

УДК 579.61

## МЕТОД ПОЛУЧЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ БАКТЕРИЙ СО СПЕЦИФИЧЕСКИМИ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ ПОВЕРХНОСТИ

**Журлов О.С.**

*Центр коллективного пользования научным оборудованием Института клеточного  
и внутриклеточного симбиоза УрО РАН, Оренбург, e-mail: jurlov1968@mail.ru*

В работе описывается способ получения, концентрирования и длительного хранения бактерий со специфическими физико-химическими свойствами поверхности. На 12 клинических изолятах *Escherichia coli* показано, что гидрофильные бактерии лучше переносят лиофилизацию, длительное хранение и в меньшей степени подвержены изменению биологических свойств, в отличие от фракции гидрофобных клеток.

**Ключевые слова:** гидрофильно-липофильный баланс, лиофилизация, бактерии с заданными свойствами

## METHOD PREPARATION AND PRESERVATION OF BACTERIA WITH THE SPECIFIED PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES OF SURFACE

**Zhurlov O.S.**

*Center the scientific equipment of Institute Cellular and Intracellular Symbiosis Ural Branch of Russian  
Academy Sciences, Orenburg, e-mail: jurlov1968@mail.ru*

The paper describes a method for producing, concentration and preservation of bacteria with the specified physical-chemical properties of the surface. At the 12 clinical isolates of *Escherichia coli* it is shown that better tolerate hydrophilic bacteria lyophilization, long term preservation and are more capable of reversion biological properties, in contrast to the hydrophobic fraction of cells.

**Keywords:** HLB, lyophilization, bacteria with desired properties

Производство биопрепаратов (пробиотики, вакцины, ферменты, антибактериальные препараты и др.) связано с отбором микроорганизмов с особыми биологическими свойствами, путем направленной селекции «ценных» вариантов из гетерогенной популяции бактерий [3, 6, 7].

Одним из важных факторов, при длительном хранении вакцинных штаммов или продуцентов биологически активных веществ, является сохранность биологических свойств производственного штамма. Однако частые пересевы способствуют, как снижению выработки целевых продуктов штаммами продуцентами [5], так и изменению их биологических свойств и морфотипа колоний [4].

На примере клинических изолятов *Escherichia coli* было показано, что устойчивость к сыворотке крови связана с низкой гидрофобностью поверхности бактерий [1].

Разделение гетерогенной популяции бактерий на гидрофобную и гидрофильную фракцию со специфическим набором биологических свойств значительно сократило бы время селекции «ценных» вариантов бактерий. Однако в доступной нам литературе отсутствуют данные, однозначно свидетельствующие о «закреплении» за гидрофильными бактериальными клетками устойчивости к бактерицидной активности сыворотки крови и устойчивости к антибактериальным препаратам при длительном хранении лиофилизированных культур бактерий.

В связи с этим, целью исследования явился сравнительный анализ изменения гидрофильно-липофильного баланса и биологических свойств бактерий при длительном хранении лиофилизированных фракций гидрофобных и гидрофильных субштаммов *Escherichia coli*.

### Материалы и методы исследования

Материалом исследования послужили 12 клинические культуры *Escherichia coli*. Бактерии выращивали на жидких и твердых средах (НПО «Питательные среды» г. Махачкала) в течении 18 часов, при температуре +37°C в термостате. Бактериальная масса, выращенная на мясоептонном бульоне, трижды отмылась в 0,15 М NaCl (3000 об/мин, 15 мин.).

Устойчивость к гентамицину (10 мкг) штаммов *Escherichia coli* тестировали с помощью диско-диффузионной пробы на агаре Мюллера-Хинтон. В соответствии с резистентностью к гентамицину все штаммы *E. coli* были разделены на 2 группы: чувствительные (S) с зоной подавления роста  $\geq 13$  мм и резистентные (R)  $\leq 12$  мм.

Оценку устойчивости к бактерицидной активности сыворотки крови (БАС) проводили согласно оригинальной методике [2].

Для оценки степени гидрофобности и разделения бактерий на фракции использовали метод разделения взвеси клеток в двухфазной системе [1].

Леофилизацию фракций бактерий проводили на установке для лиофильной сушки Powerdry LL1500 System (Thermo Fisher Scientific, Чехия). Отбирали по 0,3 мл фракции клеток, из верхней (0,5 мл) и нижней фаз (0,5 мл), концентрировали их до конечного объема (3 мл), разливали в ампулы с добавлением 1 мл раствора сахара/желатин (1:5) и лиофилизировали.

Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с определением средней арифметической величины (M), средней ошибки средней (m) и среднеквадратичного (стандартного) отклонения ( $\sigma$ ).

### Результаты исследования и их обсуждение

Разделение клинических изолятов *Escherichia coli* в двухфазной системе ПЭГ/Декстран, с отбором верхней (содержащей полиэтиленгликоль) и нижней (содержащей декстран) фракций позволило разделить популяцию клеток на два субштамма с разной степенью гидрофобности. После трехкратной отмывки в 0,15 М растворе NaCl от декстрана и полиэтиленгликоля, объем фракций стандартизовали и лиофилизировали.

Через 24 часа после лиофилизации наибольшее количество жизнеспособных клеток содержалось в лиофилизате бактерий, выделенных из декстрановой фазы ( $435,4 \times 10^6$  КОЕ), в отличие от лиофилизата гидрофобной фракции ( $87,8 \times 10^5$  КОЕ).

После 2-х лет хранения гидрофобной и гидрофильных фракций 12 клинических изолятов *Escherichia coli*, в рефрижераторе (+4°C), общее количество жизнеспособных клеток снизилось, как для лиофилизата гидрофобной фракции ( $63,9 \times 10^2$  КОЕ), так и гидрофильной ( $301,9 \times 10^3$  КОЕ). Более высокая (в 10 раз!) выживаемость бактерий была характерна для эшерихий (данные не показаны), не подвергшихся 3-х кратной отмывке от декстрана и полиэтиленгликоля.

Для исключения влияния процесса лиофилизации на физико-химические свойства бактерий, гидрофильно-липофильный баланс измеряли у суточных, адаптированных к жидкой среде, культур *Escherichia coli*. В среднем клетки *Escherichia coli*, содержащиеся в полиэтиленгликолевой (ПЭГ) фракции, обладали более высокой степенью гидрофобности ( $0,297 \pm 0,23$  о.е.), в сравнение с ГЛБ бактерий из фракции обогащенной декстраном ( $-0,473 \pm 0,19$  о.е.). Средние значения гидрофильно-липофильного баланса для «гидрофобной» фракции *E.coli*, хранящихся в течение двух лет, были более гидрофобны ( $0,248 \pm 0,18$  о.е.), чем «гидрофильная» фракция бактерий ( $-0,437 \pm 0,18$  о.е.).

Субштаммы *Escherichia coli*, выделенные из лиофилизатов фракций, тестировались на наличие гемолитической активности, резистентность к гентамицину и сыворотке крови (БАС).

У трех из 12 штаммов *Escherichia coli* была обнаружена гемолитическая активность. Она оценивалась лишь качественно, по наличию признака, была характерна для субштаммов выделенных из «гидрофобной», «гидрофильной» фракции и субштаммов прошедших лиофилизацию.

Исследование устойчивости бактерий к сыворотке крови показало, что в среднем бактерии, содержащиеся в нижней «гидрофильной» фракции характеризовались большей устойчи-

востью к сыворотке крови, как через сутки после лиофилизации (ИндСР= $92,7 \pm 7,4\%$ ) в сравнение с бактериями из гидрофобной фракции (ИндСР= $76,8 \pm 16,1\%$ ), так и после 2-х лет хранения лиофилизатов фракций, как для *Escherichia coli* выделенных из фазы обогащенной декстраном (ИндСР= $79,5 \pm 22,7\%$ ), так и из «гидрофобной» фракции (ИндСР= $58,3 \pm 27,3\%$ ).

Исследование резистентности к гентамицину субштаммов *Escherichia coli*, через сутки после лиофилизации «гидрофобной» и «гидрофильной» фракций показало, что в среднем в  $66,3 \pm 8,3\%$  случаев «гидрофильные» бактерии были более устойчивы к гентамицину, чем «гидрофобные» ( $59,4 \pm 8,0\%$ ). Хранение лиофилизированных субштаммов *Escherichia coli*, в течение двух лет, не повлияло на устойчивости к гентамицину бактерий из «гидрофильной» ( $69,4 \pm 8,6\%$ ) и «гидрофобной» фракций ( $64,5 \pm 7,7\%$ ).

**Обсуждение.** Таким образом, сравнительный анализ влияния длительного хранения субштаммов *Escherichia coli* на физико-химические и биологические свойства бактерий, полученных из «гидрофильной» и «гидрофобной» фракций, позволяет сделать следующие выводы.

Во-первых, более высокий процент жизнеспособных бактерий находится в «гидрофильной» фракции, что свидетельствует о меньшей выживаемости «гидрофобных» клеток.

Во-вторых, «гидрофильные» бактерии лучше переносят лиофилизацию, длительное хранение и в меньшей степени подвержены изменению биологических свойств, в отличие от фракции «гидрофобных» клеток.

Предложенный метод фракционирования клеток позволяет значительно сократить время выделения бактерий с заданными свойствами.

#### Список литературы

1. Брудастов, Ю.А., Гриценко В.А., Журлов О.С., Чертков К.Л. Характеристика гидрофобных свойств бактерий при их взаимодействии с сывороткой крови // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – №4. – С.73-77.
2. Бухарин О.В., Брудастов Ю.А., Гриценко В.А., Дерябин Д.Г. Роль способности бактерий к инактивации факторов естественной противоинойфекционной резистентности в их устойчивости к бактерицидному действию крови (сыворотки крови) // Биол. эксперим. биол. и мед. – 1996. – №2. – С.174-176.
3. Журлов, О.С., Гриценко В.А., Брудастов Ю.А. Влияние температуры культивирования на физиологические и физико-химические свойства *Escherichia coli* K12 // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №12. – С.106-110.
4. Журлов О.С., Сайкина Е.Ю., Журлова В.О. Анализ влияния пептидов тромбоцитарного лизата (hPL) на кинетику роста *Escherichia coli* // Современные тенденции развития науки и технологий. – 2015. – № 1-1. – С.80-84.
5. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Дегушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – №4. – С.99-121.
6. Morgan C.A., Herman N., White P.A. et al. Preservation of micro-organisms by drying; A review // Journal of Microbiological Methods. – 2006. – Vol. 66. – P.183-193.
7. Rosenthal J.A., Huang C.Jr., Doody A.M. et al. Mechanistic insight into the TH1-biased immune response to recombinant subunit vaccines delivered by probiotic bacteria-derived outer membrane vesicles // PLoS One. – 2014. – Vol. 26. – P.1-24.