

Методы поддержания микробных культур. Часть I. Криоконсервация

© 2009. В.Ю.Охупкина¹, д.м.н., старший научный сотрудник;
Б.А.Шабалин², д.м.н., ведущий научный сотрудник,

¹Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ,
²Институт физиологии Коми НЦ УрО РАН,
e-mail: veronika@ptlan.com

В статье сделана попытка обобщить имеющиеся данные литературы по методам криоконсервации, которые могут быть использованы для поддержания и хранения микроорганизмов в музейных коллекциях, представить механизмы их воздействия на микробные клетки, а также оценить их положительные и отрицательные стороны с учётом наиболее вероятных условий и областей их применения.

The article presents the attempt to summarize the literature data on cryoconservation methods that can be used for keeping microorganisms in museums' collections. It also presents the mechanisms of their influence on microbe cells and estimates their positive and negative features taking into account the possible conditions and spheres of their applicability.

Ключевые слова: криоконсервация, методы хранения, анабиоз, механизмы повреждения, криопротекторы

Создание и поддержание коллекций микробных культур является неотъемлемой частью функционирования лабораторий, занимающихся проведением экологических исследований. Изучение выделяемых из природной среды изолятов не представляется возможным без наличия типовых референтных штаммов микробов. Использование микроорганизмов в качестве тест-объектов в биомониторинге окружающей среды требует применения стабильных по свойствам эталонов культур, обеспечивающих стандартность и достоверность результатов.

Основной задачей коллекционной работы является поддержание исходных характеристик микробных культур, обуславливающих возможность их целевого использования.

Анализ данных литературы [1 – 6] показывает, что, несмотря на широкое разнообразие приёмов и методов сохранения микробных культур, имеется возможность выбрать круг основных требований, обязательных к применению во всех случаях лабораторных исследований и в практике промышленной микробиологии.

– Метод должен обеспечивать высокий уровень выживаемости микробов, как в процессе подготовительных работ, так и во время хранения в течение возможно длительного периода времени.

– Осуществление метода хранения микробных культур не должно приводить к запуску механизмов селекции в клеточной популяции во избежание формирования и накопления клона клеток с повышенной резистентностью к неблагоприятным внешним воздействиям (замораживание, высушивание). Должна обеспечиваться сохранность всего естественного разнообразия микробной популяции.

– В процессе хранения должна поддерживаться стабильность биологических свойств микробов, в том числе должна быть исключена возможность генетических изменений в клетках.

– Должна обеспечиваться чистота сохраняемой культуры, невозможность её контаминации посторонней микрофлорой в процессе хранения, а также при проведении некоторых обязательных манипуляций, например, при пересевах микробов на питательных средах.

– На выбор метода хранения той или иной микробной культуры в значительной мере влияет её уникальность, значимость для коллекции. Для хранения редких, ценных культур применяются методы, сводящие к минимуму риск их утраты. Дополнительным страхующим моментом служит

одновременное использование нескольких различных методов.

– Выбор методов хранения должен осуществляться исходя из имеющихся условий: объёма самой коллекции, наличия средств и материалов, обеспеченности оборудованием, квалификации персонала и тому подобного.

– Применяющиеся методы хранения должны одновременно обеспечивать возможность транспортировки сохраняемых культур, не требуя дополнительных условий при этом.

С учётом вышесказанного следует отметить, что единого универсального метода хранения микробных культур, отвечающего всем предъявляемым требованиям, нет. В каждом отдельном случае должен быть индивидуальный подход. Методы хранения микробных культур широко варьируют для разных видов микроорганизмов в силу большого разнообразия присущих им биологических свойств. Даже для разных штаммов одного вида не всегда приемлем один и тот же метод. В то же время большинство исследователей [1 – 3, 7, 8] в качестве основных выделяют следующие методы сохранения микробных культур:

- субкультивирование на питательных средах;
- замораживание;
- высушивание.

Кроме того, в литературе [9] имеются также указания на возможность подразделения всех методов хранения микробов на:

- методы непродолжительного хранения, к которым относят субкультивирование, хранение культур под минеральным маслом, обычное высушивание и обычное замораживание микробов при температуре от 0° до минус 20 °С;
- методы продолжительного хранения, к которым относят глубокое замораживание (ультразамораживание) и сублимационное высушивание микроорганизмов.

Выбор того или иного метода в конечном счёте определяется биологическими особенностями микроорганизма, целями и задачами работ и практическими возможностями лабораторий.

Анабиоз как физиологическая основа методов длительного хранения микробных культур

Явление так называемой скрытой жизни, когда процессы жизнедеятельности организ-

ма настолько снижены, что не представляется возможным доказать их наличие современными методами исследования, довольно широко распространено в природе. Впервые этот феномен при высушении микроскопических животных был открыт в начале XVIII века Антоном Левенгуком. В последующем данным вопросом занимались многие учёные, пытались доказать или опровергнуть возможность существования этого интересного явления. Анабиоз при замерзании живых организмов был открыт и изучен в конце XIX и начале XX века.

Сам термин «анабиоз» ввёл в 1873 году Прейер, он же предложил называть состояние при высушении живых организмов со способностью к последующему оживанию анабиотическим [10].

Уже в конце XIX века сложились две основные точки зрения на сущность анабиоза. Первая рассматривала его как явление «минимальной жизни» с глубокой степенью торможения обменных процессов. Другая – считала возможным существование жизни вне связи с процессом обмена веществ в некоем устойчивом состоянии, не допускающем смерти.

Анализируя данные литературы по этому вопросу [11, 12], более правомерной надо полагать первую точку зрения. Вероятнее всего жизненные процессы тормозятся до такой степени, что не улавливаются современными методами исследования, но обеспечивают минимальный жизненный уровень и способствуют полному восстановлению жизнеспособности организма. В пользу этого свидетельствуют следующие факты: высушенные организмы не могут оживать при беспредельно длительном хранении, длительность процесса оживания прямо пропорциональна времени хранения, по мере хранения идёт постепенное отмирание объектов, невозможна абсолютная дегидратация клетки, в противном случае неминуемо наступает денатурация белка и смерть [10, 12].

И всё же некоторые исследователи и в настоящее время склонны считать анабиоз полной приостановкой жизненных процессов. Например, А.М. Голдовский выделяет три возможных состояния существования живых организмов [13].

- Состояние жизни (биоз) характеризуется двусторонним обменом веществ, сочетанием ассимиляции и диссимиляции, единством структуры и функции. В пределах его возможно временное

снижение интенсивности жизни (гипобиоз), что присуще спячке, оцепенению.

– Промежуточное состояние между жизнью и анабиозом (мезобиоз) характеризуется односторонним обменом веществ, проявлением только диссимиляции.

– Анабиоз характеризуется полным отсутствием обмена веществ и незначительными процессами разрушения, отличными от диссимиляции.

Анабиоз и мезобиоз А.М. Голдовский относит к нежизненным состояниям, поскольку при них отсутствует двусторонний обмен веществ – главный признак жизни, роста, развития.

Из приведённых сведений видно, что до сих пор вопрос о состоянии жизненных функций у высушенных и замороженных микробов остаётся открытым. Как бы то ни было, анабиоз является одной из защитно-приспособительных природных реакций по отношению к неблагоприятным внешним воздействиям, классическим примером чего служит спорообразование у некоторых видов микроорганизмов. Неполное раскрытие сущности анабиоза не мешает, однако, широко применять его в практической деятельности.

Все эффективные методы хранения микроорганизмов основаны на искусственном переводе их в анабиотическое состояние, чего можно достичь, изменив экспериментальным путём условия окружающей среды. Известно, что основным фактором, обеспечивающим протекание биохимических процессов в клетке, является вода. Она составляет от 75 до 85% от массы микробной клетки и служит дисперсионной средой для коллоидов, растворителем для кристаллоидов и сама является компонентом многообразных реакций в клетке. Потеря влаги ведёт к замедлению жизнедеятельности микробной клетки. Устранения действия воды можно добиться либо её удалением (высушивание), либо переводом в неактивное состояние (замораживание).

Использование низких температур для консервирования различных продуктов биологического происхождения известно давно. Однако большая часть исследований по этому вопросу проводилась во второй половине XIX века. В этот же период были достигнуты огромные успехи в области физических наук, касающиеся создания низких температур и приборов для их регистрации.

В настоящее время в различных областях деятельности человека широко применяется

искусственный холод, который позволяет получить низкие температуры, недостижимые с помощью естественных охлаждающих агентов.

Основные механизмы повреждения клеток в процессе замораживания-оттаивания

Изменения, наступающие в биологических объектах под влиянием низких температур, можно разделить на:

- физиологические;
- физико-химические;
- механические [11].

Из явлений физиологического порядка следует отметить «холодовой» (температурный) шок [9, 11, 14]. Термин «температурный шок» был введён Миловановым в 1934 году [9]. Этот феномен заключается в повреждении и гибели клеток при внезапном охлаждении от температуры, при которой происходил рост клеток или они суспендировались, до точки замерзания, но ещё без кристаллизации. Его действию более подвержены клетки в логарифмической фазе роста. Например, при быстром охлаждении молодой культуры *Escherichia coli* от температуры 37 °С до 0 °С гибнет 95% особей. Температурного шока можно избежать при постепенном охлаждении в том же диапазоне температур, что способствует так называемой холодной адаптации. На чувствительность клеток к шоку влияет состав среды, в которой находятся клетки, концентрация клеток, конечная температура, скорость охлаждения.

В основе шокового феномена лежит нарушение барьерных функций клеточных мембран и гибель клетки [14, 15]. Повреждение мембран связывают с изменениями фазового состояния входящих в их состав липидов [5, 6, 16]. При резком охлаждении они переходят из жидкокристаллического состояния в кристаллическое, мембрана становится менее пластичной и легко повреждается при малейших дополнительных воздействиях, одновременно повышается её проницаемость для растворённых веществ, и они теряются из клетки. Это предположение подтверждают исследования ауксотрофов *E. coli*, характеризующихся определённым набором жирных кислот [14]. Различный жирнокислотный состав липидов мембран обуславливает различную температуру перехода липидов в кристаллическое состояние, а следовательно, и температуру, при которой происходит нару-

шение проницаемости мембран для ионов при холодовом шоке. Таким образом, при замораживании суспензий клеток ещё до начала льдообразования мембрана уже находится в нестабильном состоянии.

Физико-химические и структурные изменения в клетке определяются в основном вне- и внутриклеточной кристаллизацией воды и эвтектической концентрацией солей. Оба указанных процесса тесно взаимосвязаны [11, 14].

При замораживании любого биологического объекта отмечается эвтектическое разделение раствора. Сначала кристаллизуется чистая вода, а соли концентрируются в незамерзшей части до тех пор, пока не будет достигнута максимальная концентрация. Предел максимальной концентрации солей, вслед за которым наступает полное затверждение раствора при низкой температуре, называется эвтектической точкой (для NaCl она составляет минус 21,5 °С при концентрации 22,4%). Ниже указанной температуры эвтектическая смесь будет образовывать кристаллическое вещество. В живых объектах правильнее говорить об эвтектической зоне с диапазоном около 10 °С, что обусловлено содержанием в клетке разнообразных солей. При нагревании замороженных растворов наблюдается обратная картина. Если в раствор добавить глицерин, то перехода через эвтектическую точку не происходит, а образуется стеклообразная гелевидная масса, содержащая от 60 до 70% глицерина. Образование концентрированного раствора солей в клетке является одним из важных повреждающих факторов, для уменьшения влияния которого используют различные защитные среды.

Согласно современным представлениям основное повреждающее действие при низкотемпературном воздействии на биологические объекты связано с изменением агрегатного состояния воды (льдообразованием) [9, 14, 15, 17, 18]. При построении кривой зависимости выживания микробов от скорости замораживания на ней имеется максимум, соответствующий оптимальной скорости. При скорости замораживания ниже этой величины отмечается внеклеточное льдообразование, клетки при этом уменьшаются в объёме. Если скорость замораживания больше оптимальной, то лёд образуется внутри и снаружи клеток. В цикле работ Мазура [19] показано, что повреждающий фактор замораживания связан с образованием льда в клетке, причём его выраженность определяется количеством

и размерами кристаллов льда. Важно отметить, что размеры кристаллов льда зависят не только от скорости замораживания, но и оттаивания из-за возможности рекристаллизации [16]. Принято считать, что чем выше скорость замораживания, тем меньше размеры образующихся кристаллов льда. При сверхбыстром охлаждении до значительно низких температур от минус 150 °С до минус 196 °С протоплазма клетки превращается в стекловидное вещество, минуя стадию кристаллизации (витрификация) [9, 16].

Большинство авторов [9, 12, 14, 15, 18] считает, что повреждающее действие внутриклеточного льда обусловлено его механическим воздействием на мембранные структуры клеток. Высказано предположение о повреждении мембран большими потоками воды через них, которые возникают при замораживании-оттаивании вследствие градиента химического потенциала воды, а также за счёт нарушения проницаемости мембран при сжатии клетки и проникновении внутрь веществ, сконцентрированных снаружи [15]. При последующем оттаивании в клетке дополнительно накапливается вода, что может привести к так называемому осмотическому шоку.

Подводя итог, следует отметить, что можно выделить несколько основных повреждающих факторов в процессе замораживания-оттаивания:

- образование внутри- и внеклеточного льда;
- повышение внутри- и внеклеточного осмотического давления;
- повышение ионной силы вне и внутри клеток;
- наличие осмотических потоков воды;
- нарушение проницаемости мембран для растворённых веществ.

Факторы, влияющие на устойчивость микробных клеток в процессе замораживания-оттаивания

Об исключительной устойчивости микробов к действию низких температур сообщали еще Макфэдайн и Роуланд (1900 год) [9]. При замораживании культур возбудителей брюшного тифа, дифтерии, холеры, сибирской язвы, стафилококка, протей и молочнокислых бактерий на 20 часов при температуре минус 182 °С ими было установлено, что все микробные культуры после оттаивания были жизнеспособны.

В одном из своих обзоров Мазур [19] условно разделил микроорганизмы на 4 группы по отношению их к замораживанию-оттаиванию:

- хорошо переносящие и замораживание и оттаивание;
- более чувствительные к замораживанию, чем к оттаиванию;
- нечувствительные к замораживанию и хранению только при определённых условиях;
- не переносящие ни замораживания, ни хранения.

В таблице 1 представлен перечень наиболее значимых факторов, определяющих устойчивость микроорганизмов в процессе замораживания-оттаивания, приведённый Калкоттом [14].

Чувствительность разных видов микробов к замораживанию-оттаиванию неодинакова. В литературе [19] имеются сведения, что грамотрицательные бактерии более чувствительны к замораживанию, чем грамположительные. Из грамположительных микробов наибольшей устойчивостью обладают кокки. Подобное различие, вероятно, связано с особенностями строения клеточной стенки. Даже в пределах одного вида разные штаммы показывают неодинаковую чувствительность к низким температурам [14].

Для ряда бактерий установлено, что наиболее подвержены повреждению клетки в логарифмической фазе роста. Состав среды культивирования также может влиять на криочувствительность бактерий [19, 20]. Например, некоторые виды рода *Pseudomonas* различаются по чувствительности к замораживанию в зависимости от того, выращены ли они на питательном бульоне, либо на цитратной среде Косера [15]. Выращивание клеток *Lactobacillus bulgaricus* на среде с олеатом натрия увеличивает их резистентность, при этом в составе их липидов содержится повышенное количество C₁₉-циклопропановой кислоты [15]. Наличие в среде культивирования кислорода также влияет на криоустойчивость, показано, что для клеток *E. coli* увеличение аэрации приводит к повышению их резистентности к холоду. Арпай показал, что выживаемость бактериальных клеток при замораживании в значительной степени зависит от количественного содержания нуклеиновых кислот. Чем их больше, тем клетка устойчивее к действию низких температур, а накопление нуклеиновых кислот прямо зависит от среды культивирования. Они накапливаются в наибольшем количестве на обогащённых питательных средах [цит. по 10].

Влияние состава среды, в которой производится замораживание, будет рассмотрено

Таблица 1

Известные факторы, влияющие на выживаемость микробов при замораживании и оттаивании (по Mac Leod и Calcott, 1976) [14]

| Фактор | Авторы |
|---|--|
| Тип и штамм микроорганизма | Mazur, 1966 |
| Плотность популяции | Major, Mc Dougal, 1955 |
| Питательный состав среды выращивания | Calcott, Mac Leod, 1974 |
| Фаза и скорость роста | Davies, 1970; Calcott, Mac Leod, 1974 |
| Состав среды для замораживания | Harrison, 1956; Postgate, Hunter, 1961 |
| Скорость охлаждения до точки замерзания суспензии | Sherman, Albus, 1923; Meynell, 1958 |
| Скорость охлаждения от точки замерзания суспензии | Mazur, 1966; Davies, 1970 |
| Время выдерживания при низкой температуре | Haines, 1938; Harrison, 1956 |
| Температура выдерживания | Haines, 1938; Straka, Stokes, 1959 |
| Скорость нагревания до точки плавления | Mazur, 1966; Calcott, Mac Leod, 1974 |
| Разведение среды при определении жизнеспособности | Bretz, Hartsell, 1959 |
| Метод определения жизнеспособности | Postgate, 1969 |
| Среда, используемая для оценки жизнеспособности | Straka, Stokes, 1959 |

Характеристика скоростей охлаждения

| Характер изменения температуры | Скорость изменения температуры | Пределы изменения | Авторы |
|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|
| Сверхбыстрое | От 2 секунд и менее | От 0 до минус 190 °С | Люйе, 1941 |
| Быстрое | От 2 секунд до 2 минут | От 0 до минус 79 °С | Смит, Польдж, 1950 |
| Медленное | 10 минут и более | От 0 до минус 79 °С | Смит, Польдж, 1950 |
| Очень медленное | 1 час и более | На 20 °С в любых пределах | Польдж, Лавлок, 1952 |

ниже. В целом же надо отметить, что наличие в среде замораживания солей оказывает неблагоприятное воздействие. Однако некоторые ионы, например Mg^{2+} , оказывают протективное действие при замораживании. Для защиты клеток от гибели при криоконсервации используются самые различные соединения, механизм действия которых будет рассмотрен далее.

Для каждого вида микроорганизмов имеется оптимальная скорость замораживания. Некоторые авторы [21] для выбора оптимального режима и температуры замораживания клеток рекомендуют проводить предварительную оценку с использованием метода электронной микроскопии, который позволяет проследить структурные изменения в клетке в результате воздействия низких температур. О. Смит рекомендует условно различать следующие скорости охлаждения (табл. 2) [9].

Заслуживает внимания процедура двухэтапного замораживания биологических объектов, разработанная Фаррантом [22, 23], основанная на выборе условий, обеспечивающих эффективную дегидратацию клеток при относительно слабом воздействии концентрированных солей. При этом сначала замороженная культура кратковременно выдерживается при температуре от минус 20 °С до минус 30 °С, а затем температуру понижают до минус 196 °С. Этот метод был продемонстрирован на примере эукариотических клеток, которые являются более чувствительными к действию низких температур, чем клетки прокариотов. Таким образом, использование данного метода консервации вполне возможно и для микробов.

Следует отметить, что при кратковременном замораживании микроорганизмы высоко устойчивы в очень большом диапазоне низ-

ких температур. Однако наибольшая гибель во время непосредственного замораживания наблюдается при более высоких температурах до минус 30 °С и связана в основном с эвтектическим повреждением, в то время как в процессе длительного хранения микробы проявляют лучшую выживаемость при температурах ниже минус (70-80) °С [1, 14, 19, 20, 24 – 27]. Калкотт [14] приводит следующие данные: при температуре минус 80 °С гибель микробов при хранении в 1000 раз меньше, чем при температуре от минус 10 °С до минус 15 °С.

В настоящее время применяют криоконсервацию микробов при температурах от 0 °С до минус 196 °С. Обычное замораживание при температуре от 0 до минус 20 °С в принципе не рекомендуется вследствие высокого риска эвтектического повреждения клеток. Вместе с тем некоторые бактерии могут сохраняться таким образом от 6 до 24 месяцев. Замораживание при минус 70 °С используется для сохранения самых разнообразных микроорганизмов: бактерий, простейших, грибов, вирусов. Замораживание при минус 140 °С и минус 196 °С (в парообразной и жидкой фазе азота) обычно применяют для чувствительных к повреждению биологических объектов, этот процесс называется ультразамораживанием.

Как известно, повторные замораживания и оттаивания крайне неблагоприятно сказываются на выживаемости микроорганизмов. Существуют методики, позволяющие избежать этого. В национальной коллекции типовых культур Великобритании с этой целью применяют замораживание микробной суспензии при температуре минус (60 – 76) °С в смеси со стеклянными бусами [1]. По мере надобности из сосуда с криоконсервированной культурой

извлекается асептически одна или несколько бусин, с которых и производится высеv.

При оттаивании криоконсервированных культур также нужно соблюдать ряд требований. Быстрое нагревание всегда более предпочтительно, чем медленное, оно оказывает больший протективный эффект. Особенно важно это для ультразамороженных культур, их оттаивают максимально быстро, так как во время медленного размораживания создаётся угроза рекристаллизации и дополнительного повреждения клеток. Такие культуры рекомендуют нагревать при температуре от 20 °С до 60 °С по Э.Я. Граевскому [10], 40 °С по И.В. Смирнову [25].

Кроме того, при определении жизнеспособности клеток после оттаивания надо учитывать влияние на клетки самих манипуляций при проведении той или иной методики. Очень большое значение имеет питательная среда, на которую высевают культуру, так как именно она обуславливает способность клеток к размножению [14, 20]. В литературе [15] приводится деление всех клеток замороженной популяции на 3 вида:

- неповреждённые;
- повреждённые;
- нежизнеспособные.

Неповреждённые клетки могут расти как на минимальных, так и на богатых питательных средах. Клетки повреждённые растут только на богатой питательной среде. Нежизнеспособные клетки не растут даже на богатых средах. Соотношение этих видов клеток в замороженной популяции зависит от многих факторов, и в первую очередь от условий замораживания-оттаивания. Способность повреждённых клеток расти на богатой питательной среде указывает на возможность репарации повреждений. Репарация повреждений на фоне низкой температуры может быть двух видов: неметаболической и метаболической. Первый вид репарации связан с возможностью восстановления структуры мембран клеток после замораживания за счёт их естественной способности к самоорганизации. Метаболическая репарация находится в связи со специфическими факторами среды. Так показано, что такие добавки к среде, как триптиказа, глутаминовая кислота, аланин, положительно влияют на репарацию повреждённых клеток, а серин и некоторые ионы, например, меди, уменьшают число восстановившихся клеток [15].

Таким образом, чувствительность микробов к замораживанию-оттаиванию является

функцией многих переменных и связана непосредственно как со свойствами самих микробов, так и с условиями криоконсервации.

Структурная основа повреждений микробов при замораживании-оттаивании

Основной структурой, повреждаемой при замораживании-оттаивании, является цитоплазматическая мембрана, как один из самых активно функционирующих элементов клетки. Главным образом, подобное повреждение сводится к нарушению её барьерных свойств и может носить временный и стойкий характер [24, 27 – 30]. Временное повреждение в основном сводится к выходу из клетки некоторых низкомолекулярных веществ, в частности, ионов калия, его обратимость связана с возможностью самопроизвольного восстановления структуры мембран при положительных температурах [24]. Стойкие повреждения обуславливают выход из клетки ряда внутриклеточных ферментов, что определяется по увеличению их доступности для добавляемых извне субстратов [15]. После замораживания-оттаивания страдают некоторые энзиматические функции мембран: активный транспорт, дыхание, что может быть связано либо с выходом из клетки субстратов энергетического обмена, либо с частичной инактивацией соответствующих ферментных систем. Нарушение функций мембран, вероятнее всего, имеет под собой основной структурные изменения, что подтверждается обнаружением во внеклеточной среде компонентов мембраны: липополисахаридов, белков, липидов [31].

Чувствительность генетических структур микробов к криоконсервации невелика. В пользу этого свидетельствует отсутствие мутаций после низкотемпературного воздействия на микроорганизмы [25]. Но есть отдельные указания на возможность однонитевых разрывов ДНК в ходе замораживания-оттаивания [26]. Кроме того, имеются указания [30, 31] на возможность метаболического повреждения генома клеток в процессе выхода их из анабиотического состояния. Подобные повреждения, связанные с дисбалансом ферментных систем клетки, особенно выражены при повторном замораживании-оттаивании, а также при нагревании микробов в процессе оттаивания до 37 °С. Они выражаются в разрывах ДНК и накоплении продуктов дегра-

дации на фоне подавленного синтеза ДНК и белка. Данное повреждение генома, вероятно, является одной из причин гибели клеток при замораживании-оттаивании. Нельзя также исключить возможность повреждения некоторых белков при воздействии низких температур. Однако этот вопрос до конца ещё не изучен.

Таким образом, на основании литературных данных следует признать, что наиболее уязвимой структурой при замораживании-оттаивании является мембрана, и её повреждение в значительной мере определяет чувствительность микробов в процессе криоконсервации.

Криозащитные вещества

Применение криозащитных веществ в процессе низкотемпературной консервации биологических объектов является одним из самых доступных, перспективных и широко разрабатываемых в настоящее время путей повышения устойчивости микробов к замораживанию.

Существует несколько подходов к классификации криопротекторов. По составу среды выделяют простые и сложные криопротекторы: к простым относят вещества или смеси с идентифицированной химической структурой (глицерин, диметилсульфоксид); к сложным относятся смеси неопределённого состава (молочный белок, мясной экстракт, сыворотка) [19].

Криопротекторы подразделяют также в зависимости от избирательности их действия на том или ином этапе криоконсервации [27]. Выделяют вещества, защищающие от повреждений в процессе замораживания (глицерин, сахара, гликоли), а также во время хранения (яичный белок, молочный белок, сыворотка).

Наиболее традиционным является деление криопротекторов на проникающие и непроникающие [27]. Проникающие криопротекторы (глицерин, диметилсульфоксид) по мере замерзания внеклеточной воды концентрируются и снижают степень эвтектического повреждения клеток, их целесообразно применять при низких скоростях замораживания [9]. Непроникающие криопротекторы (поливинилпирролидон, декстран, полиэтиленгликоль) вызывают дегидратацию клеток и снижают внутриклеточную кристаллизацию воды, они также непосредственно влияют на мембраны клеток [19].

Одним из самых эффективных и наиболее давно известных криопротекторов является представитель многоатомных спиртов – глицерин. Его защитные свойства были случайно открыты в 1949 году Польджем. Однако ещё в 1946 году Ростан уже применял его для защиты сперматозоидов лягушки при хранении их в условиях низкой температуры [9]. Важное достоинство глицерина заключается в том, что он – естественный метаболит во многих клеточных реакциях, не оказывает вредного влияния на ферментативные системы клетки, не токсичен даже в высоких концентрациях. Глицерин обладает замечательной растворимостью. Его низкий молекулярный вес позволяет ему хорошо проникать внутрь клетки. Что касается механизма криозащитного действия этого соединения, то целый ряд исследователей полагает [9, 10, 14, 15], что глицерин изменяет структуру воды в клетках и вокруг них за счёт перераспределения водородных связей, при этом снижается точка замерзания воды и замедляется скорость кристаллизации. По данным Смита [9], в присутствии (15 – 20) % глицерина температура образования льда в клетках снижается до минус (10-20) °С. Замедление скорости кристаллизации воды в клетке приводит к уменьшению повреждающего действия концентрированного раствора солей до достижения эвтектической точки. Рассматривалась также способность глицерина содействовать развитию витрификации при сверхбыстром ультразамораживании [9]. Исследованиями А.Д. Заморского [11] было показано влияние глицерина и на форму образующихся кристаллов льда, что тоже уменьшает повреждение клеток в процессе замораживания.

Подобным механизмом действия обладает диметилсульфоксид. По данным Феррента, 40%-ная концентрация его в замораживаемой суспензии клеток практически полностью предотвращает увеличение концентрации NaCl в растворе и эвтектическое повреждение при охлаждении до минус 80 °С [11].

Прочие низкомолекулярные вещества (глюкоза, лактоза, сахароза, маннит, сорбит, мочевины) в клетку не проникают и по механизму действия напоминают высокомолекулярные криопротекторы. Надо отметить, что их защитное действие наиболее выражено непосредственно в ходе замораживания, а в процессе хранения этот эффект отсутствует.

Высокомолекулярные вещества, такие как поливинилпирролидон, пептон, гликоли,

декстран, белки, желатоза и другие относятся, как указывалось выше, к непроницающим криопротекторам. Они оказывают стабилизирующее действие на внеклеточную воду за счёт перераспределения водородных связей, могут изменять проницаемость мембран для ионов натрия и калия, регулируют потоки воды через мембрану клетки во время замораживания-оттаивания, уменьшая тем самым осмотическое повреждение клеток [9, 14, 18, 20]. Из них широкое применение для целей криопротекции нашёл поливинилпирролидон, однако отдельными исследованиями отмечено, что существует возможность проявления бактерицидного эффекта поливинилпирролидона при использовании его в концентрации порядка 10% [33]. Относительно применения гликолей в качестве криопротекторов имеются данные, что они в высоких концентрациях токсичны для клеток, а в обычных концентрациях способны ингибировать некоторые ферментные системы клетки [34].

Издавна с целью защиты микробных культур при замораживании и хранении применяли стабилизирующие среды так называемого неопределённого состава: яичный белок, обезжиренное молоко, кровь, сыворотку, солодовый экстракт. Их действие, вероятно, носит смешанный характер. Эти смеси показывают хороший защитный эффект в процессе длительного хранения культур.

Исследования по сравнению действия проникающих и непроницающих криопротекторов (глицерина и декстрана) проводили Л.Ф. Смирнова и С.С. Автушенко [35]. Они оценивали степень их протективного влияния на мембраны клеток по количеству освобождённых из них низкомолекулярных биополимеров. Глицерин не влиял на проницаемость мембран в исходной культуре при замораживании до минус 10 °С и не защищал их от действия детергента лаурилсульфата натрия, но был эффективен при ультразвуковом замораживании при минус 196 °С, что, вероятно, связано с его влиянием преимущественно на внутреннюю мембрану клеток. Декстран же более эффективен в защите внешней мембраны вследствие взаимодействия с её структурами и стабилизации их. Он значительно снижал потерю клетками низкомолекулярных биополимеров как в исходной культуре, так и при замораживании до минус 10 °С и при влиянии детергента. Наиболее благоприятные результаты получены при совместном использовании глицерина и декстрана.

В литературе имеются отдельные сведения и по некоторым другим способам хранения микробных культур в замороженном состоянии, например, в трупах и органах инфицированных животных [20].

В заключение следует привести несколько практических рекомендаций. Замораживание микробных суспензий желательно производить в небольшом объёме от 1 до 2 см³. В качестве защитных сред можно использовать 15-процентный глицерин, 10-30-процентный раствор глюкозы, лактозы, сахарозы, 1-процентный раствор диметилсульфоксида, 5-10-процентный желатин, 5-процентный раствор пептона, 30-50-процентную сыворотку животных, инактивированную в течение 1 часа при температуре 56 °С, 30-50-процентное обезжиренное молоко. Средняя продолжительность хранения микробных суспензий в замороженном состоянии составляет: при минус (15-20) °С – 6 месяцев; при минус 30 °С – от 6 до 9 месяцев; при минус 40 °С 12 месяцев; при минус (50-60) °С – до 3 лет; при минус (70-80) °С и ниже – не менее 10 лет [11, 36] при условии строгого соблюдения температурного режима хранения, так как даже кратковременные колебания температуры значительно снижают жизнеспособность микробов.

Таким образом, низкотемпературная консервация микробных культур весьма перспективна ввиду своей простоты, доступности и эффективности в плане выживаемости микробов и сохранения стабильности их биологических свойств.

Литература

1. Maintenance of Microorganisms. A manual of Laboratory Methods / Ed. by B.E. Kirsop, J.J. Snell. - London: Academic Press, 1984. 207 p.
2. The Role of Culture Collection in the Era of Molecular Biology / Ed. by R.R. Colwell. Amer. Soc. for Microbiol. Washington, D.S. 1976. 132 p.
3. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. Москва. 1967. 167 с.
4. Clark W. A., Teary D. H. History of American Type Culture Collection. Adv. in Appl. Microbiol. 1974. V. 17. P. 295-309.
5. Кудрявцев В.И. Коллекции типовых культур микроорганизмов в Англии // Микробиология. 1963. Т. 32. Вып. 5. С. 909-911.
6. Кудрявцев В.И. Коллекции типовых культур микроорганизмов // Микробиология. 1965. Т. 34. Вып. 3. С. 564-567.

7. Теоретические и практические аспекты современной криобиологии. Киев. 1989. 78 с.
8. Евтушенко Л.И., Хоксворт Д.Л. Руководство по организации и деятельности коллекций культур микроорганизмов // Микробиология. 1993. Т. 62. С.721-723.
9. Смит О. Влияние низких температур на живые ткани и клетки // Применение замораживания-высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. Москва. 1956. 503 с.
10. Колесов С.Г. Анабиоз патогенных микроорганизмов. Москва. 1959. 142 с.
11. Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. Москва. 1979. 337 с.
12. Беккер М.Е., Дамберг Б.Э., Раппопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. Рига. 1981. 178 с.
13. Голдовский А.М. Анабиоз. Москва. 1980. 167 с.
14. Калкотт П. Замораживание и размораживание микробов. Москва. 1980. 74 с.
15. Говорунов И.Г., Пучков Е.О. Низкотемпературная консервация бактерий // Общие вопросы микробиологической промышленности. Вып. 4. Москва. 1982. 19 с.
16. Orndorff G.R., MacKenzie A.P. The function of the suspending medium during the freeze-drying preservation of *Escherichia coli* // Cryobiology. 1973. V. 10. № 6. P. 475-487.
17. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию. Киев. 1975. 204 с.
18. Рэ Луи Консервация жизни холодом. Москва. 1962. 175 с.
19. Mazur P. In: Cryobiology. New-York - London: Academic Press. 1966. P. 213-315.
20. Эшвуд-Смит М. Консервирование микроорганизмов замораживанием, сушкой из замороженного состояния и обезвоживанием в эксикаторе. Москва. 1982. 36 с.
21. Свентицкий Е.Н., Чурилина С.Е., Писаревский Ю.С., Курганская Г.В. Наблюдение процессов низкотемпературной кристаллизации в водной суспензии клеток методом электронной микроскопии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1989. № 8. С. 14-17.
22. Daw A., Farrant J., Morris G.J. Membrane leakage of solutes after thermal shock of freezing // Cryobiology. 1973. V. 10. № 2. P.126-133.
23. The frozen cell / Ed. by G.E.W. Wolstenholm, M.O'Connor. London: Churchill, 1970. 97 p.
24. Calcott P.H., Mac Leod R.A. The survival of *Escherichia coli* from freeze-thaw damage: permeability barrier damage and viability // Can. J. Microbiol. 1975. V. 21. № 11. P. 1724-1732.
25. Bradly S.G. // Culture Collection: Perspectives and Problems Proceedings of the Specialists Conference on Culture Collection (S.M. Martin ed.). University of Toronto Press. Canada, 1963. 214 p.
26. Swartz Harold M. Effect of oxygen on freezing damage: II. Physicalchemical effects // Cryobiology. 1971. V. 8. № 3. P. 255-264.
27. Mac Leod R.A., Calcott P.H. // The Survival of Vegetative Microbes: 26-th Symp. Soc. Gen. Microbiol. University Cambridge. Cambridge, E.A., 1976. P. 81.
28. Цуцаева А.А., Кудокоцева О.В. Криостабильность дрожжевых клеток и их чувствительность к основным факторам замораживания // Микробиология. 1990. Т. 59. С. 339-341.
29. Тимошин А.А., Раппопорт А.И., Бекер М.Е. Влияние высушивания на термоиндуцированные структурные перестройки цитоплазматической мембраны клеток дрожжей // Микробиология. 1990. Т. 59. С. 679-682.
30. Иванов В.Н., Раппопорт А.И., Пиндрус А.А., Саулите Л.А., Шифрук Т.А. Фазоспецифичность повреждений и репарации поврежденных клеток дрожжей при обезвоживании-регидратации и замораживании-оттаивании // Микробиология. 1988. Т. 57. С. 341-344.
31. Цуцаева А.А., Казанская Л.Н., Балыбердина Л.М., Маркова В.М., Кудокоцева О.В., Кадникова Н.Г. Влияние условий криоконсервирования на морфофункциональные свойства *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. 1988. Т. 57. С. 338-400.
32. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1968. № 2. С. 59-66.
33. Мальцев В. Н., Стрельников В. А., Федоровский Л. Л. Влияние поливинилпирролидона на микробные клетки // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987. № 4. С. 9-11.
34. Галаев Ю. В., Фролов В. И., Кириш Ю. Э. Влияние полимеров на биологические свойства микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987. № 4. С. 110-111.
35. Смирнова Л. Ф., Автушенко С. С. О механизмах защитного действия криопротекторов на клетки *E. coli* // Микробиология. 1988. Т. 57. Вып. 3. С. 494-498.
36. Герна Р. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. Москва. 1983. Т. 1. 210 с.