

УДК 636.3[616:98+579.834]

**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ПАТОГЕННИХ ЛЕПТОСПІР
LEPTOSPIRA INTERROGANS**

В. В. КУЛИКОВА, кандидат ветеринарних наук,
В. В. УХОВСЬКИЙ, кандидат ветеринарних наук

Інститут ветеринарної медицини НААН

E-mail: vl_sight@mail.ru

В статті наведено дані дослідження щодо кріоконсервування штамів лептоспір малого діагностичного ряду різними кріопротекторами. Підібрано оптимальні концентрації речовин для кріоконсервування.

Ключові слова: кріоконсервування, штам, серогрупа, *Leptospira*, рідкий азот

Кріоконсервування – сукупність методів зберігання біологічних об'єктів за низьких температур. Теоретична основа кріоконсервування – кріобіологія: розділ біології, який вивчає дію на живі системи низьких і наднизьких температур – від 0 °С до близьких абсолютного нуля. Основні завдання кріобіології – вивчення життя за умов холоду, з'ясування причин стійкості організмів до переохолодження і замерзання, дослідження пошкоджуючої дії низьких температур [1].

Під час заморожування мікроорганізмів більшість води перетворюється на лід і клітинний метаболізм припиняється. Тому з точки зору теоретичної кріобіології процес кріоконсервування розглядають як спосіб введення клітини у стан глибокого холододового анабіозу з поверненням у початковий стан [2].

Метод кріоконсервування має ряд переваг, оскільки збережені таким чином мікроорганізми можуть використовуватися у технологічному процесі відразу ж після відігрівання, що дозволяє скоротити адаптаційний період у бактеріальних культур, в той час як використання ліофільно висушених об'єктів вимагає тривалої процедури репарації.

Стійкість мікроорганізмів до заморожування залежить від декількох факторів, таких як рід та вид мікроорганізму, стадія їх розвитку, температура,

швидкість заморожування, середовище для заморожування і час зберігання. Дія низьких температур на мікроорганізми характеризується внутрішньо- і позаклітинними змінами. Максимальної пошкоджуючої дії надає внутрішньоклітинне утворення льоду, водночас відбувається порушення плазматичних мембран і клітинних оболонок. Крім того, утворення льоду призводить до збільшення концентрації внутрішньо- і позаклітинних розчинів, що веде до денатурації білків і порушення бар'єрів проникності [4].

За даними Ю. А. Малахова та ін. відомо виживання лептоспир за мінусових температур: вони погано переносять низькі режими заморожування за температури мінус 10 – 12 °С, виживають майже більше чотирьох місяців за температури мінус 18 – 20 °С, ще довше виживають за температури мінус 30 °С, роками можуть залишатися життєздатними за мінус 70 °С та багато років – за температури рідкого азоту [3].

В дослідях зарубіжних авторів із 11 сероварів лептоспир, що зберігали за температури рідкого азоту, всі, крім серогрупи Sejroe, зберегли рухливість, здатність до росту, аглютинабельність, серогрупа Pomona залишалася вірулентною для золотистих хом'ячків. Дослідники вважають, що зберігання лептоспир у рідкому азоті найбільш повно забезпечує зберігання їх біологічних властивостей [3].

Важливо відмітити, що у процесі тривалого культивування ті чи інші властивості клітин змінюються, останні зазнають процесу «старіння», тому для підтримання сталості морфологічних характеристик культур лептоспир застосовують заморожування, а саме зберігання у рідкому азоті значної кількості клітин одного пасажу з подальшим відновленням культури із замороженого стану.

Подібні дані про зберігання культур клітин лептоспир у рідкому азоті представлені також у дослідженнях інших вчених, за даними яких вихідна культура лептоспир містила $10^{7,8}$ лептоспир у 1см^3 , мала LD_{50} для хом'ячків $10^{-7,3}$ та мінімальну дозу $10^{-7,5}$. Та ж сама культура через два роки зберігання у рідкому азоті мала відповідно 10^6 , $10^{-6,25}$ та 10^{-6} . За два роки зберігання у

рідкому азоті кількість культур клітин лептоспир скоротилося з $10^{-7,5}$ до $10^{-6,35}$.

Мета досліджень – визначення дози різних кріопротекторів за зберігання лептоспир у рідкому азоті.

Матеріали і методика досліджень. Дослідження проводились із використанням антигенів вісьмох серогруп патогенних лептоспир, а саме: Sejroe, Hebdomadis, Tarassovi, Pomona, Grippytyphosa, Canicola, Icterohaemorrhagiae, Australis; гліцерин у концентраціях (1 %; 2,5 %; 5 %; 10 %; 20 %); диметилсульфоксид (ДМСО) у концентрації (1 %; 2,5 %; 5 %; 10 %; 20 %); середовище Кортгофа (рН 7,3) з додаванням 5 % кролячої сироватки крові. Дослідження проводились на базі лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів ІВМ НААН (м. Київ).

Результати досліджень. Під час проведення досліджень використовували вісім діагностичних штамів лептоспир (таблиця 1).

1. Накопичення вісьмох серогруп патогенних лептоспир

Серогрупа	Серовар	Штам	Накопичення, млн. кл./ см ³
Sejroe	polonica	493 Poland	80
Hebdomadis	kabura	Kabura	80
Tarassovi	tarassovi	Perepelicyuni	80
Pomona	pomona	Pomona	80
Grippytyphosa	grippytyphosa	Moskva V	80
Canicola	canicola	Hond Utrecht IV	80
Icterohaemorrhagiae	copenhageni	M 20	80
Australis	Bratislava	Yez bratislava	80

Розведення кріоконсервуючих речовин проводили наступним чином:

1) Розчин гліцерину:

- 1 % ($0,1 \text{ см}^3$ гліцерину + 10 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 2,5 % ($0,115 \text{ см}^3$ гліцерину + 5 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 5 % ($0,25 \text{ см}^3$ гліцерину + 5 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 10 % ($0,5 \text{ см}^3$ гліцерину + $4,5 \text{ см}^3$ культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 20 % ($1,0 \text{ см}^3$ гліцерину + 4 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);

2) ДМСО:

- 1 % ($0,1 \text{ см}^3$ ДМСО + 10 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 2,5 % ($0,25 \text{ см}^3$ ДМСО + 10 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 5 % ($0,25 \text{ см}^3$ ДМСО + 5 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 10 % ($0,5 \text{ см}^3$ ДМСО + $4,5 \text{ см}^3$ культури лептоспир кожного із 8-ми штамів);
- 20 % ($1,0 \text{ см}^3$ ДМСО + 4 см^3 культури лептоспир кожного із 8-ми штамів).

Отримані розведення кріоконсервуючих речовин вносили в ампули по 2 см^3 , з кожного розведення використовували дві ампули. Спочатку охолодження проводили у холодильнику за температури $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ з експозицією 60 хв.; далі заморожували у морозильній камері за температури мінус $20 \text{ }^\circ\text{C}$ з експозицією 60 хв.; охолоджували у парах рідкого азоту протягом 20 хв.; на останньому етапі заморожували у сосуді Дюара на весь термін досліду – 1 календарний рік.

Перед посівом на поживне середовище розморожували ампули протягом 20 хв. за кімнатної температури. Посіви проводили наступним чином: до 1,0 см³ розведеної культури додавали 9 см³ середовища Кортгофа, яке містить 5 % кролячої сироватки крові. Через 10 діб нами були одержані наступні результати (табл. 2, 3).

2. Результати накопичення вісьмох серогруп патогенних лептоспир за кріоконсервування розчином гліцерину

Серогрупа лептоспир	Розчин гліцерину, %				
	1	2,5	5	10	20
Sejroe	-	-	-	60	-
Hebdomadis	-	-	-	50	-
Tarassovi	Од.	-	-	60	-
Pomona	Од.	-	-	50	-
Grippotyphosa	-	10	10	60	Од.
Canicola	-	-	-	60	-
Icterohaemorrhagiae	Од.	-	-	60	-
Australis	-	-	-	50	-

Примітка: «-» – відсутність лептоспир у полі зору мікроскопа;

Од. – одиничні лептоспири у полі зору;

10 – 60 – показник накопичення лептоспир, млн. кл./ см³.

Результати кріоконсервування культур вісьмох серогруп патогенних лептоспир гліцерином показало, що найбільш придатною концентрацією є 10 % – в. За інших концентрацій гліцерину (1; 2,5; 5; 20 %) накопичення культур лептоспир було значно меншим або взагалі відсутнє. Серед деяких серогруп спостерігали одиничні лептоспири у темному полі мікроскопа.

3. Результати накопичення вісьмох серогруп патогенних лептоспир за кріоконсервування ДМСО

Серогрупа лептоспир	ДМСО, %				
	1	2,5	5	10	20
Sejroe	10	Од.	40	10	-
Hebdomadis	10	-	40	10	-
Tarassovi	20	10	60	20	-
Pomona	10	10	50	30	-
Grippotyphosa	10	5	40	20	-
Canicola	10	10	40	Од.	-
Icterohaemorrhagiae	-	-	50	10	-
Australis	10	-	50	10	-

Примітка: «-» – відсутність лептоспир у полі зору мікроскопа;
 Од. – одиничні лептоспир у полі зору;
 10 – 60 – показник накопичення лептоспир, млн. кл./см³.

Результати кріоконсервування культур вісьмох серогруп патогенних лептоспир із використанням ДМСО показало, що найбільш придатною концентрацією є 5 %-на. За концентрації 20 % ДМСО росту лептоспир не спостерігали. За використання концентрацій 1; 2,5; 10 % спостерігали накопичення лептоспир від 10 – 20 млн. кл./см³, що вказує на низьку збереженість культури лептоспир за кріоконсервування ДМСО у вищезгаданих концентраціях.

Висновки

1. З метою довготривалого кріоконсервування лептоспир в якості кріопротекторів необхідно використовувати розчини ДМСО та гліцерину. Найбільш придатною концентрацією для кріоконсервування культур лептоспир малого ряду розчином гліцерину є 10 %-на, оскільки найбільш придатною концентрацією ДМСО для кріоконсервування культур лептоспир малого ряду є 5% – на;

2. Запропонований метод довготривалого консервування лептоспир, який є актуальним для роботи з музейними штамами лептоспир.

Перспективи подальших досліджень. Результати, одержані у досліді, будуть використані для криоконсервування культур лептоспир, які зберігаються у лабораторії лептоспірозу з музеєм мікроорганізмів ІВМ НААН.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Актуальные проблемы криобиологии / под ред. Н. С. Пушкаря, А. М. Белоуса. – Киев: Наук. думка, 1981. – 608 с.
2. Криобиология и биотехнология / А. А. Цуцаева и др.; под общ. ред. А. А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1987. – 165 с.
3. Малахов Ю. А. / Лептоспироз животных // Ю. А. Малахов, А. Н. Панин, Г. Л. Соболева. – Ярославль: ДИА-пресс, 2000. – 584 с.
4. Рахуба Д. В. Криоконсервация пробиотических микроорганизмов: научные основы практического использования / Д. В. Рахуба, Г. И. Новик // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. работ / Институт микробиологии НАН Беларуси. – Вып. 1. – Минск: И. П. Логинов, 2007. – С. 268–276.

КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЕ ПАТОГЕННЫХ ЛЕПТОСПИР – LEPTOSPIRA INTERROGANS

В. В. Куликова, В. В. Уховский

В статье поданы данные исследования по криоконсервированию культуры лептоспир маленького диагностического ряда разными криопротекторами. Подобраны оптимальные концентрации веществ для криоконсервирования.

Ключевые слова: криоконсервирование, штам, серогруппа, *Leptospira*, жидкий азот

CRYOPRESERVATION OF PATHOGENIC LEPTOSPIRES – LEPTOSPIRA INTERROGANS

V. V. Kulykova, V. V. Ukhovskyi

The article submitted data from a study of cryopreserved cultures of Leptospira small number of diagnostic different cryoprotectants. Optimal concentration for cryopreservation agents were chosen.

Keywords: *cryopreservation, strain, serogroup, Leptospira, liquid nitrogen*