В классического биовара и 6 штаммов биовара Эльтор (МАК757, М-888, М-1286, М-1351, М-1425, М-1430). До проведения экспериментов штаммы хранились в лиофилизированном состоянии в течение 5–45 лет.

Для приготовления клеточных суспензий штаммы выращивали на скошенном во флаконах мясопептонном агаре рН 7,6 (75 мл) при 37 °С в течение 18–20 ч до стационарной фазы. Культуру смывали 2 мл защитной среды, взвесью с концентрацией $n \cdot 10^{10}$ разливали в 4 криопробирки (Greiner bio-one, Германия). После 30 мин экспозиции при комнатной температуре пробирки помещали в низкотемпературный холодильник на -70 °С (Haier DW-86L288, Япония). Одну пробирку использовали для изучения влияния состава среды на устойчивость холерных вибрионов к замораживанию-оттаиванию, остальные три – для определения количества живых клеток через 12, 24, 36 месяцев хранения. Взвесь размораживали при комнатной температуре в течение 15–20 мин до полного оттаивания содержимого пробирок.

В качестве защитных сред использовали 10, 20, 30 % водный раствор глицерина (AppLichem, Германия), мясопептонный бульон (МПБ) с 10 % глицерина, лактозо-желатиновую среду (среда ЛЖ, 15 % лактозы моногидрат, HiMedia Индия, 3 % желатина, AppliChem, Германия).

В качестве критерия устойчивости холерных вибрионов к замораживанию и хранению в замороженном состоянии использовали выраженный в lg показатель КОЕ/мл – количество клеток, способных к формированию колоний при высеве на питательную среду сразу после замораживания и через определенные периоды хранения, который определяли методом десятикратных разведений взвеси в 0,9 % растворе натрия хлорида. Статистическую обработку данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Диагностически значимые фенотипические признаки – серологические свойства, чувствительность к диагностическим холерным фагам, биохимическую активность – изучали в соответствии с методическими указаниями по лабораторной диагностике холеры [1]. Уровень продукции гемолизина оценивали методом посева изолированных колоний на пластины питательного агара с 3 % отмытых эритроцитов барана.

Результаты и обсуждение

Устойчивость микроорганизмов к замораживанию зависит от комплекса факторов, в том числе от биологических особенностей вида [3, 8, 9]. Устойчивость холерных вибрионов к замораживанию и хранению в замороженном состоянии при -70 °С оценивали на модели двух штаммов *V. cholerae* М-888 и М-1425. На первом этапе работы клетки замораживали в трех средах разного состава, со-

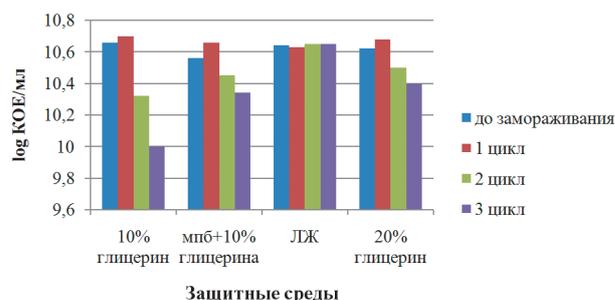


Рис. 1. Устойчивость *V. cholerae* М-888 к повторным циклам замораживания-оттаивания

держащих в качестве криопротектора глицерин или лактозу. 10 % водный раствор глицерина – наиболее распространенный состав для хранения бактериальных клеток при субнулевых температурах. Для многих патогенных бактерий криозащитные свойства ростовых питательных сред с глицерином выше, чем водных растворов криопротектора аналогичной концентрации [6]. Среда ЛЖ успешно используется в нашей лаборатории для высушивания холерных вибрионов из замороженного состояния.

После однократного замораживания клеток *V. cholerae* М-888 и М-1425 в защитных средах мы не отметили статистически достоверного снижения показателя КОЕ/мл по сравнению с контролем (до замораживания). При повторном замораживании наблюдалась гибель клеток в 10 % глицерине и МПБ с 10 % глицерина (рис. 1). Значение КОЕ/мл оставалось практически неизменным после трех циклов замораживания-оттаивания холерных вибрионов в среде ЛЖ ($P < 0,05$). В то же время однократное замораживание в дистиллированной воде привело к снижению концентрации клеток на 0,46–0,8 lg КОЕ/мл в зависимости от штамма, в 0,9 % растворе натрия хлорида – к гибели практически всей популяции.

Таким образом, все использованные протективные составы защищали клетки холерных вибрионов от летальных криоповреждений, основной причиной которых при низкой скорости охлаждения, использованной в работе, согласно наиболее признанной сегодня гипотезе «влияния растворов» является холодной осмотический шок [8]. Наиболее эффективной из использованных является среда ЛЖ, трехкратное замораживание клеток в которой не приводило к статистически достоверному снижению концентрации холерных вибрионов.

Считается, что хранение при температурах ниже -120 °С, например, в жидком азоте или парах жидкого азота, позволяет сохранять клетки в течение неограниченно долгого периода, хотя срок наблюдения ограничен несколькими десятилетиями. При температурах ниже криогенных полностью прекращается движение молекул и останавливаются все химические реакции. Гибель клеток происходит только при их замораживании и размораживании [3, 8]. При субнулевых температурах выше криогенных инактивация клеток может происходить не только на этапах замораживания и оттаивания, но и при хранении, а

уровень снижения жизнеспособности зависит от температуры хранения [5, 7].

Количество живых клеток холерных вибрионов в пробах определяли через 1 день, 12, 24, 36 месяцев хранения, используя каждый раз новую криопробирку, поэтому показатель КОЕ/мл характеризовал выживаемость холерных вибрионов после одного цикла замораживания-оттаивания. В течение трех лет хранения количество живых клеток снизилось во всех трех средах, но в разной степени (рис. 2, 3). Наиболее интенсивная гибель холерных вибрионов зарегистрирована при хранении в 10 % водном растворе глицерина. Через год концентрация клеток *V. cholerae* М-888 уменьшилась на 1 lg КОЕ/мл, через два года – на 1,8 lg КОЕ/мл, через три – на 2,66 lg КОЕ/мл. За три года хранения количество живых клеток *V. cholerae* М-888 в МПБ с глицерином и среде ЛЖ снизилось на 0,71 и 0,52 lg КОЕ/мл соответственно. Результаты тестирования жизнеспособности *V. cholerae* М-1425 при хранении в защитных средах были аналогичными (рис. 3). Концентрация живых клеток после трех лет хранения в 10 % глицерине, МПБ с 10 % глицерина, среде ЛЖ уменьшился на 2,58, 1,15, 0,46 lg КОЕ/мл соответственно.

После трех лет хранения в среде с наиболее низкими защитными свойствами – 10 % глицерине количество живых клеток оставалось достаточным для восстановления культур. Показатель КОЕ/мл для *V. cholerae* М-888 и М-1425 в абсолютном значении составил $1,1 \cdot 10^8$ и $1,2 \cdot 10^8$ КОЕ/мл соответственно после одного цикла замораживания-оттаивания и $1,8 \cdot 10^4$ и $3,5 \cdot 10^4$ КОЕ/мл после 15 циклов при начальной концентрации $4,1 \cdot 10^{10}$ и $3,2 \cdot 10^{10}$ КОЕ/мл.

Несмотря на то, что сразу после консервации в среде ЛЖ клетки холерных вибрионов устойчивы к повторным циклам замораживания-оттаивания, и трехкратное замораживание не приводит к статистически достоверному снижению концентрации, после 3 лет хранения количество живых клеток в пробах после одного и 15 циклов замораживания существенно отличалось. Значение КОЕ/мл для *V. cholerae* М-888 после 1 и 15 циклов замораживания-оттаивания – $1,3 \cdot 10^{10}$ и $1,1 \cdot 10^9$. Аналогичные показатели для *V. cholerae* М-1425 – $1,3 \cdot 10^{10}$ и $8,4 \cdot 10^8$. Результаты показывают, что повторное замораживание повышает чувствительность клеток к криоповреждающим факторам.

Жизнеспособность клеток после замораживания

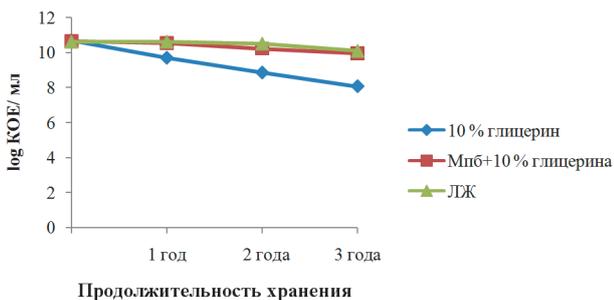


Рис. 2. Динамика гибели *V. cholerae* М-888 в условиях хранения при -70 °C

и хранения зависит не только от вида криопротектора, но и от его концентрации [6, 7]. Увеличение концентрации криопротектора изменяет осмотическое давление среды, ее вязкость при охлаждении, что влияет на степень дегидратации клетки до замораживания, температуру эвтектики или стеклоперехода, количество образующегося льда, его структуру.

Наиболее низкие защитные свойства при хранении холерных вибрионов показал 10 % глицерин. Мы сравнили динамику гибели клеток *V. cholerae* М-888 в защитных средах с концентрацией глицерина 10, 20, 30 %. Увеличение концентрации глицерина до 20 % привело к повышению выживаемости холерных вибрионов при хранении в замороженном состоянии и устойчивости клеток к повторным циклам замораживания-оттаивания (рис. 1). Количество живых клеток после двух лет хранения в 20 % растворе глицерина снизилось на 0,4 lg КОЕ/мл. Аналогичный показатель для 10 % глицерина – 1,8 lg КОЕ/мл. Выживаемость клеток в 20 % глицерине через 2 года хранения была ниже, чем в среде ЛЖ, но сравнима с МПБ с 10 % глицерина (снижение на 0,11 и 0,5 lg КОЕ/мл соответственно). Увеличение концентрации глицерина до 30 % не приводило к дальнейшему повышению выживаемости при хранении. Таким образом, оптимальной для консервации холерных вибрионов по использованному протоколу является концентрация глицерина в среде 20 %.

После хранения при субнулевых температурах у первых генераций культур отмечается удлинение лаг-фазы, что связывают с протеканием в клетках репаративных процессов [3]. В литературе описана повышенная продукция клетками после размораживания антибиотиков, ферментов [3].

Мы изучили основные диагностически значимые свойства холерных вибрионов через день после замораживания и после 3 лет хранения в замороженном состоянии. Популяции всех 7 штаммов, заложенных на хранение, были морфологически однородны, состояли из колоний только исходного фенотипа, в отличие от культур, хранившихся в течение года в 0,4 % агаре. Все штаммы, независимо от состава защитной среды, сохранили характерную для них биохимическую активность, чувствительность к диагностическим фагам, серологические свойства. У одного штамма выявлено изменение гемолитической активности после первого замораживания независи-

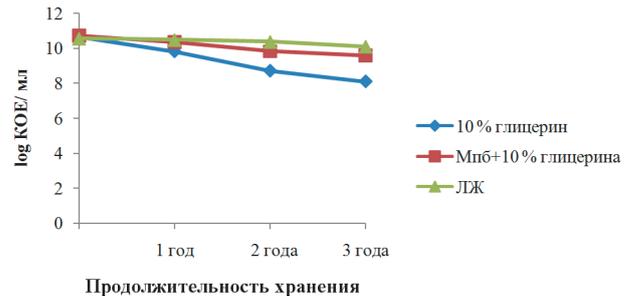


Рис. 3. Динамика гибели *V. cholerae* М-1425 в условиях хранения при -70 °C

мо от состава использованной защитной среды и времени хранения.

Холерные вибрионы Эльтор в отличие от представителей классического биовара лизируют эритроциты барана при росте на плотной питательной среде с кровью, что является одним из тестов дифференциации двух биоваров. Отсутствие гемолитической активности у представителей классического биовара связано с протяженной делецией в гене *hlyA* [4]. Из заложенных на хранение штаммов вибрионов Эльтор 4 лизировали эритроциты (зоны лизиса 0,15–0,4 см в зависимости от штамма), один штамм (МАК757) не лизировал эритроциты. При росте *V. cholerae* М-888 на агаре лизис эритроцитов наблюдается непосредственно под колонией.

После замораживания и трех лет хранения все штаммы, за исключением *V. cholerae* М-888, сохранили исходную гемолитическую активность, их популяции однородны по уровню регистрируемой продукции гемолизина. В популяции *V. cholerae* М-888 после первого замораживания появляются клоны с зоной гемолиза 0,2–0,25 см, что указывает на увеличение секреции или продукции гемолизина. Мы предполагаем, что данный факт может быть связан с нарушением избирательной проницаемости клеточных мембран после размораживания вследствие изменения фазового состояния мембранных липидов [11]. Повышенная проницаемость мембран некоторых клеток может быть причиной повышенной секреции продуцируемого клеткой гемолизина. Стабильность данного признака у штамма *V. cholerae* МАК757, вероятно, связана с генетическими изменениями, поэтому нарушение проницаемости мембран не влияет на результаты теста.

Результаты нашего исследования показывают, что холерные вибрионы устойчивы к замораживанию и хранению в замороженном состоянии при -70°C в присутствии криопротекторов. Они могут быть сохранены без дополнительных пересевов в течение трех лет (срок наблюдения) без изменения основных диагностических признаков во всех тестируемых защитных средах. Снижение концентрации живых клеток в пробах происходит не только на этапе замораживания-размораживания клеточных суспензий, но и при хранении. Наиболее высокая выживаемость холерных вибрионов после замораживания-размораживания и хранения в замороженном состоянии отмечена в лактозо-желатиновой среде. При использовании в качестве протективной среды водного раствора глицерина оптимальной является концентрация криопротектора 20 %.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии

Роспотребнадзора; 2007. 87 с.

2. Каменских Т.Н., Калашникова Е.А., Ившина И.Б. Особенности криоконсервации алканотрофных актинобактерий рода *Rhodococcus*. Вестник Пермского университета. 2010; 1(1):15–20.

3. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Бальбердина Л.М., Степанюк Л.В., Павленко Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов. Микробиология. 2008; 77(5):696–700.

4. Alm R.A., Manning P.A. Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup O1. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(4):823–4.

5. Aulet de Saab O.C., de Castillo M.C., de Ruiz Holgado A.P., de Nader O.M. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruze.* 2001; 96(4):583–6.

6. Cabri Guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying (cited 14.04.14). Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap3.html>.

7. Gorman R., Adley C.C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 38(4):306–10.

8. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005; 29(5):897–910.

9. Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(1):268–72.

10. Michel C., Garcia C. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet. Res.* 2003; 34:127–32.

11. Wolfe J., Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology.* 1999; 39(2):103–29.

References

1. [Laboratory diagnostics of cholera: Methodological recommendations]. M.: 2007. 87 p.

2. Kamenskikh T.N., Kalashnikova E.A., Ivshina I.B. [Peculiarities of cryo-conservation of alkane-trophic actinobacillus, genus *Rhodococcus*]. *Bulletin of the Perm University.* 2010; 1(1):15–20.

3. Tsutsaeva A.A., Anan'ina A.E., Balyberdina L.M., Stepanyuk L.V., Pavlenko N.V. [Experience in long-term conservation of commercial microorganism strains]. *Mikrobiologiya.* 2008; 77(5):696–700.

4. Alm R.A., Manning P.A. Biotype-specific probe for *Vibrio cholerae* serogroup O1. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(4):823–4.

5. Aulet de Saab O.C., de Castillo M.C., de Ruiz Holgado A.P., de Nader O.M. A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruze.* 2001; 96(4):583–6.

6. Cabri Guidelines. Laboratory procedures of microorganisms. Protective suspension media for freezing or (freeze)-drying (cited 14.04.14). Available from: <http://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap3.html>.

7. Gorman R., Adley C.C. An evaluation of five preservation techniques and conventional freezing temperatures of -20°C and -85°C for long-term preservation of *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2004; 38(4):306–10.

8. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005; 29(5):897–910.

9. Dumont F., Marechal P.A., Gervais P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(1):268–72.

10. Michel C., Garcia C. Virulence stability in *Flavobacterium psychrophilum* after storage and preservation according to different procedures. *Vet. Res.* 2003; 34:127–32.

11. Wolfe J., Bryant G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology.* 1999; 39(2):103–29.

Authors:

Gracheva I.V., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Грачева И.В., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 12.05.14.