

УДК 579.253

О. Л. Рахімова¹, асист., **І. В. Фабіянська**¹, асист., **А. Є. Солоденко**², ст. наук. співроб., канд. біол. наук, **І. А. Балашова**², наук. співроб., канд. біол. наук, **А. В. Саналатій**², асп., **В. О. Іваниця**¹, д-р біол. наук, проф., завідувач кафедри

¹ Одеський національний університет ім. І. І., Мечникова, каф. мікробіології і вірусології, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

² Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН та МОН України, Овідіопольська дор., 3, Одеса, 65036, Україна

ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ І БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ КОЛЕКЦІЙНИХ ШТАМІВ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ РІЗНИХ СПОСОБАХ ЗБЕРЕЖЕННЯ

Вивчена життєздатність та фізіолого-біохімічні властивості штамів *E. coli* при зберіганні методами ліофілізації та субкультивування на середовищах МПА та Дорсе.

Найкращі результати по зберіганню життєздатності всіх вивчених штамів були отримані методом субкультивування на середовищі Дорсе. Показано, що діагностичні ознаки збереглися незмінними на протязі одного року при збереженні штамів усіма дослідженими методами. Відсоток збереження генетичних маркерів був найвищий при використанні для збереження методу субкультивування на середовищі Дорсе.

Ключові слова: колекція мікроорганізмів, *Escherichia coli*, плазміди.

Основною метою колекційної роботи є гарантоване збереження штамів фонду в аутентичному та життєздатному стані. З літератури [1, 2] відомо, що значні труднощі виникають за збереження грамнегативних, не утворюючих форм спокою, бактерій. Ще більші труднощі виникають тоді, коли такі штами є генетично зміненими, тобто містять гібридні плазміди. Ці штами генетично нестабільні і можуть втрачати чужорідний реплікон [3].

Саме до такої групи належать штами *E. coli*, що зберігаються в колекції мікроорганізмів кафедри мікробіології. Вони представлені типовим штамом, використання якого у всіх процедурах ідентифікації знову виділених штамів *E. coli* є обов'язковим, референс-штамом для визначення впливу різних антимікробних речовин, рядом штамів з генетичними маркерами стійкості до антибіотиків, а також декількома клінічними штамми. Про незамінність цих штамів у навчальній, науково-експериментальній роботі кафедри, біологічного факультету та інших зацікавлених організацій, у тому числі клінічних лабораторій, свідчить висока частота офіційних звертань щодо одержання цих штамів з колекції.

Виходячи з вищевикладеного, метою роботи було з'ясування ефективності збереження життєздатності і біологічних властивостей колекційних культур *E. coli*, що зберігаються методами ліофілізації та субкультивування на поживних середовищах МПА і Дорсе.

Для досягнення мети були поставлені наступні задачі:

- вивчити культуральні, тинкторіальні, фізіологічні і біохімічні властивості штамів до початку та через один рік зберігання;
- прямими і непрямими методами визначити наявність плазмід, що містять ці бактерії, до початку зберігання та через рік.

Матеріали і методи

Об'єктом дослідження були штами *Escherichia coli* (R-23, R-144, R-621, RTS, K-12, PP-1220, NM-522, ОГУ-168, ОГУ-169) з колекції кафедри мікробіології ОНУ. Із усіма штамми проводили тести за традиційними для групи ентеробактерій методиками [4, 5].

Про наявність у штамів генетичних маркерів судили як за непрямою ознакою — рівнем антибіотикорезистентності, так і за допомогою експрес-методу вилучення плазмідної ДНК [6]. Біологічні рівні стійкості вивчених штамів до бензилпеніциліну, ампіциліну, тетрацикліну, канаміцину, стрептоміцину, поліміксину і левоміцетину визначали методом розведення в твердому поживному середовищі з використанням штам-реплікатора. Діапазон досліджених концентрацій був від 1024 мкг/мл з наступним дворазовим зменшенням до 1 мкг/мл. Для кожного штаму знаходили, таким чином, мінімальну інгібуючу ріст концентрацію (МІК), за яку приймали ту найменшу концентрацію антибіотика, за якої вже не спостерігали виразного росту штаму. Посіви культивували в термостаті при температурі 37 ± 1 °С. Усі досліді проводили в трьох повтореннях.

Для ряду стійких до антибіотиків штамів проведено виділення плазмідної ДНК. Для цього нічну культуру осаджували центрифугуванням при 10–11 тис. об/хв протягом двох хвилин на центрифугі Ерпендорф. Підсушений осад ресуспендували у 250 мкл лізуючого буферу (сахароза 8 %, тритон 0,5 %, ЕДТА 25 мМ, ТРИС 10 мМ) з додаванням 125 мкл 0,3 М NaOH. Інкубували при 70 °С протягом 30 хвилин, струшуючи проби кожні 10 хвилин. Потім додавали 125 мкл 8 М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, струшували і тримали протягом однієї години на льоду. Далі центрифугували 10 хвилин (10 тис. об/хв). Надосадкову рідину переносили у чисті епендорфи та додавали у два рази більший об'єм 96 % етилового спирту. Суміш тримали на холоді (-4 °С) протягом 15–20 хвилин. Центрифугували 10 хвилин (10 тис. об/хв), потім осад промивали 100 мкл 70 % етанолу і центрифугували знову 10 хвилин (10 тис. об/хв). Осад просушували і розчиняли в ТЕ (10 мМ трис-HCl, рН 8,0; 1 мМ ЕДТА-Na₃).

Результати та обговорення

Випробовували ряд доступних способів консервації для з'ясування впливу цих способів на властивості штамів: субкультивування на МПА,

на середовищі Дорсе (використовується для збереження представників групи ентеробактерій), ліофілізацію. Насамперед був оцінений вплив цих способів консервації на життєздатність штамів (табл. 1).

Таблиця 1

Життєздатність штамів *E. coli* через 12 місяців збереження різними методами

Штам <i>E. coli</i>	Метод консервування (частота консервувань за період дослідження)				
	Субкультивування на МПА, (4)	Субкультивування на Дорсе, (2)	Ліофілізація, (1)		
			До ліофілізації	Одразу після ліофілізації	Через рік
R144	++++	++++	++++	+	+
R621	++++	++++	++++	+	+
R23	++++	++++	++++	+	+
RTS	++++	++++	++++	±	±
K12	++++	++++	++++	±	±
NM522	++++	++++	++++	+	+
PP1220	++++	++++	++++	+	+
ОГУ169	++++	++++	++++	+	+
ОГУ168	++++	++++	++++	+	+

* +++++ — відмінна життєздатність; +++ — добра життєздатність; ++ — задовільна життєздатність; + — незадовільна життєздатність; ± — погана життєздатність; - — втрата життєздатності

Зберігання методом субкультивування на МПА, як і на Дорсе, дозволило зберегти відмінну життєздатність штамів. Однак, пересівів за збереження на Дорсе за період експерименту було потрібно вдвоє менше, ніж при культивуванні на МПА. При збереженні культур методом ліофілізації, встановлено що сам процес ліофілізації негативно вплинув на життєздатність клітин, що привело до значного зниження їх кількості. Однак, за рік зберігання цим способом кількість життєздатних клітин не зменшилася.

Нами оцінено фізіолого-біохімічні властивості штамів і їх чутливість до антибіотиків через рік після початку експерименту. У таблиці 2 наведено результати цього дослідження.

Показано, що зберігання способом субкультивування на МПА не спричинило істотних змін властивостей штамів. Щоправда, деякі властивості стали виявлятися дещо слабкіше. Однак, діагностичні ознаки, а саме реакція Фогеса-Проскауера, утворення сірководню, уреазна, каталазна, оксидазна активності та інші не зазнали істотних змін.

Слід зазначити, що спосіб субкультивування на МПА забезпечив зберігання життєздатності усіх штамів на високому рівні. Вона була оцінена за запропонованою шкалою як "відмінна" (табл. 1). Однак, стійкість до антибіотиків після зберігання штамів цим методом протягом року була збережена на тому ж рівні, що і до початку експерименту, але не всіма штамми.

Таблиця 2

**Відсоток збереження властивостей штамми при консервуванні
різними методами**

Штам <i>E. coli</i>	Метод консервування (частота консервувань за період дослідження)			
	Субкультивування на МПА, (4)	Субкультивування на Дорсе, (2)	Ліофілізація, (1)	
			Одразу після ліофілізації	Через один рік
R144	95,0	99,9	95,0	95,0
R621	92,0	99,7	95,0	95,0
R23	93,0	99,0	95,0	95,0
RTS	90,0	99,0	92,0	91,0
K12	90,0	90,0	90,0	90,0
NM522	92,0	99,3	97,0	95,0
PP1220	96,0	99,4	97,0	95,0
ОГУ169	93,0	99,1	93,0	92,0
ОГУ168	92,0	99,0	96,0	95,0

У штаму K12 поріг стійкості відразу до двох антибіотиків — ампіциліну (з 128 до 32 мкг/мл) і стрептоміцину (з 256 до 32 мкг/мл) — значно знизився, в той час як чутливість інших штамів до досліджуваних антибіотиків не зазнала істотних змін.

При зберіганні штамів *E. coli* субкультивуванням на середовищі Дорсе (два пересіви) відсоток властивостей, що ослаблювалися за збереження, був ще нижчим, ніж при збереженні на МПА (4 пересіви). Можливо, це можна пояснити як консервуючою якістю самого середовища, так і кількістю проведених пересівів під час зберігання. Значних змін досліджуваних властивостей, а саме їх появи або зникнення, як і при збереженні на МПА, не було. Життєздатність штамів була оцінена на "відмінно". Стійкість штамів кишкової палички до терапевтичних доз антибіотиків після зберігання на середовищі Дорсе не була знижена в жодному випадку.

Як уже зазначалося, процес ліофілізації негативно впливав на життєздатність клітин (кількість життєздатних клітин одразу після ліофілізації значно зменшувалася). Однак через рік після ліофілізації життєздатність залишалася на тому ж рівні, що й відразу після ліофілізації. Зберігання зазначеним методом не привело до зміни діагностичних ознак, хоч ступінь вираження деяких властивостей був значно меншим. Після процесу ліофілізації суттєво змінювалась резистентність штамів *E. coli* до антибіотиків. Стійкість до концентрацій антибіотиків, що були вищими терапевтичних доз, зменшувалася саме до цих концентрацій.

Незважаючи на те, що всі застосовані способи сприяли збереженню високого рівня життєздатності клітин, всі вони не позбавлені недоліків. Так, процес ліофілізації негативно впливав на життєздатність та аутентичність бактерій. Субкультивування на МПА і Дорсе не впливало на життєздатність і аутентичність клітин, але більш часті переконсервування вимагають додаткових витрат живильних середовищ та підвищеної витрати часу і трудоемкості процесу на одиницю збереження. Перевірка морфологічних, культуральних, фізіологічних і біохімічних властивостей штампів після зберігання зазначеними способами показала, що ці властивості не були втрачені. Зате генетична стабільність (збереження генетичних маркерів штамми) варіювала в залежності від способу збереження штаму.

Втрата стійкості до антибіотиків після консервації є непрямомою ознакою втрати плазмід. В зв'язку з цим було проведено експрес-вилучення плазмідної ДНК зі штампів К-12 (єдиний штам, що втратив стійкість до антибіотиків через рік після культивування на МПА) і RTS після одного року збереження у ліофілізованому стані, а також після року підтримки субкультивуванням на середовищі Дорсе і МПА (рис. 1). Отримані у цьому досліді результати підтвердили, що штам К-12 втратив плазмідні як після збереження за допомогою ліофілізації, так і при субкультивуванні на МПА. Штам RTS втратив плазмідні лише при збереженні за допомогою ліофілізації. За субкультивування на Дорсе плазмідні зберігалися у досліджених штампів протягом всього періоду дослідження.

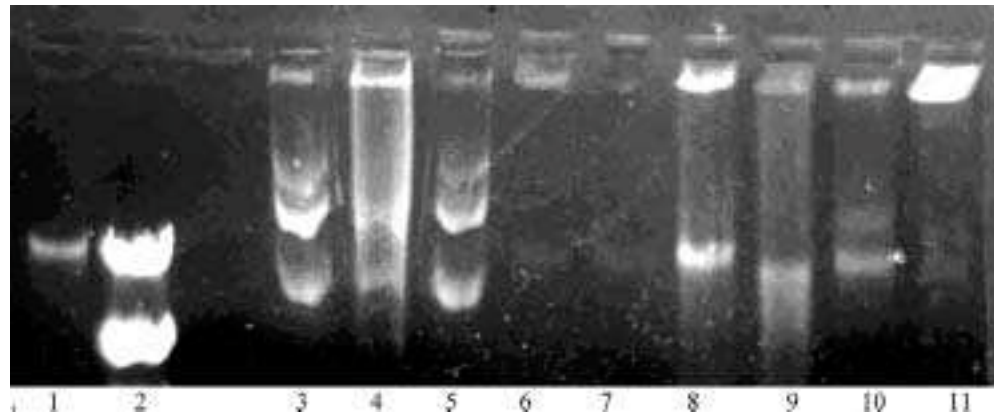


Рис. 1. Електрофореграма плазмідної ДНК з колекційних штампів: 1 — зразок рослинної ДНК; 2 — ДНК фага λ /Pst I: розмір верхнього фрагменту — 11500 п. о., розмір нижнього фрагменту — 5000–4500 п. о.; 3 — плазмідна рUC (об'єм проби 10 мкл); 4 — плазмідна рUC (об'єм проби 15 мкл); 5 — плазмідна рUC (об'єм проби 5 мкл); 6 — *E. coli* RTS після ліофілізації; 7 — *E. coli* К-12 після ліофілізації; 8 — *E. coli* RTS після субкультивування на середовищі Дорсе; 9 — *E. coli* К12 після субкультивування на середовищі Дорсе; 10 — *E. coli* RTS після субкультивування на середовищі МПА; 11 — *E. coli* К12 після субкультивування на середовищі МПА.

Таким чином, найменш придатним методом для зберігання генетично маркованих штамів *E. coli* є метод ліофілізації, який не тільки веде до втрати життєздатності, але й сприяє елімінації плазмід антибіотикорезистентності з геномів клітин. Найбільш придатним для збереження штамів в умовах експерименту є субкультивування на поживному середовищі Дорсе.

Висновки

1. Культуральні, тинкторіальні, фізіолого-біохімічні властивості колекційних культур після зберігання не втрачаються.
2. Оптимальним для збереження даних штамів за критерієм якість / матеріальні затрати є метод консервації ентеробактерій на спеціальному середовищі Дорсе.

Література

1. Афиногенова А. В., Коновалова С. М., Ламбина В. А. Утрата признака видовой моноспецифичности экзопаразитическими бактериями рода *Microvibrio* // Микробиология. — 1986. — Т. 55. — Вып. 3. — С. 487–489.
2. Малхасян А. М. Стабильность характерных свойств спорообразующих бактерий, сохраняемых под вазелиновым маслом. Ереван, 1987. — Деп. В ВИНТИ 05.01.87., № 47 — В87.
3. Трофименко А. Ф., Кузина О. Н., Беленкина З. В., Чистякова Л. Г., Кобелева В. С. Механизм метаболической гибели клеток *Escherichia coli* после замораживания-оттаивания // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 1986. — № 2. — С. 30–34.
4. Биргер М. О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. — М.: Медицина, 1982. — 464 с.
5. Ефремова С. А. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. — М.: Медицина, 1981. — 207 с.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. — М.: Мир, 1984. — 315 с.

Е. Л. Рахимова¹, И. В. Фабиянская¹, А. Е. Солоденко²,
И. А. Балашова², А. В. Саналатий², В. А. Иванца¹

¹ Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
каф. микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

² Южный биотехнологический центр в растениеводстве УААН
и МОН Украины,
Овидиопольская дор., 3, Одесса, 65036, Украина

ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* ПРИ РАЗНЫХ СПОСОБАХ ХРАНЕНИЯ

Резюме

Исследована жизнеспособность и физиолого-биохимические свойства штаммов *E. coli* при хранении методами лиофилизации и субкультивирования на питательных средах МПА и Дорсе.

Наилучшие результаты по сохранению жизнеспособности всех исследованных штаммов были получены методом субкультивирования на среде Дорсе. Показано, что диагностические признаки сохранились неизменными на протяжении одного года при хранении всеми исследованными способами. Процент сохранения генетических маркеров был наибольшим при использовании для хранения метода субкультивирования на среде Дорсе.

Ключевые слова: коллекция микроорганизмов, *Escherichia coli*, плазмиды.

**O. L. Rakhimova¹, I. V. Fabijanska¹, A. J. Solodenko²,
I. A. Balashova², A. V. Sanalatii², V. O. Ivanitsa¹**

¹Odessa National University, Department of Microbiology and Virology,
Dvoryanskaya 2, Odessa 65026, Ukraine

²South plant biotechnology Center UAAS,
Ovidiopolskaya Dor. 3, Odessa, 65036 Ukraine

VIABILITY AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS UNDER DIFFERENT STORAGE METHODS

Summary

The viability and biological characteristics of *Escherichia coli* strains were studied while storing by lyophilization and subcultivation on Nutrient agar and Dorset medium.

The best viability has been obtained by subcultivation on Dorset medium for all strains. It was shown that the diagnostic characteristics were preserved invariable by all studied methods over one year. The highest percent of genetic marker preservation was got after subcultivation on Dorset medium.

Keywords: Collection of microorganisms, *Escherichia coli*, plasmids.