

Методы поддержания микробных культур. Часть 2. Лиофилизация

© 2009. В.Ю. Охашкина, д.м.н., с.н.с.,

Лаборатория биомониторинга Института биологии Коми НЦ УрО РАН и ВятГГУ,
e-mail: ecolab2@gmail.com

В статье обобщены данные литературы по использованию лиофилизации для поддержания и хранения микроорганизмов в музейных коллекциях, описаны сущность процесса, механизмы и последствия воздействия сублимационного высушивания на микробные клетки, представлены сведения о составе и области применения защитных сред.

The article summarizes the data on liophylisation for the purpose of maintaining and keeping microorganisms in museum collections. It describes the essence of the process, mechanisms and consequences of sublimation desiccation on microbe cells. It also presents information on content and sphere of using protective mediums.

Ключевые слова: методы хранения, высушивание, лиофилизация, защитные среды, влияние на микроорганизмы

Key words: methods of storage, desiccation, liophylisation, protective mediums, impact on microorganisms

Как указывалось ранее в обзоре [1], большинство эффективных методов хранения микроорганизмов основано на искусственном переводе их в анабиотическое состояние, что достигается экспериментальным изменением условий окружающей среды. Известно, что основным фактором, обеспечивающим протекание биохимических процессов в клетке, является вода. Потеря влаги ведёт к замедлению жизнедеятельности микробной клетки. Устранения действия воды можно добиться либо её переводом в неактивное состояние (замораживание), либо удалением (высушивание).

Методы высушивания микробных культур известны с конца прошлого – начала нынешнего века. Ещё в 1909 году Шеккель применил метод замораживания в смеси льда с солью с последующим поглощением влаги серной кислотой под вакуумом для высушивания крови и антисыворотки, а в 1911 году он совместно с Харрисом успешно применил этот метод для сохранения вируса бешенства [2].

В 1914 году Роджерс [3] лиофилизировал указанным способом молочнокислые бактерии, при этом большинство микробов быстро утратили жизнеспособность, ввиду чего исследователь высказал сомнение в возможности длительной консервации бактерий путём высушивания. Однако он первый отметил очень важный факт влияния на выживаемость микробов остаточной влажности. В те

же годы Хаммер провел исследования по сохранению таким способом кишечной палочки, стафилококка, псевдомонад. На устойчивость бактерий к высушиванию указывал Сербинов [3], в его экспериментах в 1916 году культура *Azotobacter* при высушивании в эксикаторе сохранялась в жизнеспособном состоянии в течение 160 дней. В 1921 году Свифт [3] предложил вместо смеси льда с солью использовать твёрдую уголекислоту, а серную кислоту он заменил на пятиокись фосфора.

Браун [4] высушивал взвеси бактерий на полосках фильтровальной бумаги. Существенным моментом являлось то, что перед высушиванием он смешивал культуры гонококков с кровью или сывороткой и тем самым положил начало применению защитных сред. Он же впервые применил хранение высушенных культур под вакуумом. В 1935 году Флосдорф и Мадд [3] разработали криохимический способ высушивания биопрепаратов и ввели метод самозамораживания вместо предварительного замораживания. В Советском Союзе метод лиофилизации был впервые применён Г.И. Лаппа-Старженецким в 1921 году.

В последующие годы методы высушивания микробов, и в первую очередь лиофилизация, были детально разработаны и получили самое широкое распространение в микробиологической практике.

Наряду с лиофилизацией в лабораторной деятельности по настоящее время использу-

ются некоторые простые и доступные методы высушивания микробов, которые не требуют специального оборудования и позволяют в течение непродолжительного времени сохранять культуры, необходимые для работы.

Методы высушивания микробных культур, обеспечивающие непродолжительное хранение

При обычном высушивании на воздухе в лабораторных условиях многие микроорганизмы погибают. Однако некоторые культуры, особенно спорообразующих бактерий, можно сохранять достаточно долго, если высушивать их в определённых условиях.

Спорообразующие микроорганизмы успешно можно сохранять годами в стерильной почве, высушенной на воздухе. Для этого автоклавированная плодородная садовая почва смешивается с густой суспензией спор, помещается в герметичные укупорки и хранится в холодильнике при температуре от 2 до 6 °С. Наряду с почвой при данном методе хранения можно применять и другие естественные материалы – речной песок, опилки, торф [4].

Простым и доступным методом сохранения микробов является их высушивание на полосках или дисках стерильной фильтровальной бумаги [5, 6]. В общем сосуде можно хранить много дисков, содержащих одну и ту же культуру. По мере надобности диск извлекают стерильным пинцетом и асептически вносят в соответствующую жидкую питательную среду. Представители семейства *Enterobacteriaceae* сохраняются таким образом до нескольких лет. Выживаемость микробов можно повысить, если высушивать бумагу, пропитанную культурой не на воздухе, а под вакуумом, и хранить её в последующем в запечатанных ёмкостях в холодильнике.

Многие бактерии можно хранить в высушенных под вакуумом каплях или дисках пищевого желатина [5, 6]. В таком виде микробы предпочтительнее содержать при температуре от минус 18 до минус 22 °С. Для восстановления культуры желатиновую каплю достаточно перенести в пробирку с соответствующей питательной средой.

Методы высушивания микробных культур, обеспечивающие продолжительное хранение

Применяемые способы длительного хранения микробных культур путём высушивания

должны отвечать двум основным требованиям: процесс высушивания не должен оказывать вредного влияния на биологические объекты, сухие препараты должны длительно сохранять свои свойства.

Традиционные методы высушивания в эксикаторах и в сушильных шкафах без предварительного замораживания приводили к быстрой потере активных свойств препаратов. При этом высушенный материал имел большой процент остаточной влажности, вызывающей процессы окисления, а факторы денатурации белка обуславливали ухудшение растворимости препарата, снижая тем самым его качество.

В настоящее время в практике широко применяются вакуумные аппараты, позволяющие высушивать не только малые количества микробных культур (коллекторные аппараты), но и значительные количества вакцинных биопрепаратов (камерные аппараты). И в том, и в другом случае высушивание производят из замороженного состояния в условиях глубокого вакуума.

В литературе [3, 7–9] имеются данные, что наряду с лиофилизацией для высушивания микробов может быть использовано высушивание методом распыления. Этот метод является принципиально отличным от лиофилизации, их объединяет только конечный эффект – обезвоживание до пределов, позволяющих длительно сохранять биологические свойства препаратов. Высушивание распылением характеризуется тремя основными процессами: распылением раствора, смешиванием распылённых частиц с нагретым газом, тепло- и массообменом между ними, после чего высушенные частицы извлекаются из потока воздуха. Имеются отдельные сведения об успешном применении этого метода для обезвоживания микробов. Н.Н. Титов [3] использовал его для высушивания бацилл Метальникова, которые служат в качестве агента для борьбы с саранчой, и отмечал, что не нашёл разницы в выживаемости между культурами, высушенными распылением и лиофилизированными. В 1940 году он же высушивал методом распыления сальмонеллы Данича, выживаемость микробов при этом составила свыше 50%, что является вполне удовлетворительным результатом. Успешными были опыты по применению распыления для сушки молочнокислых и ацидофильных палочек [3]. Однако высушивание распылением, являясь высокопроизводительным методом обезвоживания биологических ма-

териалов, по понятным причинам не может быть использовано для высушивания небольших количеств эталонных и коллекционных штаммов микробов. Приведённые данные свидетельствуют о возможности применения этого метода для консервирования бактерий, производство которых налажено на промышленной основе.

Сущность и основные принципы процесса лиофилизации микробных культур

Высушивание из замороженного состояния отличается от других способов высушивания тем, что вода при этом удаляется из материала путём превращения льда непосредственно в пар, минуя жидкую фазу. Физические особенности этого нашли отражение в многочисленных синонимах, под которыми данный процесс упоминается в литературе: лиофильный способ, лиофильное высушивание, сублимация, сублимационное высушивание, высушивание из замороженного состояния, замораживание-высушивание, молекулярная сушка [10, 11].

В обычных условиях вода закипает и превращается в пар при температуре 100 °С и атмосферном давлении 760 мм рт. ст. Если давление над поверхностью воды прогрессивно уменьшать, то точка кипения воды будет понижаться. При снижении давления до 4 мм рт. ст., что ниже упругости паров льда при 0 °С, высушивание будет происходить из замороженного состояния [12].

При переходе льда непосредственно в пар биологический материал превращается в губчатую массу из белка и солей, объём которой равен объёму первоначальной замороженной массы. При этом предотвращается агрегация молекул белка и воздействие на них высоких концентраций солей. Полученный продукт предельно быстро и легко растворяется. Успех высушивания в основном зависит от температуры материала. Она должна быть достаточно низкой, чтобы избежать оттаивания препарата и концентрации солей, и достаточно высокой, чтобы не тормозить процесс высушивания.

Процесс замораживания-высушивания можно разделить на следующие стадии [12]:

1. Замораживание.
2. Первичное высушивание или стадия сублимации.
3. Вторичное высушивание или досушивание и упаковка.

Как уже указывалось, предварительное замораживание предотвращает денатурацию белка в высушиваемом материале, а также препятствует вспениванию его при создании глубокого вакуума в системе аппарата.

Способы замораживания можно классифицировать следующим образом [12].

1. Самозамораживание (замораживание путём испарения).

1.1. Быстрое замораживание с удалением из материала газов.

1.2. Центробежное замораживание в вакууме.

2. Предварительное замораживание.

2.1. Статическое.

2.2. Пристеночное.

2.3. Центробежное.

Принцип самозамораживания сводится к тому, что в условиях достаточного вакуума при наличии химического поглотителя водяных паров или охлаждённой поверхности конденсатора обильно испаряется влага, быстро понижается температура и материал замораживается. Однако при быстром снижении давления из замораживаемого материала обильно выделяются растворённые в нём газы, обуславливая массивное вспенивание. Это крайне нежелательно, так как может привести к вытеканию жидкости из сосудов. Метод удаления газов заключается в том, что давление в сушильной камере понижают постепенно до момента, когда появляются пузырьки газа, а затем его поддерживают на одном уровне до полного прекращения отделения газа. Последующее снижение давления не сопровождается выделением газов, и при достижении достаточного вакуума жидкость моментально превращается в лёд.

Обильного вспенивания можно также избежать, сочетая понижение давления с центрифугированием препарата. При этом лёд образуется в центре материала и быстро распространяется на периферию. Добавочная сила, которая создаётся центрифугированием при пониженном давлении, увеличивает поверхностное натяжение и препятствует зарождению и выходу газовых пузырьков наружу. Замораживание в этом случае происходит без удаления газов. Для того чтобы полностью предотвратить вспенивание, достаточно сообщить сосуду незначительное ускорение: для ампулы диаметром 25 мм скорость вращения составляет 700 оборотов в минуту [12].

Предварительное замораживание наиболее часто используют при лиофилизации биологических препаратов. В связи с тем, что

сублимация осуществляется с поверхности замороженного материала, на скорость высушивания влияют площадь этой поверхности и толщина слоя. Материал, разлитый в ампулы или флаконы в небольшом количестве при толщине слоя не более 8-10 мм, можно замораживать в вертикальном состоянии (статическое замораживание). Чаще всего материал в ампулах замораживают в наклонном положении для увеличения площади поверхности. Более рационально для этого равномерное распределение материала по всей внутренней поверхности сосуда, что достигается медленным его вращением почти в горизонтальном положении в ёмкости с охлаждающей смесью (пристеночное замораживание). Ряд производств используют пристеночное замораживание путём быстрого вращения сосуда с препаратом в вертикальном положении в ванне с охлаждающей жидкостью или камере с низкой температурой воздуха (центробежное замораживание).

Для предварительного замораживания используют воздушные холодильные камеры, создающие температуру от минус 40 до минус 60 °С, охлаждённый спирт (с температурой от минус 30 до минус 60 °С, смесь спирта или ацетона с сухим льдом (с температурой минус 78 °С). Для этих целей могут также использоваться смеси льда или снега с рядом химических соединений (табл. 1) [13].

Вторым этапом лиофилизации является сублимация. Она осуществляется за счёт тепла, поступающего из внешней среды. Подведение тепла к высушиваемому материалу достигается конвекционным и контактным путями, термоизлучением либо их сочетанием. Важным моментом процесса сублимации является обеспечение отвода и конденсации водяных паров. Наиболее ранним является криохимический способ, основанный на

поглощении водяного пара химическими соединениями. Последние помещают между сушильной камерой и коллектором, чтобы все откачиваемые пары жидкости проходили через слой сорбирующего материала. Такие химические вещества могут образовывать с водой новые соединения (пятиокись фосфора) либо просто связывать её без изменения свойств (гипс, серная кислота и т. п.). Влагопоглощающая способность различных соединений неодинакова (табл. 2) [13].

Как видно из таблицы 2, непревзойдённым сорбентом водяных паров является пятиокись фосфора. Для удаления 100 л воды требуется всего 0,5 кг этого соединения [3]. Однако он не регенерируется в отличие от других сорбентов, например, гипса. Недостатком всех сорбентов является снижение их поглощающей способности по мере насыщения водой. Наиболее целесообразно применять их для досушивания предварительно лиофилизированных препаратов с остаточной влажностью от 6 до 8% либо для высушивания небольших количеств музейных и экспериментальных культур.

Сублимация осуществляется только в условиях относительно высокого вакуума, что достигается с помощью вакуумных насосов и специальных герметичных камер.

Досушивание препаратов – заключительная стадия лиофилизации. В клеточных суспензиях и биологических материалах имеется свободная и связанная вода. В процессе сублимации удаляется свободная и часть связанной воды. Связанная вода обладает прочной связью с гидрофильными веществами клетки. В зависимости от свойств препарата её содержание может быть сравнительно высоким. Удаление этой фракции воды и происходит в процессе досушивания. Однако сухой препарат должен содержать определённый процент влаги во избежание структурных

Таблица 1

Температуры, создаваемые при смешивании льда и снега с разными химическими соединениями

Формула соли	Число весовых частей на 100 частей снега	Температура смеси (°С)
KCl	30	-11
CaCl ₂	30	-11
NH ₄ Cl	25	-15,8
NH ₄ NO ₃	60	-17,3
NaNO ₃	59	-18,5
NaCl	33	-21,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	62	-19
CaCl ₂ ·6H ₂ O	82	-21,5
CaCl ₂ ·6H ₂ O	125	-40,3
CaCl ₂ ·6H ₂ O	143	-55

Влагопоглощающая способность некоторых химических соединений

Высушивающее вещество	Количество водяных паров, остающихся в 1 дм ³ воздуха при 25 °С (мг) при скорости 1-3 дм ³ /мин
Фосфорный ангидрид	0,000025
Едкий калий (плавленый)	0,002
Сернокислый кальций (гипс)	0,004
Хлористый кальций (в гранулах)	0,14
Серная кислота (95,1%)	0,3

повреждений и денатурации белка. Процент остаточной влажности для различных высушенных материалов колеблется от 1 до 6% [13].

Все сухие препараты обладают высокой гидрофильностью, поэтому их упаковка должна проводиться в помещении с влажностью не более 12–14%, флаконы и бутылки должны закупориваться герметично, а ампулы желательно запаивать под вакуумом [3].

Простейшее приспособление для лиофилизации – эксикатор, куда помещают замороженный материал и поглотитель влаги и откачивают из него воздух с помощью насоса. Для лиофилизации больших объёмов биопрепаратов используют специальные аппараты: коллекторные, камерные и камерно-коллекторные.

Факторы, влияющие на устойчивость микроорганизмов к лиофилизации и хранению

Как известно, главными факторами, обеспечивающими жизнедеятельность, рост и размножение микробов, являются питание, дыхание и обмен веществ между клеткой и окружающей средой. Питание микробов возможно только в условиях определённой влажности, чтобы питательные вещества могли диффундировать в клетку. Поэтому микробные клетки содержат в среднем 80% воды. Вода является средой и компонентом практически всех химических реакций, протекающих в них. Увеличение или уменьшение количества влаги, содержащейся в живом организме, в большой мере влияет на его жизнеспособность. Ещё одним важным условием жизни клетки является дыхание, и, независимо от его характера (анаэробное, аэробное), для осуществления газообмена необходима жидкая среда. Таким образом, если для поддержания жизни микробов обычными способами требуется вода, питательные вещества и кислород воздуха, то для сохранения высушенных

микробов нужны прямо противоположные условия, обеспечивающие их поддержание в состоянии анабиоза.

Микробы в большинстве своём хорошо переносят обезвоживание, как из замороженного состояния, так и при положительных температурах. В первом случае жизнеспособность будет в основном определяться чувствительностью микроорганизмов к замораживанию, во втором – от их способности сохранять физиологические функции при низком содержании влаги.

Фрай [14] на основании данных литературы и своих исследований разделил все бактерии по степени устойчивости к лиофилизации на три группы. К наиболее устойчивым к высушиванию микробам он относит стрептококков, особенно гноеродных, и стафилококков, их выживаемость составляет от 72 до 100%. К группе бактерий со средней степенью устойчивости он относит сальмонелл, шигелл, бруцелл, выживаемость которых колеблется от 10 до 30%. И, наконец, к группе наиболее чувствительных бактерий отнесены *Neisseria*, *Haemophylus*, холерный вибрион, выживаемость которых не превышает 1–1,5%.

Помимо индивидуальной и групповой чувствительности к высушиванию сохраняемость бактерий в процессе обезвоживания и последующего хранения зависит от ряда факторов: возраста культуры, условий культивирования, состава питательной среды для выращивания, режима и способа лиофилизации, стабилизирующей среды, величины остаточной влажности, условий хранения и пр. [15, 16].

Надо отметить, что чувствительные к высушиванию микробы требуют более строгого и неукоснительного соблюдения условий и режима лиофилизации. Резонно предположить, что способ и условия высушивания, приемлемые для малоустойчивых микроорганизмов, могут быть с успехом применены для других более устойчивых бактерий.

Как уже указывалось, вид и род микроорганизмов в значительной мере влияет на их устойчивость в процессе высушивания и даже

отдельные штаммы одного вида имеют иногда различную выживаемость после данного воздействия [3]. Есть указания, что грамположительные бактерии более резистентны к обезвоживанию, чем грамотрицательные [17]. Устойчивость к высушиванию также зависит от возраста культуры. Очень молодые и очень старые культуры проявляют худшую выживаемость, что наглядно подтверждается некоторыми исследованиями [3]. При лиофилизации 7-9-дневной культуры туберкулёзных бактерий вакцинного штамма БЦЖ выживаемость микробов составила 68,0–87,5%, в вакцине из 10-дневной культуры – 33,0%, а из 17-дневной – всего лишь 3,2%. Шульц и Ритц [18] обнаружили, что клетки кишечной палочки наиболее устойчивы к лиофилизации в логарифмической фазе роста. Интересные данные приводятся Э.К. Карасевичем и А.В. Платоновым [19]. При совместном высушивании пропионовокислых и ацидофильных бактерий максимальная выживаемость отмечается при подсевах ацидофильных бактерий к 36-часовой культуре пропионовокислых и совместном культивировании в течение 18 часов.

На чувствительность микробов к обезвоживанию влияют и условия культивирования бактерий [20]. Выращивание при пониженной температуре способствует тому, что микробы становятся более чувствительными к высушиванию, а аэрация культур большинства видов аэробных микроорганизмов увеличивает их устойчивость к такому воздействию [14]. Есть данные, что добавление в среду 2% глицерина оказывает благоприятный эффект при лиофилизации микробов. Не рекомендуется лиофилировать микробные клетки в той же среде, где они выращивались. Клетки предварительно нужно отцентрифугировать и затем ресуспендировать в свежей питательной или в стабилизирующей среде.

Вопрос о влиянии первоначальной концентрации микробов на выживаемость в процессе высушивания является спорным. Ряд авторов полагает, что эти два фактора связаны прямой зависимостью [3, 21], другие не разделяют эту точку зрения [13, 18, 22]. Вероятнее всего, что при высушивании клеток в надлежащей защитной среде выживаемость не зависит от исходной концентрации их в суспензии.

Огромное влияние на устойчивость микробов к высушиванию оказывает среда, в которой суспендируется культура. Требования, предъявляемые к защитным средам, и особенности их качественного состава будут рас-

смотрены далее. Следует отметить, что наличие солей в защитной среде нежелательно по той же самой причине, что и при замораживании. Важным моментом является выбор оптимального соотношения между объёмом микробной массы и объёмом стабилизирующей среды. По этому поводу проводился ряд исследований, но они не дали убедительного ответа на поставленный вопрос. Заслуживает внимания серия опытов по высушиванию микробов в сахарозо-желатиновой среде [18]. Так, было показано, что культуры, суспендированные в двойном количестве защитной среды по отношению к микробной массе, проявили большую выживаемость по сравнению с культурами с другими соотношениями.

Гарантией успешного сохранения микробов в высушенном состоянии является неукоснительное соблюдение всех деталей процесса лиофилизации. В то же время и условия хранения лиофилизированной культуры в значительной мере влияют на жизнеспособность бактерий. Если сухие микробы сохраняются в удовлетворительных условиях, то их отмирание происходит очень медленно. По мере снижения значимости влияния на выживаемость микробов факторы условий хранения можно расположить в следующем порядке: температура хранения, остаточная влажность препарата, суспензионная среда, газовая среда, наличие света.

Температура хранения наиболее значима из перечисленных факторов. Особенно неблагоприятной является высокая температура: чем она выше, тем хуже выживаемость микробов [12]. По данным С.Л. Степановой [23], через 48 месяцев хранения лиофилизированной культуры при температуре от 2° до 6 °С выживаемость составила 18,6–51,2%, при температуре от 18 до 22°С – 0,01–0,5%, при 37 °С – жизнеспособными остались единичные бактерии. Подобные результаты были получены и многими другими авторами. Из приведённых исследований видно, что наиболее приемлемой можно считать температуру хранения от 2° до 6 °С [19]. Высушенные музейные штаммы необходимо хранить при минусовых температурах, что позволяет производить их «освежение» не чаще 1 раза в 5–10 лет.

Степень обезвоживания микроорганизмов в различной мере влияет на жизнеспособность микробов при высушивании и хранении. С одной стороны, рядом исследователей показано, что удаление свыше 90% воды, как правило, сопровождается гибелью клеток [4]. С другой стороны, остаточная влажность более

5% губительно отражается на жизнеспособности бактерий при хранении в высушенном состоянии при обычной температуре, то есть с остаточной влажностью от 5 до 10% обеспечивается их максимальное выживание с применением высушивания, но не обеспечивается надёжной стабильности при хранении. Фактором, снижающим степень вредного влияния на бактерии вследствие высушивания до остаточной влажности 1–5%, являются защитные среды. Так, некоторые исследователи полагают [9, 23, 24], что наличие в защитной среде сахарозы обеспечивает длительное сохранение микробов даже при относительно высокой остаточной влажности препарата.

Таким образом, существует оптимальная влажность, обеспечивающая длительное хранение сухих бактерий, она зависит от вида микробов, состава защитной среды, других условий хранения. Хранение высушенных культур при температуре от 2 до 6 °С приводит к тому, что остаточная влажность имеет гораздо меньшее значение, чем в условиях комнатной температуры или при 37 °С [18]. Наиболее безопасной для жизнеспособности большинства бактерий является остаточная влажность 1–6% [3, 18, 25, 26].

Атмосфера хранения заметно влияет на жизнеспособность высушенных бактерий, особенно при повышенных температурах. При сравнительном исследовании эффективности сохранения микробов в условиях вакуума, на воздухе, в присутствии кислорода, азота, водорода, углекислого газа наилучшие результаты были получены при использовании вакуума, а наихудшие – кислорода. С.Г. Колесов [3] показал, что наличие воздуха в ампулах с высушенными культурами приводило к их полной гибели уже через 15 месяцев хранения, в то время как аналогичные культуры, хранящиеся под вакуумом сохранялись до 4-6 лет. Таким образом, надо полагать, что предпочтительнее всего хранить высушенные культуры под вакуумом. Кроме того, в литературе есть указания [4, 14] на губительность света для лиофилизированных культур и на необходимость их содержания в защищённом от света месте.

Защитные среды, применяемые при высушивании микроорганизмов

В среды для суспендирования культур, подвергающихся лиофилизации, обычно вводят вещества, уменьшающие отмирание микробов в процессе замораживания, высу-

шивания и хранения в сухом виде. Различные применяемые с этой целью вещества могут отличаться преимущественным защитным действием в отношении только отдельных неблагоприятных факторов. Учитывая этот факт, предпочтительнее применять сложные защитные среды из двух или нескольких компонентов.

На основании данных литературы [18] можно выделить несколько общих требований, предъявляемых к защитным средам, используемым при высушивании микроорганизмов.

1. Среда должна обеспечивать защитное действие на всех стадиях процесса лиофилизации.

2. Микробы, лиофилизированные в защитной среде, должны быть стабильными при хранении в широких интервалах температур.

3. После удаления свободной воды среда должна обеспечивать мелкопористую, достаточно плотную структуру. Если это условие не соблюдается, то сухой материал имеет рыхлую или порошкообразную структуру, то часть микробов будет унесена из ампул в процессе высушивания в потоке паров воды. Кроме того, материал может быть увлечён во время вскрытия ампулы, что особенно опасно при работе с патогенными микроорганизмами.

4. Защитная среда должна быть достаточно гидрофильной, чтобы обеспечить оптимальную остаточную влажность препарата.

5. Среда должны быть максимально очищены от солей, поэтому их готовят на дистиллированной воде.

6. К средам высушивания для вакцинных препаратов предъявляются дополнительные требования: они должны удовлетворять критериям фармакопеи, хорошо растворяться, обеспечивать стандартный вид таблетки, не обладать антигенностью.

Бактерии можно лиофилизировать непосредственно в среде выращивания. Именно такой способ использовали М.М. Файбич и Т.С. Тамарина [27] для изготовления живой сухой туляремийной вакцины. Однако чаще всего для лиофилизации используют специально приготовленные среды. Исходя из данных литературы [3, 4, 18, 25, 28] можно выделить 3 группы веществ, которые применяются в качестве компонентов защитных сред:

1. Коллоиды животного, растительного или минерального происхождения.
2. Растворимые вещества, такие как сахара, пептоны, аминокислоты.
3. Антиоксиданты.

Эти компоненты могут входить в состав защитных сред по отдельности либо в самых разнообразных сочетаниях.

Из коллоидных сред животного происхождения особенно широко применяют дефибринированную кровь, плазму, цельную или разведённую сыворотку крови. В связи с бактерицидным действием нативные препараты крови подвергаются предварительной инактивации на водяной бане при температуре 56 °С в течение 1 часа. Сыворотку часто используют в сочетании с углеводами и другими растворимыми веществами. Сыворотка является одной из самых лучших защитных сред, лиофилизацию в ней выдерживают даже такие чувствительные микроорганизмы, как менингококки и гонококки и сохраняются до 18 лет [5, 13, 18]. Из сложных защитных сред, содержащих сыворотку, надо отметить среду под названием «Mist. desiccans», предложенную Фраем и Гривсом [14]. Кроме сыворотки, с успехом применяются 5, 10, 25%-ные растворы отдельных фракций сывороточных белков и белков крови.

Среды, в которых в качестве коллоида вводится желатина и агар-агар, нашли особенно широкое применение при производстве сухих живых вакцин, так как лишены антигенных свойств. У нас в стране используется среда Файбича [29], которая существует в двух модификациях:

1. Сахароза 10%, желатина 1-1,5%, агар-агар 0,05-0,2%;
2. Сахароза 10%, желатина 1-1,5%.

В последующем М.М. Файбич рекомендовал добавлять в эти среды антиоксиданты: 1% аскорбиновой кислоты или 1 % тиомочевины [29]. Эти добавки увеличивают стабилизирующее действие среды и позволяют хранить высушенные культуры без создания вакуума. В качестве антиокислителей можно также использовать йодистый калий, молибденово-кислый аммоний. Для сушки бактериальных культур можно использовать чистую желатину в концентрации от 5 до 10%, добавление 0,25–0,5% аскорбиновой кислоты значительно повышает её эффективность. Недостатком сред с большим содержанием желатины является трудность смыва ими микробов с питательной среды вследствие образования гелевидной массы.

Обезжиренное снятое молоко можно использовать в качестве защитной среды, где естественным образом сочетаются коллоиды с углеводом (лактоза). На основе молока предложено несколько сложных сред [18].

Из них особого внимания заслуживает сахарозо-лактозо-молочная среда. Она показывает результаты, превосходящие сахарозо-желатиновую среду при длительном хранении высушенных культур. Хертер применял среду из сепарированного молока с 7,5% глюкозы. Учитывая хорошие защитные свойства молочного диализата, Хорнибрук в 1955 году разработал аналогичную по составу лактозо-солевую среду (среда Хорнибрука), которая проявляет хорошие защитные качества по отношению ко многим микробам.

Из других коллоидов нужно отметить поливинилпирролидон, который наиболее эффективен при высушивании бруцелл [30-33]. Также применяются среды из куриных яиц, крахмал, желудочный муцин, 1–5% гуммиарабик, гель гидрата окиси алюминия, 1% декстран, 1–5% декстрин, 1–3% альгинат натрия, 5–10% желатоза, каолин, меласса. Меласса – продукт сахарного производства – пригодна для высушивания молочнокислых бактерий, а 10%-ная взвесь каолина успешно применяется для сохранения спор *Penicillium spinulosum*. Имеются указания на использование в защитных средах такого коллоида, как полиглюкин [34].

Из растворимых веществ в защитных средах применяются сахара и продукты белкового происхождения. Углеводы обычно применяют в сочетании с коллоидами, реже в качестве простых защитных сред. Используют различные их концентрации от 1 до 10% и более. Однако эффект добавляемых в среду суспендирования углеводов неодинаков [18]. Так, глюкоза в среде высушивания обеспечивает хорошую защиту во время лиофилизации и при хранении при температуре 0 °С, но неэффективна при хранении в условиях повышенной температуры, в отличие от сахарозы. Натриевые соли глутаминовой кислоты обеспечивают бóльший протективный эффект при сохранении высушенных культур при комнатной температуре, но в то же время они мало пригодны для лиофилизации ввиду сильного пенообразования. Заслуживает внимания теория Скотта [18], согласно которой основной причиной отмирания высушенных клеток является реакция между содержащимися в клетках карбонильными группами и аминоклассами белков, сопровождающаяся денатурацией последних. Такие вещества, как глюкоза, фруктоза, рибоза, ксилоза, имеют в своём составе большое количество карбонильных групп, поэтому снижают устойчивость высушенных микробов к повышенным

температурам, а добавляемые в среду аминокислоты связывают их, обеспечивая протективное действие.

Из продуктов белкового происхождения раньше всего стали применять 1–10%-ные растворы пептона и готовые мясо-пептонные бульоны. Их эффективность, как оказалось, связана с наличием аминокислот. Источником аминокислот могут быть любые гидролизаты белка при условии максимального освобождения их от солей. К этой группе сред можно также отнести среду Бланкова [18], содержащую гидролизат молока и 7,5% сахарозы.

В заключение надо ещё раз отметить, что наиболее эффективными защитными средами являются комплексные смеси, содержащие в своём составе коллоид и растворимое вещество.

Влияние лиофилизации на жизнеспособность микроорганизмов и методы определения жизнеспособности

Бесспорным фактом является то, что в процессе лиофилизации определённая часть микроорганизмов отмирает. Этот феномен по-разному проявляется на разных этапах процесса: большая часть микробов гибнет при замораживании, меньшая – при сублимации и досушивании [13].

Жизнеспособность клеток высушенной культуры является главным показателем эффективности условий консервации. С целью определения жизнеспособности микробов можно использовать любые проявления их биологической активности: способность размножаться, проявлять ферментативную активность, изменять реакцию среды, вызывать патологические процессы или иммунные сдвиги в восприимчивом организме. Количественная оценка влияния лиофилизации на выживаемость бактерий затрудняется обычно изменением их физического состояния, связанным с агрегацией либо с распадом скоплений клеток, дающих при высеве одну колонию [35, 36].

Очень важное значение при определении процента жизнеспособных клеток имеют условия восстановления высушенных культур. На влияние скорости и способа насыщения жидкостью высушенных клеток указывают многие авторы [2, 3, 13, 18, 25, 37, 38]. Объём добавляемой воды должен быть равен весу воды, испарившейся при лиофилизации. В тех случаях, когда вес потерянной воды не-

известен, растворитель добавляют до величины исходного объёма материала. Рекомендуется воду добавлять к микробам медленно, а затем реактивируемую суспензию выдержать 30–60 мин до проведения дальнейших манипуляций. Восстановление высушенных клеток лучше всего проводить при комнатной температуре. И даже при соблюдении всех этих условий микроорганизмы, выведенные из состояния анабиоза, проявляют замедленное восстановление способности к размножению, что надо учитывать при оценке их жизнеспособности. При определении жизнеспособности клеток лиофилизированных культур наиболее точные результаты можно получить при сочетании применения нескольких методов, основанных на разносторонних проявлениях свойств микроорганизмов.

Наиболее точно количество выживших клеток определяют путём посева суспензии на чашки Петри с плотной питательной средой и последующего подсчёта колоний. Для этого из суспензии готовят ряд соответствующих разведений и в определённой дозе высевают на чашки со средой, после чего их инкубируют и подсчитывают число колоний. Этот метод применим, если при растворении лиофилизированной культуры получается гомогенная суспензия. Если в суспензии клеток имеются конгломераты, то их предварительно разбивают путём встряхивания со стерильными бусами. Выживаемость микробов при этом оценивается как процентное отношение содержания живых клеток в суспензии после лиофилизации к исходному их содержанию.

Самым простым способом количественного определения живых бактерий является оценка предельного разведения суспензии микробов, которое при посеве на жидкую питательную среду вызывает её помутнение [3, 18]. С этой целью из клеточной суспензии готовят ряд последовательных десятикратных разведений, по 1 см³ каждого вносят в определённое количество жидкой питательной среды и инкубируют в течение необходимого времени при соответствующих условиях. Предельное разведение суспензии, вызвавшее в среде помутнение вследствие роста микроорганизмов, является показателем числа жизнеспособных микробов в исследуемой культуре. Этот способ менее точен, чем подсчёт числа колоний, но незаменим в тех случаях, когда последнее невозможно, например, вследствие ползучего роста (*Proteus vulgaris*).

Широко распространён также метод определения количества живых бактерий по

степени мутности среды, в которой они развиваются, предложенный Машелем и Трефферсом [18]. Сущность этого метода заключается в том, что скорость размножения бактерий в жидкой питательной среде в течение логарифмической фазы постоянна, и, следовательно, количество размножившихся клеток полностью зависит от числа внесённых в среду живых клеток. Таким образом, в логарифмическую стадию роста по сравнительной мутности жидких сред, засеянных одинаковыми количествами испытуемой и контрольной суспензий микробов, можно судить о числе сохранившихся после высушивания жизнеспособных клеток. Степень мутности среды определяют с помощью фотоэлектрического колориметра или нефелометра. С этой целью для каждого штамма предварительно определяют соотношение между оптической плотностью жидкой питательной среды в фазе логарифмического роста бактерий и числом колоний, вырастающих при высеве этой суспензии на чашки с плотной питательной средой.

Жизнеспособность клеток можно также определить по степени проявления тех или иных ферментативных свойств, если они достаточно постоянны для данного штамма и могут быть количественно оценены. Одним из их числа является метод, предложенный Дельпи [18], сущность которого заключается в способности бактериального фермента редуктазы обесцвечивать метиленовую синь. Предварительно находят корреляцию между числом живых клеток и временем обесцвечивания метиленовой сини. Дельпи составил такую корреляцию для *Brucella abortus*. В последнее время с целью повышения точности и достоверности результатов было предложено несколько модификаций этого метода [39, 40].

В литературе есть также сведения о возможности оценки выживаемости микробов после высушивания с помощью люминесцентно-микроскопического метода с использованием флуорохрома примулина [41]. Его крупные молекулы не проникают в живые клетки, и при люминесцентно-микроскопическом исследовании обнаруживается только свечение стенки. В сильно повреждённых и мёртвых клетках краситель связывается с цитоплазмой, придавая ей ярко-зелёное свечение. Метод отличается быстротой получения результатов (порядка 30 минут). Возможно также определение числа клеток, способных к размножению с использованием предварительного подращивания в камере Пешкова с последующей

микроскопией и подсчётом образовавшихся микроколоний. Кроме того, для отдельных видов микроорганизмов предложены некоторые оригинальные методики оценки выживаемости после лиофилизации [42].

Влияние лиофилизации на структуру и свойства микроорганизмов

Сохранение жизнеспособности микробов не является единственным критерием удовлетворительной их консервации. Процесс лиофилизации и последующее хранение не должны отражаться на структуре и свойствах микроорганизмов, ради которых собственно и предпринимается консервация.

Исследования о влиянии лиофилизации на структуру микробной клетки не столь многочисленны, однако практически все они указывают на ведущую роль повреждения мембран клеток [3, 18, 38, 43, 44]. Подобные данные приводились ещё Ватанабэ и Уэббом [3]. Они отмечали нарушение проницаемости мембран клеток для ряда соединений без утраты жизнеспособности микробов и связывали это с обратимыми структурными перестройками в мембране. Функциональный характер подобных изменений подтверждается и другими исследователями [43]. А.И. Раппопорт и М.Е. Беккер [38, 42] выявили обратимые изменения заряда мембраны, формы и размеров клеток дрожжей при их обезвоживании, причем полное восстановление этих параметров происходило только после длительной реактивации клеток в полноценной питательной среде. Из прочих обратимых изменений клеток после высушивания нужно отметить нарушения ферментативной активности, обмена веществ, биосинтетических процессов.

К настоящему времени накоплен огромный опыт применения метода лиофилизации для консервации микробных культур. Хотя в целом он рассматривается как метод, обеспечивающий стабильность биологических свойств микроорганизмов, имеются отдельные наблюдения об отрицательном влиянии замораживания-высушивания на эти свойства [45–49]. Прежде всего, следует допустить, что факторы, которые приводят к потере жизнеспособности клеток, могут привести и к нарушениям функций, не доводя до гибели бактерий [50, 51]. В литературе [3, 13,] есть данные, что после консервации при помощи лиофилизации отмечалось появление слизистых колоний у стрептококков, шероховатых

колоний у сальмонелл, изменение антигенной структуры и ферментативной активности. Большинство признаков восстанавливалось после нескольких пассажей на питательных средах. Есть данные о корреляции интенсивности образования свободных радикалов и отмиранием микроорганизмов [52]. Существуют указания на то, что в процессе высушивания в клетке разрушается до 26–45% РНК [53].

Таким образом, многолетняя практика подтверждает непревзойдённость лиофилизации как способа длительного поддержания живых микробов с неизменными свойствами [54].

Литература

- Охалкина В.Ю., Шабалин Б.А. Методы поддержания микробных культур. Часть 1. Криоконсервация // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 1. С. 18–26.
- Смит О. Влияние низких температур на живые ткани и клетки. В кн.: Применение замораживания-высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. Москва. 1956. 432 с.
- Никитин Е.Е., Звягин И.В. Замораживание и высушивание биологических препаратов. М.: Колос, 1979. 337 с.
- Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М.: Наука, 1967. 150 с.
- Maintenance of Microorganisms. A manual of Laboratory Methods / Ed. by В.Е. Kirsop and J.J. Snell. London: Academic Press, 1984. 207 p.
- Кудрявцев В.И. Коллекции типовых культур микроорганизмов // Микробиология. 1965. Т. 34. Вып. 3. С. 556–562.
- Тутова Э.Г., Куц П.С. Сушка продуктов микробиологического производства. М.: Агропромиздат, 1987. 303 с.
- Лысков М.В. Сушка распылением. М.: Пищепромиздат, 1955. 212 с.
- Сушка биологических материалов, вопросы механизации и автоматизации // Труды Московского НИИ эпидемиологии, микробиологии, гигиены. Выпуск 7. М. 1960. 173 с.
- Герна Р. Хранение микроорганизмов // Методы общей бактериологии / Под ред. Ф. Герхардта и др. Москва. 1983. Т. 1. 210 с.
- Белоус А.М., Цветков И.В. Научные основы сублимационного консервирования. Киев: Наукова думка, 1985. 345 с.
- Гривс Р. Теоретические основы процесса высушивания путём сублимации в вакууме // Применение замораживания-высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. Москва. 1956. 432 с.
- Колесов С.Г. Высушивание микроорганизмов и биопрепаратов. М.: Сельхозгиз, 1952. 272 с.
- Фрай Р. Консервирование бактерий // Применение замораживания-высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. Москва. 1956. 432 с.
- Аркадьева З.А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных способах хранения // Биологические науки. 1983. № 4. С. 93–95.
- Беккер М.Е. Обезвоживание микробной массы. Рига: Зинатне, 1967. 234 с.
- Steel K.J., Ross H.E. Survival of freeze-dried bacterial cultures // Journal of Applied Bacteriology. 1963. V. 26. P. 370–375.
- Бланков Б.И., Клебанов Д.Я. Применение лиофилизации в микробиологии. Москва. 1961. 262 с.
- Карасевич Э.К., Платонов А.В., Волкова Н.Т. и др. Хранение в высушенном состоянии смешанной культуры пропионовых и ацидофильных бактерий при разных температурных режимах // Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 3. С. 446–449.
- Емцева Т.В., Лаврова Л.Н., Константинова Н.Д. Влияние условий предварительного культивирования бактерий на их устойчивость и структуру клетки при замораживании и лиофилизации // Микробиология. 1991. Т. 60. Вып. 5. С. 879–881.
- Долинов К.Е. Основы технологии сухих биопрепаратов. М.: Медицина, 1969. 228 с.
- Булах О.С., Мурватова И.А. Влияние условий и длительности хранения на биологические свойства чумного микроба // Проблемы особо опасных инфекций. Саратов. 1971. Вып. 4. С. 53–57.
- Степанова О.Л., Лифанова Н.И. Получение сухой сорбированной паратифозной В вакцины и её свойства // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1965. № 7. С. 48–52.
- Эшвуд-Смит М. Консервирование микроорганизмов замораживанием, сушкой из замороженного состояния и обезвоживанием в эксикаторе. М.: Наука, 1982. 36 с.
- Беккет Л. Остаточная влажность в материале, обработанном методом замораживания-высушивания и её определение // Применение замораживания-высушивания в биологии / Под ред. Р. Харриса. Москва, 1956. 432 с.
- Kusay R.G.P. Maintenance of Microorganisms // Process. Biochem. 1972. V. 7. № 7. P. 24–26.
- Файбич М.М., Тамарина Т.С. Туляремийная сухая вакцина НИИЭГ Красной Армии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1946. № 7. С. 34–38.
- Тинкер А.И., Печникова И.В. Защитный эффект различных компонентов, входящих в состав сред высушивания // Особо опасные инфекции на Кавказе: Матер. науч. конф. Ставрополь. 1970. С. 65–68.

29. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1968. № 2. С. 59–66.
30. Захлебная О.В., Лаукнер И.В. Применение поливинилпирролидона в качестве стабилизатора при лиофилизации бруцелл // Лабораторное дело. 1991. № 2. С. 62–64.
31. Мальцев В.Н., Стрельников В.А., Федоровский Л.Л. Влияние поливинилпирролидона на микробную клетку // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987. № 4. С. 9–11
32. Галаев Ю.В., Фролов В.И., Кирш Ю.Э. Влияние полимеров на биологические свойства микроорганизмов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1987. № 4. С. 110–111.
33. Семчева Н.С., Горюнова А.Г. О стабилизаторах для высушивания и хранения бруцеллёзных вакцин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1960. № 5. С. 98–99.
34. Добрынин В.П., Артемьев А.С., Шабалин Б.А. и др. Лиофильное обезвоживание как способ сохранения музейных культур легионеллёза // Лабораторное дело. 1992. № 11-12. С. 73–74.
35. Равич-Биргер Е.Д. О восстановлении культур микроорганизмов из высушенного состояния // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1960. № 3. С. 75–79.
36. Воронкевич И.В., Самосудова Е.В. Условия восстановления сухих культур фитопатогенных бактерий // Общая биохимия. 1965. Т. 26. № 5. С. 612–614.
37. Трофименко А.Ф., Кузина О.Н., Беленикина З.В., Чистякова Л.Г., Кобелев В.С. Механизм метаболической гибели клеток *E. coli* после замораживания-оттаивания // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1986. № 2. С. 30–34.
38. Раппопорт А.И., Берестенникова Н.Д., Яновский К.А., Бекер М.Е. Об изменении формы и размеров дрожжевых клеток при их обезвоживании и последующей реактивации // Микробиология. 1986. Т. 55. Вып. 5. С. 881–882.
39. Успанова С.А., Раюшкин Б.В. Способ пересылки и хранения патогенных микробов и инфицированных материалов // Лабораторное дело. 1992. № 3-4. С. 10–11.
40. Скляр О.Д. Определение количества живых микробных клеток в противобруцеллёзных вакцинах // Ветеринария. 1998. № 9. С. 19–22.
41. Раппопорт А.И., Мейсель М.Н. О люминесцентно-микроскопическом определении выживаемости дрожжевых организмов после обезвоживания // Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 1. С. 66–68.
42. Кошелев А.В., Нестеров А.И. Ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур метанотрофных бактерий // Микробиология. 1988. Т. 57. Вып. 2. С. 492–494.
43. Раппопорт А.И., Бекер М.Е. Изменение поверхностного заряда дрожжевых клеток при их обезвоживании и регидратации // Микробиология. 1985. Т. 54. Вып. 3. С. 450–453.
44. Тимошин А.А., Раппопорт А.И., Бекер М.Е. Влияние высушивания на термоиндуцированные структурные перестройки цитоплазматической мембраны клеток дрожжей // Микробиология. 1990. Т. 59. Вып. 2. С. 679–682.
45. Ермоленко З.М., Гречищев М.Е., Холоденко В.П. Жизнеспособность *Y.pseudotuberculosis* при хранении в лиофилизированном состоянии // Биотехнология. 1991. № 6. С. 26–27.
46. Кругликов В.Д., Кадетов В.В., Мазрухо Б.Л. и др. Биологическая активность штамма *Lactobacillus acidophilus* ВКМ В-2020 при хранении в лиофилизированном и криоконсервированном виде // Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы: Матер. науч.-практич. конф. Киров. 2001. С. 38–39.
47. Нестеров А.И., Кошелев А.В., Гальченко В.Ф. и др. Выживаемость облигатных метанотрофных бактерий при лиофилизации и последующем хранении // Микробиология. Т. 55. Вып. 1. С. 271–273.
48. Кузьмиченок А.П., Мельниченко В.И. Влияние сроков хранения музейных культур на их фенотипическую и генотипическую изменчивость // Основные научные исследования по проблеме туберкулёза и бруцеллёза сельскохозяйственных животных, профилактика и организация мероприятий по ликвидации болезней в регионе Сибири: Тез. докл. науч.-практ. конф. Новосибирск. 1995. С. 92–94.
49. Печникова И.В. Влияние состава среды высушивания на выживаемость бактерий в сухой вакцине // Микробиология и иммунология особо опасных инфекций. Саратов. 1964. Вып. 2. С. 283–287.
50. Иванов В.Н., Раппопорт А.И., Пиндрус А.А., Саулите Л.А., Шифрук Т.А. Фазоспецифичность повреждений и репарации повреждённых клеток дрожжей при обезвоживании-регидратации и замораживании-оттаивании // Микробиология. 1988. Т. 57. Вып. 3. С. 341–344.
51. Вейтыня Э.Ю., Саулите Л.А., Раппопорт А.И., Беккер М.Е. Липидные включения в клетках и их изменения при обезвоживании и реактивации дрожжевых организмов // Микробиология. 1986. Т. 55. Вып. 3. С. 116.
52. Heckly R.I., Dimnick R.L., Windle I.I. Free radical formation and survival of lyophilized microorganisms // Journal of Bacteriology. 1963. V. 85. № 5. P. 961–966.
53. Раппопорт А.И., Бекер М.Е. О разрушении рибонуклеиновых кислот в дрожжевых клетках при их обезвоживании // Микробиология. 1986. Т. 55. Вып. 5. С. 855–857.
54. Кузлетская М.Б. Результат хранения лиофилизированных культур микроорганизмов в течение 25 лет // Микробиология. 1988. Т. 57. Вып. 4. С. 488.