

Разработка эффективных условий криоконсервирования дрожжеподобных грибов рода *Candida*

UDC 57.043: 579

I.P. VYSEKANTSEV*, V.F. MARTSENYUK, A.YU. SIRENKO

Design of Effective Cryopreservation Conditions for *Candida* Yeast-Like Fungi

Изучали влияние скорости охлаждения в диапазоне 0,25–100°C/мин и криопротекторов ДМСО, глицерина и этанола на жизнеспособность дрожжеподобных грибов *C.albicans* ATCC 885. Показано, что максимальную жизнеспособность обеспечивает замораживание со скоростью охлаждения от 3,5 до 10°C/мин в пивном сусле с добавлением 5% ДМСО или 5% глицерина.

Ключевые слова: дрожжеподобные грибы, жизнеспособность, криоконсервирование, криопротекторы.

Вивчали вплив швидкості охолодження в діапазоні 0,25–100°C/хв і криопротекторів ДМСО, гліцерину та етанолу на життєздатність дріжджеподібних грибів *C.albicans* ATCC 885. Показано, що максимальну життєздатність забезпечує заморожування зі швидкістю охолодження 3,5 до 10°C/хв у пивному суслі з доданням 5% ДМСО або 5% гліцерину.

Ключові слова: дріжджеподібні гриби, життєздатність, криоконсервування, криопротектори.

The influences of freezing rates over 0.25–100°C/min range and DMSO, glycerol and ethanol cryoprotectants on the viability of yeast-like fungi *C.albicans* ATCC885 were studied. It has been shown that maximum level of survival of yeast-like fungi was provided by freezing rates over 3.5–10°C/min range in beer wort and adding of 5% DMSO or 5% glycerol.

Key-words: yeast-like fungi, viability, cryopreservation, cryoprotectants.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* играют определенную роль в патогенезе заболеваний кожи, желудочно-кишечного тракта, органов системы репродукции и аутоиммунных заболеваний. В связи с этим создаются коллекции клинических изолятов этих грибов для разработки рациональных схем лечения, создания новых антифунгальных препаратов, исследования механизмов резистентности к этим препаратам [1].

Наиболее эффективными способами хранения грибов рода *Candida* являются лиофилизация и криоконсервирование. Технологии криоконсервирования грибов рода *Candida* в настоящее время разрабатываются. И вместе с тем дрожжеподобные грибы, являясь низшими эукариотами с непродолжительным циклом деления, представляют удобную модель для изучения криоповреждения и криозащиты клеток.

Цель данного исследования – изучение влияния режимов охлаждения и состава консервирующей среды на жизнеспособность дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

Материалы и методы

В работе использовали коллекционный штамм *C. albicans* ATCC 885.

Культуру *C. albicans* выращивали в пивном сусле на протяжении 24 ч до начала стационарной фа-

зы роста, которая характеризуется относительно высокой криоустойчивостью для большинства классов микроорганизмов [3, 4].

Опыты проводили с суспензиями клеток на пивном сусле (8% Б) с концентрацией 1×10^7 клеток/мл.

Жизнеспособность клеток определяли “чашечным методом” Коха по числу макроколоний, выросших на чашке [2].

Образцы размораживали на водяной бане при 30°C.

Результаты и обсуждение

Было изучено влияние криопротекторов на сохранность клеток *C. albicans*. Показатели жизнеспособности *C. albicans* после экспозиции с использованными криопротекторами приведены на рис. 1.

Полученные результаты показывают, что 5% ДМСО, 5% глицерина и 1; 2 и 3 М растворы этанола не оказывают токсического действия на клетки *C. albicans* при экспозиции в течение 30 и 60 мин. Экспозиция с ДМСО и глицерином в концентрации 10 и 15% приводит к достоверному снижению жизнеспособности клеток *C. albicans*.

В экспериментах по изучению влияния режимов замораживания на грибы *C. albicans* образцы охлаждали до –40 °C/мин со скоростями охлаждения 0,25; 1; 3,5; 7; 10; 20; 35; 80 и 100 °C/мин, после чего образцы переносили в жидкий азот.

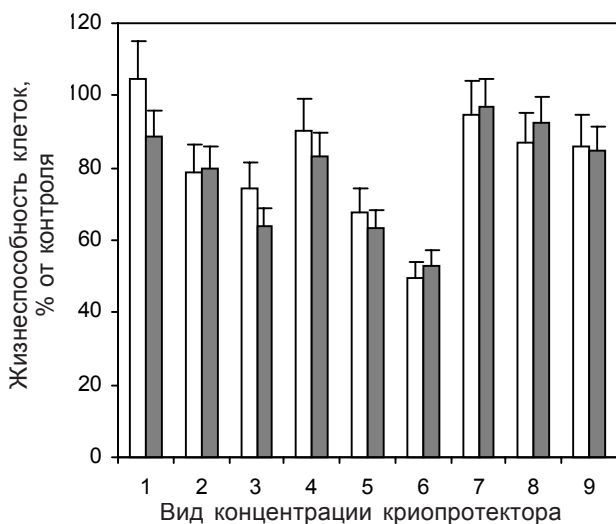


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности *C. albicans* от экспозиции с крипротекторами: 1 – 5% ДМСО; 2 – 10% ДМСО; 3 – 15% ДМСО; 4 – 5% глицерин; 5 – 10% глицерин; 6 – 15% глицерин; 7 – 1 М этанол; 8 – 2 М этанол; 9 – 3 М этанол. □ – 30 мин; ■ – 60 мин.

Результаты жизнеспособности грибов после указанных режимов охлаждения приведены на рис.2.

Построенная кривая зависимости жизнеспособности от скорости охлаждения показывает, что максимальную жизнеспособность при замораживании *C. albicans* обеспечивают скорости охлаждения от 3,5 до 10 и 100°C/мин.

Была изучена жизнеспособность клеток дрожжеподобных грибов *C. albicans* после замораживания до –196°C со скоростями от 0,25 до 100°C/мин в разных криозащитных средах с последующим хранением при –196°C на протяжении 8 месяцев. Было установлено, что на жизнеспособность клеток *C. albicans* достоверно влияют состав криозащитной среды и режим охлаждения (рис.3). Максимальную жизнеспособность обеспечивает замораживание со скоростью охлаждения от 3,5 до

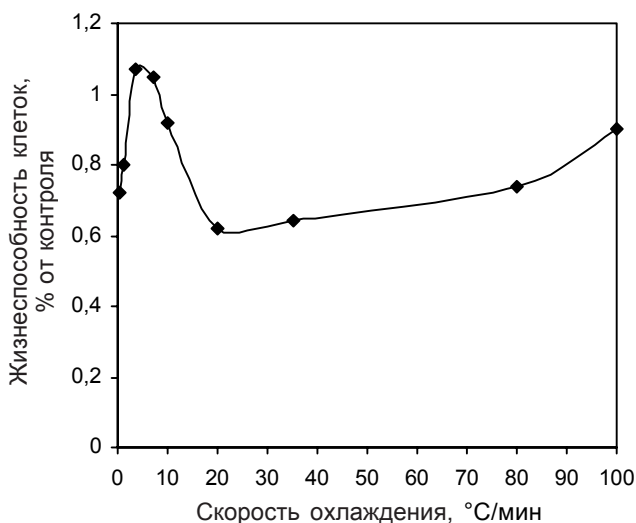


Рис. 2. Зависимость жизнеспособности грибов *C. albicans* от скорости охлаждения.

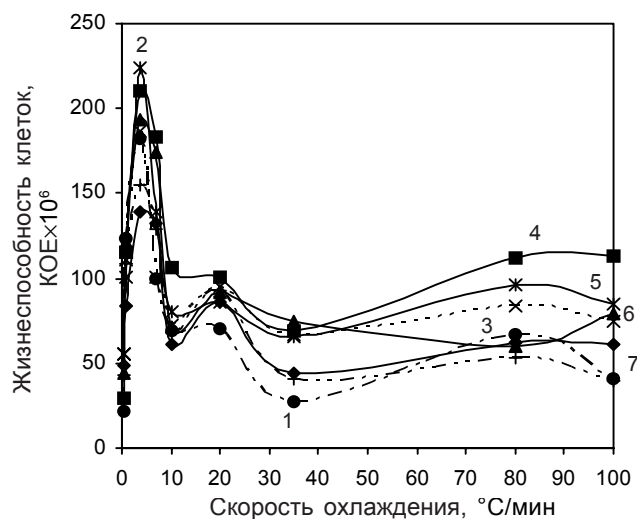


Рис. 3. Зависимость жизнеспособности грибов *C. albicans* от состава криозащитной среды и скорости охлаждения: 1 – без крипротектора; 2 – 5% глицерина; 3 – 2 М этанол; 4 – 5% ДМСО; 5 – 10% глицерина; 6 – 10% ДМСО; 7 – 1 М этанол.

10°C/мин в пивном сусле с добавлением 5% ДМСО или 5% глицерина.

Выводы

1. Было изучено влияние экспозиции с крипротекторами ДМСО, глицерином, этанолом в разных концентрациях на жизнеспособность клеток *C. albicans*. Показано, что ДМСО и глицерин в концентрации 5% и этанол в концентрации 1–3 М на протяжении 60 мин не приводят к гибели клеток *C. albicans*.

2. Исследовано влияние скорости охлаждения в диапазоне 0,25–100°C/мин на жизнеспособность клеток *C. albicans*. Установлено, что максимальную сохранность клеток *C. albicans*, суспендированных в пивном сусле, обеспечивает охлаждение со скоростями от 3,5 до 10°C/мин.

3. Экспериментально показано криозащитное действие крипротекторов ДМСО и глицерина при замораживании грибов *C. albicans*.

Литература

1. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. – М.: Медицина, 1967. – 463 с.
2. Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Под ред. В.К. Ерошина. – Пушино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – 186 с.
3. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд-во МГУ, 1976. – 307 с.
4. Руководство к практическим занятиям по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / Под ред. В.В. Теца. – М.: Медицина, 2002. – 351 с.

Поступила 8.07.2008