

на правах рукописи

КАДНИКОВА Наталия Георгиевна

ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ НА БИФИДОБАКТЕРИИ

02.03.22 - криобиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Харьков - 1992

577, 5.093

57.086.13

Работа выполнена в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН Украины

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор А. А. Пуцаева

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор В. И. Луговой

доктор медицинских наук,
профессор И. Л. Дикий

Ведущая организация: Государственный научно-иссле-
дательский институт Генетика, Москва

ЛННБ України ім. В. Стефаника



00816491 (T)

Защита диссертации состоится "20" октябре 1992 г.
в "13³⁰" часов на заседании специализированного совета
Д. 016. 60. 01 при Институте проблем криобиологии и криомеди-
цины АН Украины (310015; Харьков, ул. Переяславская, 23).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института
проблем криобиологии и криомедицины АН Украины

Автореферат разослан "20" сентябре 1992 г.

Ученый секретарь
специализированного совета,
доктор медицинских наук

А. Н. Гольцев



Актуальность проблемы. В настоящее время в медицине и ветеринарии проводятся интенсивные исследования по разработке препаратов в состав которых входят представители нормальной микрофлоры кишечника человека и животных, проявляющей антагонистическую активность по отношению к патогенным и условно патогенным микроорганизмам, витаминообразующую способность и ферментативную функции (Г. И. Гончарова, 1982, М. Cooperstock, 1981). Одним из основных препаратов, применяемых для профилактики и лечения дисбактериозов у человека и животных, являются препараты с использованием бифидобактерий (М. Мицуока, 1987; С. Мицухаси, 1988).

В связи с интенсивным использованием в ряде отраслей народного хозяйства и медицине бифидобактерий важную роль приобретает разработка и создание эффективных способов хранения посевного материала в течении длительного времени с сохранением жизнеспособности и биологических свойств культур.

Генетическую стабильность и сохранение жизнеспособности многих микроорганизмов на протяжении ряда лет наиболее эффективно обеспечивает криоконсервирование. Несмотря на достигнутые успехи, проблема сохранения биологической полноценности криоконсервированных бактерий является актуальной и в настоящее время, так как различные систематические группы и даже отдельные штаммы микроорганизмов обнаруживают неодинаковую устойчивость к низкотемпературному воздействию (А. А. Пуцаева, 1987; Р. Н. Calcott, 1986; R. J. Heckly, 1978). Сообщения о влиянии низких температур на анаэробные микроорганизмы единичны.

Успешное решение вопросов криоконсервирования микроорганизмов тесно связано с выяснением механизмов криповреждения, криозащиты и репарации криповреждений биологических объектов. Лишь знание этих механизмов позволит разработать эффективные технологии консервирования биологических объектов.

Целью настоящей работы было изучение морфофункциональных и биохимических свойств криоконсервированных бифидобактерий, влияние физико-химических факторов, возникающих при замораживании-отогреве, а также разработка и научное обоснование метода криоконсервирования бифидобактерий.

Задачи исследования:

- изучить морфофункциональные свойства бифидобактерий после замораживания-отогрева с различными скоростями;
- изучить влияние замораживания-отогрева на сохранность би-

фидобактерий в зависимости от состава суспензионных сред, концентрации бактерий в замораживаемой суспензии, фазы роста культуры;

-выяснить влияние физико-химических факторов (холодового шока, pH, гипо- и гипертонических растворов NaCl), возникающих при криоконсервировании на колониеобразующую способность бифидобактерий;

-изучить влияние температуры хранения на колониеобразующую способность бифидобактерий (гипотермия и -196°C).

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение сохранности анаэробных форм бактериальных клеток рода *Bifidobacterium*, переведенных в состояние глубокого холодового анабиоза.

Показано, что криоустойчивость бифидобактерий изученных видов различна и зависит от условий криоконсервирования.

Установлена зависимость колониеобразующей способности бифидобактерий при криоконсервировании от скорости охлаждения, условий отогрева, состава суспензионной среды и степени анаэробизма, фазы роста культуры и исходной концентрации клеток в замораживаемой суспензии.

Впервые изучено влияние физико-химических факторов, возникающих при криоконсервировании (pH, холодовый и осмотический шоки), на колониеобразующую способность нативных бифидобактерий и после их замораживания-отогрева с целью выяснения их роли в возникновении летальных и нелетальных повреждений анаэробных клеток. При этом показано, что значение кислотности среды в значительной степени влияет на ход репаративных процессов.

Практическая и теоретическая значимость работы. Разработан способ криоконсервирования бифидобактерий различных таксономических групп, с учетом особенностей их биохимических и морфологических характеристик, который обеспечивает высокую сохранность исходных свойств клеток. Показана возможность применения криоконсервированных бифидобактерий на этапах производства биопрепаратов для медицины и ветеринарии. Полученные данные представляют теоретический интерес, так как способствуют выяснению некоторых механизмов криповреждения и криозащиты анаэробных бактериальных клеток.

Диссертация выполнена в рамках исследований, проводимых в ИПКК АН Украины по планам НИР, общесоюзной научно-технической

программы "Разработать и внедрить технологические процессы криоконсервирования и сублимации микроорганизмов, используемых в производстве биологически активных веществ, кормовых антибиотиков, а также штаммов, применяемых в пищевой и медицинской промышленности" (код программный 0.69.14), комплексной проблемы АН СССР "Микробиология" (код 2.28.9), программы АН СССР, АМН СССР "Фундаментальные науки - медицине" (код 02.08).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Степень сохранности биологических свойств бифидобактерий зависит от скоростей охлаждения, условий отогрева, состава и степени анаэробиза суспензионных сред, фазы роста культуры, исходной концентрации клеток в замораживаемой среде.

2. Основное значение среди физико-химических факторов, способствующих низкотемпературное консервирование, в повреждении клеток бифидобактерий при замораживании-отогреве принадлежит кислотности среды.

3. При хранении колониеобразующая способность бифидобактерий в охлажденной суспензии зависит от температуры и срока их хранения.

4. Разработанные условия криоконсервирования обеспечивают сохранность исходных биологических свойств бифидобактерий. Криоконсервированные по разработанным режимам бифидобактерии могут быть использованы в производстве лечебно-профилактических биопрепаратов.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на конференции молодых ученых-медиков "Современные вопросы вирусологии, микробиологии и иммунологии" (Одесса, 1987), III Всесоюзной конференции по научным основам технологии промышленного производства ветеринарных препаратов, (Москва, 1987), на конференции молодых ученых ИПКиК АН УССР (Харьков, 1989), VII съезде Украинского микробиологического общества (Черновцы, 1989).

Публикация материалов исследования. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения, выводов, списка используемой литературы. Диссертация содержит 32 рисунка и 12 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 183

наименования работ отечественных и иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Объектом исследования были штаммы бифидобактерий:

Bifidobacterium bifidum 1, *Bifidobacterium longum* 379 M, *Bifidobacterium adolescentis* MC-42 (МНИИМЭ Москва). Для изучения криоконсервирования концентратов микроорганизмов использовали дополнительно дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Л 1 - др., *Streptococcus diacetylactis* 728 (ВНИИХП Ленинград). Бифидобактерии выращивали в казеиново-дрожжевой среде КД-5 (Е. И. Квасников, 1975) без доступа воздуха при $(37 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Время культивирования для *B. longum* 379 M и *B. adolescentis* MC-42 составляло 24 часа, а для *B. bifidum* 1 - 48 часов. В исследованиях использовали вторую генерацию бактерий. Питательные среды и растворы перед каждым экспериментом флокулировали азотом.

Дрожжевые клетки *S. cerevisiae* Л - 1 др. выращивали в условиях аэрации в течение 20 - 24 часов при температуре 30°C на жидкой питательной среде УЕРД (G. J. Morris, 1988).

Молочнокислые бактерии *S. diacetylactis* 728 культивировали в стандартных условиях (Е. И. Квасников, 1975).

О количестве жизнеспособных бактерий в суспензиях судили по числу макроколоний, выросших в питательной среде.

Изучение динамики развития периодической культуры бифидобактерий осуществляли в течении 52 часов. Бактериальную массу при отборе проб флокулировали азотом.

Константу скорости роста (V) и время генерации (g) рассчитывали по формуле Р. Герна (1983).

Активность кислотообразования определяли измерением значения рН жидкой казеиново-дрожжевой среды по мере роста популяции бифидобактерий.

Определение антибиотикоустойчивости бифидобактерий проводили по методу J. A. Garcia-Rodriguez (1980).

Интенсивность синтеза ДНК определяли путем регистрации скорости включения бифидобактериями ^3H -тимидина по методу Kennel D. (1979) на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Beckman SL-7800".

Степень сохранности поверхностных структур и размеров бифидобактерий после замораживания-отогрева изучали с помощью растровой электронной микроскопии (MSM-5 "Акаси Сейсакушо Лтд",

Япония). Препараты для электронной растровой микроскопии фиксировали 2% глутаровым альдегидом при температуре 20°C в течении 1 часа, обезвоживали в спиртах нарастающей концентрации и напыляли серебром (G. Zani, A. Severi, 1982).

Ультраструктуру клеток изучали на электронном микроскопе JEM-100-CX-11 (Япония). Подготовку проб осуществляли по методу A. Ryter, E. Z. Kellenberger, 1984).

Чувствительность бифидобактерий к физико-химическим факторам, которые, предположительно, вызывают криповреждения биологических объектов исследовали следующим образом:

температурный шок осуществляли быстрым внесением 0,5 мл клеточной суспензии с температурой 37°C в 4,5 мл охлажденной до температуры 0-4°C казеиново-дрожжевой среды или физиологического раствора;

изучение влияния гипо- и гипертонических растворов электролита (NaCl) на колониеобразующую способность клеток проводили путем постепенного либо быстрого добавления к суспензии бактериальных клеток дистиллированной воды или растворов NaCl в различной концентрации в условиях гипо- и нормотермии;

для выяснения влияния величины pH суспензионной среды на выживаемость бифидобактерий в процессе криоконсервирования осуществляли замораживание бактерий с быстрыми (200-300°C/мин) и медленными (1-4°C/мин) скоростями в средах со значением pH среды 9,6; 8,6; 7,6; 6,6; 4,6 с абсолютной погрешностью $\pm 0,6$.

Замораживание бактериальных суспензий осуществляли в контейнерах объемом 1 и 10 мл на программном замораживателе биобъектов УОП 6 (ОП ИПКиК АН Украины) по одноэтапным программам со скоростями охлаждения 40°C/мин, 1-4°C/мин, 0,4-1°C/мин или непосредственным погружением проб в жидкий азот. Хранение образцов осуществляли в жидком азоте, либо в испарителе бытового холодильника.

Замороженные образцы отогревали на водяной бане при различных температурах: 45, 37, 20 и 4°C.

Статистическую обработку полученных результатов проводили по программе анализа и сравнения выборок "STAT-123", разработанной в ИПКиК АН Украины, с использованием ЭВМ "СМ-4". Уровень значимости различий средних значений равнялся 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты экспериментов по изучению влияния различных скоростей замораживания-отогрева на сохранность бифидобактерий показали, что максимальное количество колониеобразующих единиц (КОЕ) наблюдалось после охлаждения образцов со скоростью 1 - 4° С/мин, с последующим быстрым обогревом при температуре 45° С. С увеличением скорости охлаждения число КОЕ в суспензиях бифидобактерий уменьшается, особенно при замораживании культуры *B. adolescentis* MC-42. Наиболее криоустойчивым штаммом оказался *B. longum* 379 M, а зависимость колониеобразующей способности клеток данного вида от скорости охлаждения была менее выраженной и варьировала от 64,7 до 88,8%. Необходимо отметить, что оптимальным для криоконсервирования исследуемых бифидобактерий было соблюдение строго анаэробных условий (рис. 1).

Полученные данные коррелируют с результатами определения интенсивности включения ³H-тимидина нативными и подвергавшимися замораживанию бифидобактериями. У отдельных штаммов бифидобактерий при криоконсервировании активность биосинтеза ДНК достоверно превышала контрольное включение метки, что, вероятно,

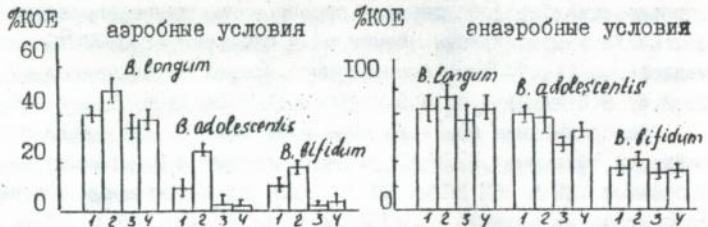


Рис. 1. Влияние скорости охлаждения на количество КОЕ бифидобактерий в условиях аэро- и анаэробного.

Скорость охлаждения: 1 - 0,4-1° С/мин; 2 - 1-4° С/мин; 3 - 40° С/мин; 4 - 200-300° С/мин.

связано с репаративными процессами, протекающими в клетках.

Изучение морфологии клеток бифидобактерий показало, что существенных изменений поверхностных структур клеток после замораживания-отогрева не происходило. Лишь в образцах, охлажденных со скоростью 1-4° С/мин, наблюдалась незначительная тенденция к набуханию клеток.

С целью повышения эффективности криоконсервирования бифидобактерий была изучена возможность применения криопротекторов ПЭО-400 и глицерина. Однако оказалось, что глицерин в концентрации 1-50% и ПЭО-400 в концентрации 10-50% токсичны для клеток бифидобактерий (экспозиция 15 мин) в условиях нормотермии.

Растворы ПЭО-400 в концентрации 1 и 5% не вызывали достоверного снижения количества КОЕ, но в тоже время не оказывали защитного эффекта как при быстром, так и при медленном охлаждении бактериальной суспензии.

Учитывая, что в процессе криоконсервирования бактериальных суспензий происходит изменение физико-химических параметров вне внутриклеточной среды, которым отводится значительная роль в повреждениях биообъектов (Р. Н. Calcott, 1986; А. М. Белоус, В. А. Бондаренко, 1982), представлялось целесообразным изучить влияние этих факторов на клетки бифидобактерий.

Установлено, что при резком снижении температуры от 37°C до 0 - 4°C количество КОЕ в суспензии *B. bifidum* 1 достоверно не изменялось по сравнению с интактными клетками и составило 77-90%.

При кратковременном воздействии гипо- и гипертонических растворов на бифидобактерии отмечено, что в бактериальных суспензиях, содержащих от 0 до 2 моль/л NaCl, количество жизнеспособных клеток существенно не изменялось, как в условиях нормотермии, так и при пониженных температурах. Дальнейшее повышение концентрации NaCl в суспензии свыше 3 моль/л сопровождается достоверным снижением числа КОЕ, которое было в большей степени выражено при резком изменении молярности раствора.

Гибель бактерий как при постепенном, так и резком повышении концентрации NaCl в бактериальной суспензии была менее выражена для клеток *B. bifidum* 1 при гипотермии (0 - 4°C).

Аналогичные результаты, отражающие зависимость динамики снижения количества КОЕ от температуры суспендирующего раствора, его молярности были получены в серии экспериментов по изучению влияния времени экспозиции бифидобактерий в гиперконцентрированных растворах NaCl (рис. 2).

Изменение температуры растворов NaCl ниже 0°C достоверно увеличивает жизнеспособность бифидобактерий по сравнению с нормо- или гипотермией: Так, количество КОЕ после экспонирования в 4

моль/л растворе NaCl при температуре -6°C составило $58,40\% \pm 6,29$, что значительно превышает выживаемость культуры при экспонировании в условиях нормотермии и при $0 - 4^{\circ}\text{C}$ в аналогичном растворе электролита. Повышение устойчивости бактериальных кле-

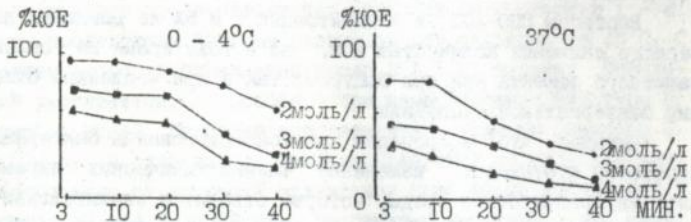


Рис. 2. Влияние различных концентраций NaCl в зависимости от температуры и времени инкубации на количество КОЕ *B. bifidum 1* в суспензии.

ток к гипертоническим растворам NaCl может быть связано со структурной перестройкой мембран и значительным снижением метаболизма в клетке под действием низких температур.

Так как при криоконсервировании значимое влияние на выживаемость микроорганизмов может оказывать кислотность суспензионной среды, была исследована колониеобразующая способность клеток бифидобактерий после инкубации в ростовой среде со значениями pH от 1 до 12 при температуре 37°C и после замораживания-отогрева в ростовой среде со следующими значениями pH 9,6; 7,6; 6,6; 4,6. Результаты исследований свидетельствуют о том, что клетки устойчивы к 15 минутному пребыванию в средах со значениями pH от 4 до 9,6, но за этими пределами сохранность культуры резко снижается.

При замораживании бактерий с различными скоростями в средах со значениями pH от 9,6 до 4,6, установлено, что максимальное количество КОЕ сохраняется в средах с кислотностью от 7,6 до 9,6 независимо от программы охлаждения.

В связи с тем, что в процессе культивирования происходит естественное закисление ростовой среды, обусловленное накоплением продуктов метаболизма, представляло интерес выяснить влияние этих продуктов на количество КОЕ бифидобактерий при замора-

живании-отогреве с сочетанным действием низких значений pH среды. Было установлено, что количество КОЕ после замораживания-отогрева в среде (pH = 4,6), которую предварительно использовали для выращивания бифидобактерий и закисление которой происходило по мере роста культуры, было достоверно ниже по сравнению со средой, подтитрованной до этого же значения.

Для выявления нелетальных повреждений изучали влияние исследуемых ранее физико-химических факторов, не вызывавших гибели нативных клеток, на колониеобразующую способность охлажденных и отогретых клеток *B. bifidum* 1.

Установлено, что после замораживания со скоростью 1 - 4°C/мин и последующего отогрева бактериальной суспензии, ни один из выбранных факторов не вызывал достоверных изменений колониеобразующей способности *B. bifidum* 1. Добавление же в среду культивирования антибиотиков позволило выявить степень нелетальных повреждений криоконсервированных бифидобактерий.

Перенос клеток бифидобактерий, размороженных после охлаждения их со скоростью 1 - 4°C/мин в среду роста со значением pH = 4,0 сопровождался достоверным снижением жизнеспособности клеток и количество КОЕ зависело от времени экспозиции в культуральной среде с кислым значением pH, что свидетельствует о наличии в клетках нелетальных повреждений и о влиянии концентрации ионов водорода в среде суспендирования на исход восстановительных процессов клетки (табл. 1).

Табл. 1.

Количество КОЕ криоконсервированных *B. bifidum* 1 в средах с различным значением pH и временем эквilibрации.

Образец	Количество КОЕ в 1 мл суспензии	P ₁	P ₂
контроль	(1,62 ± 0,21) x 10 ⁷	-	-
зам.-отогр. pH=7,0	(1,05 ± 0,25) x 10 ⁷	< 0,05	-
зам.-отогр. 15 мин., pH=4,0	(8,03 ± 2,62) x 10 ⁵	< 0,05	< 0,05
зам.-отогр. 30 мин., pH=4,0	(8,38 ± 2,57) x 10 ⁵	< 0,05	< 0,05
зам.-отогр. 60 мин., pH=4,0	(1,19 ± 0,30) x 10 ⁵	< 0,05	< 0,05

Примечание: P_1 - уровень доверительной вероятности между контрольными значениями и опытными; P_2 - уровень доверительной вероятности между значениями \bar{X} после замораживания-отогрева проб с экспозицией клеток при физиологическом значении рН = 7,0 и значениями \bar{X} после замораживания-отогрева с экспозицией клеток в среде с рН = 4,0.

Далее нами было исследовано возможное на сохранность бифидобактерий при криоконсервировании исходной концентрации клеток в зависимости от скорости охлаждения и состава суспензионной среды.

Установлено, что повышение исходного числа клеток в суспензии от 10^8 до 10^{10} бакт./мл обеспечивало при быстром охлаждении со скоростью 200-300°C/мин 100% сохранность количества жизнеспособных микроорганизмов, независимо от состава среды, в которой замораживали бифидобактерии.

Увеличение плотности бактериальной суспензии на количество КОЕ культуры *B. bifidum* 1 при замораживании со скоростью 1 - 4°C/мин сопровождалась снижением жизнеспособности культуры после криоконсервирования до 50% от контрольных значений.

Быстрое замораживание и последующий отогрев клеточных концентратов бифидобактерий исследуемых видов также не выявило достоверных различий в количестве КОЕ нативных и опытных образцов.

С целью выяснения причин повышения количества КОЕ криоконсервированных бифидобактерий с увеличением исходной концентрации клеток в замораживаемых образцах была исследована жизнеспособность клеток *B. bifidum* 1, охлажденных с добавлением супернатанта, полученного при инаktivации бифидобактерий. В этом случае повышение количества КОЕ не установлено. Тогда как, добавление инаktivированного бактериального концентрата к исходной концентрации культуры бифидобактерий после быстрого замораживания увеличивало количество жизнеспособных бактерий до 100%.

Для проверки фактов, выявленных в экспериментах с клетками бифидобактерий были проведены исследования аналогичного характера с молочнокислыми бактериями *S. diacetylactis* 728.

Были получены сходные результаты: отмечено существенное увеличение выживаемости стрептококков после повышения концентрации клеток в образце до 10^{10} бакт./мл; отсутствие криоащитного

эффекта от добавления супернатанта, увеличение количества КОЕ при повышении концентрации клеток в образцах за счет добавления инактивированных дрожжей и стрептококков.

Полученные результаты позволяют предположить, что установленный факт высокой сохранности криоконсервированных бифидобактерий и молочнокислых стрептококков при повышении исходной концентрации клеток путем центрифугирования или добавления инактивированных бактерий, будет наблюдаться и при замораживании ассоциаций бактерий, принадлежащих к различным таксономическим группам. Это предположение подтвердилось в опытах по замораживанию бактериального концентрата, состоящего из двух видов бактерий - *B. bifidum* 1 и *Streptococcus diacetylactis*, смешанных в соотношении 1:1. При замораживании этого концентрата количество КОЕ обеих культур достоверно не отличалось от исходного.

С целью исследования сохранности основных параметров роста и размножения криоконсервированных бифидобактерий была изучена динамика роста *B. bifidum* 1, рассчитаны константа скорости роста, время генерации и активность кислотообразования в принятых нами условиях культивирования.

Изучая криорезистентность *B. bifidum* 1 на различных этапах роста было установлено, что она достоверно не изменялась в начальной и логарифмической фазах роста и составила 80 - 100% жизнеспособных клеток, независимо от скорости охлаждения. В стационарной фазе эффективным было медленное охлаждение и по мере "старения" популяции количество КОЕ снижалось как при оптимальной, так и при неоптимальной скоростях замораживания (рис. 3).

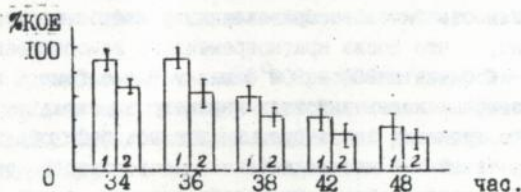


Рис. 3. Криочувствительность культуры *B. bifidum* 1 в стационарной фазе роста.

Скорость охлаждения: 1 - 1-4°С/мин; 2 - 200-300°С/мин.

При анализе полученных результатов возникает закономерное предположение о том, что значительное закисление среды и накопление в ней метаболитов в процессе роста бактерий могут заметно влиять на криоустойчивость бактерий. С целью выяснения справедливости такого предположения, останавливали процесс выращивания культуры в стационарной фазе роста (48 часов), где значение pH среды достигало 4,0 и после чего его доводили до pH 7,0. После замораживания-отогрева количество КОЕ в среде с нейтральным pH было достоверно больше по сравнению с результатами, полученными в среде со значением pH 4,0. При переносе этой культуры в среду с нейтральным значением pH, но не содержащей метаболиты, независимо от скорости замораживания уровень жизнеспособности возрастал до 80%.

В нашем исследовании в отличие от данных, полученных на микроорганизмах других таксономических групп (Maskey, 1984; А. А. Цуцаева, 1991), установлено, что при замораживании-отогреве культуры *B. bifidum* 1 наибольшее количество КОЕ было отмечено в начальной и экспоненциальной фазах роста. Объяснение такой зависимости криочувствительности бифидобактерий от возраста культуры заключается, по-видимому, в особенностях метаболизма и строения бифидобактерий, находящихся на разных стадиях развития популяции. Так, например, в стационарной фазе роста наблюдается увеличение атипичных форм клеток бифидобактерий, клеточная стенка которых имеет неоднородную толщину, что, вероятно, также отражается в снижении криоустойчивости культуры.

Так как наибольшая сохранность колониеобразования при замораживании наблюдалась у бифидобактерий, находящихся в логарифмической фазе роста, было дополнительно изучены скорость роста и активность кислотообразования у клеток из этой фазы роста. Показано, что после кратковременного замораживания со скоростями 1 - 4°C/мин и 200 - 300°C/мин у *B. bifidum* 1 не происходило достоверных изменений этих параметров.

Длительное хранение исследуемых штаммов бифидобактерий в жидком азоте в течении 2 лет не вызвало достоверного снижения в количестве КОЕ и активности кислотообразования, тогда как при хранении в условиях гипотермии гибель клеток происходила через 15 суток.

ВЫВОДЫ

1. Физико-химические факторы, возникающие при замораживании -отогреве, не всегда вызывают гибель бактерий. Так, при резком снижении температуры суспензии клеток до $0 - 4^{\circ}\text{C}$ не происходило достоверного изменения колониеобразующей способности *B. bifidum* 1. Быстрое изменение молярности раствора уменьшало число КОЕ, однако, этот эффект был менее выражен при снижении температуры до $0 - 4^{\circ}\text{C}$.

2. Значение pH среды, используемой для замораживания-отогрева в значительной степени определяет исход криоконсервирования бифидобактерий.

3. При криоконсервировании исследуемых культур бифидобактерий необходимо соблюдение строго анаэробных условий.

4. Глицерин в концентрациях 1 - 50% и ПЭО-400 в концентрациях от 10 - 50% вызывали снижение числа КОЕ *B. bifidum* 1. Нетоксичные для бифидобактерий растворы ПЭО-400 в концентрации 1 - 5% не оказывали защитного эффекта при криоконсервировании.

5. Клетки бифидобактерий наиболее криоустойчивы в лаг- и экспоненциальной фазах роста. Используемые в опытах скорости охлаждения не вызывали изменения количества КОЕ по сравнению с нативной культурой.

6. Для бифидобактерий, находящихся в стационарной фазе роста, оптимальной является скорость $1 - 4^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с последующим быстрым отогревом образцов при температуре 45°C .

7. Максимальное количество КОЕ при криоконсервировании бифидобактерий, находящихся в стационарной фазе роста, обеспечивается за счет повышения концентрации бактерий (10^{10} кл./мл) на единицу объема суспензии, охлаждаемой со скоростью $200 - 300^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

8. Установлены различия в криорезистентности бифидобактерий, принадлежащих к разным таксономическим группам. Из исследуемых видов бифидобактерий наибольшей устойчивостью к низкотемпературному воздействию обладали клетки *B. longum* 379 М.

9. Хранение охлажденных бифидобактерий в жидком азоте (-196°C) в течении 2 лет не вызывает достоверных изменений в количестве колониеобразующих единиц и обеспечивает сохранность кислотообразования. При хранении бифидобактерий в условиях гипотермии гибель клеток происходит в течении 15 суток.

АНС им. В. Стефанни
АН УРСР

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Криоконсервирование *Bifidobacterium bifidum* / III Всесоюзная конференция по научным основам технологии промышленного производства ветеринарных биопрепаратов: Тез. док. - т. 1. - Москва, -1987. - С. 145-146. (Соавт. Г. Г. Шурда).
2. Влияние условий замораживания-отогрева на морфофункциональные свойства бифидобактерий // Деп. в ВИНТИ 09.02.88. - N 1108 В88. -11с. (Соавт. А. А. Пуцаева, Г. Г. Шурда).
3. Динамика развития и криочувствительность на ранних этапах роста культуры *B. bifidum* 1 // Деп. в ВИНТИ 20.06.89. -N 4062 - В89. -6с. (Соавт. В. Ф. Тарасов, С. Е. Гальченко).
4. Морфофункциональные свойства бифидобактерий после криоконсервирования по различным программам // VII съезд Украинского микробиологического общества: Тез. док. - т. 1. - Киев, 1989. -С. 59-60. (Соавт. Г. Г. Шурда).
5. Влияние криопротекторов на нативную и криоконсервированную культуру *Bifidobacterium bifidum* 1 // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов. -Сб. науч. тр. - Харьков, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, 1990. -С. 57-59. (Соавт. Г. Г. Шурда).
6. Колониеобразующая способность криоконсервированных бифидобактерий в зависимости от концентрации бактериальной суспензии // Влияние охлаждения на биологические объекты. -Сб. науч. тр. -Харьков, Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, 1990. -С. 68-71.
7. Холодовой стресс и биологические системы / Под ред. А. А. Пуцаевой. -Киев: Наукова думка, 1991. -176с. (Соавт. Ю. Е. Миклулинский, И. П. Высеканцев, В. Ф. Марценюк, А. Е. Ананьина, О. В. Кудожочева, Т. Ф. Петренко, Т. Г. Дубрава, А. О. Котляров, М. Ю. Стегния, Г. С. Тупчиенко, А. Д. Гордиенко, О. И. Федец).
8. Методические рекомендации по технологическому процессу криоконсервирования коллекционных культур промышленных штаммов микроорганизмов / Сост. А. А. Пуцаева и др. -Харьков: ИПКиК, 1992. -20с. (Соавт. А. А. Пуцаева, И. П. Высеканцев, С. П. Сический и др.)



Г. Г. Шурда

Подп. к печ. *Э.С.С. 927*. Формат 60×84^{1/16}. Бумага тип. Печать офсетная. Усл. печ. л. *1,0*
Уч.-изд. л. *1,0* Тираж *120* экз. Зак. № *3181* Бесплатно.

Харьковское межвузовское арендное полиграфическое предприятие.
310093, Харьков, ул. Свердлова, 115.

468059

Ab 25.892

AB 25.892