

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,  
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

### ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ЛИОФИЛИЗАЦИИ НА СИНТЕЗ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ *XANTOMONAS CAMPESTRIS* pv. *CAMPESTRIS* IMB B-7001

Показано, что продуцент экзополисахарида *Xantomonas campestris* pv. *campestris* B-7001 более чувствителен к сублимационному высушиванию, чем к замораживанию-оттаиванию и сохраняет стабильные морфологические признаки. Прогнозируемая сохранность жизнеспособности при  $-70^{\circ}\text{C}$  не превышает 8 лет и достигает 30 лет при  $-135^{\circ}\text{C}$  и при лиофилизации. Впервые установлено, что после регенерации культуры из анабиоза наблюдается временное увеличение синтеза экзополисахарида. Стимулирующий эффект выше при криоконсервации, увеличивается со снижением температуры замораживания и зависит от вида криопротектора. По увеличению сохранности жизнеспособности клеток и продуктивности штамма исследованные криоконсерванты располагаются в ряду: 4% этиленгликоль < 5% диметилсульфоксид < 10% глицерин  $\leq$  10% сахара + 1% желатин.

Ключевые слова: криоконсервация, лиофилизация, экзополисахариды.

Бактерии рода *Xantomonas* широко распространены в природе, как представители ризосферной микрофлоры, вызывающие заболевание растений. Однако они находят применение в научно-исследовательских работах и производственной практике. Так, в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины депонирован продуцент гетерополисахарида *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB B-7001, изолированный из пораженной ткани капусты [10]. При депонировании, которое рассчитано на 30-летний срок, важное значение имеют методы хранения штамма. Рекомендации авторов – периодические перевивки на картофельном агаре каждые четыре месяца или 5 лет при хранении под вазелиновым маслом. Однако спонтанная популяционная изменчивость, диссоциация колоний, лизогения, присущая им, может влиять на физиологические свойства, продуктивность. В частности, авторы указывают, что синтез полисахарида у штаммов бактерий этого рода при непосредственной изоляции находится в пределах 19-23 г/л, в то время как у коллекционных – в основном на уровне 6-8 г/л [6].

Известно, что для сохранения генетических ресурсов в жизнеспособном и генетически стабильном состоянии в коллекциях микроорганизмов используется лиофилизация и криоконсервация. Однако, выживание микроорганизмов при этом является видо- и штаммоспецифичным и зависит от многих факторов [1, 5, 13, 14, 15]. Принимая во внимание необходимость длительного хранения депозита с высоким титром жизнеспособных клеток, со стабильной продуктивностью по синтезу экзополисахаридов и минимальной популяционной изменчивостью, мы считали целесообразным изучить влияние лиофилизации и криоконсервации на штамм IMB B-7001 с целью оптимизации методических подходов гарантированного долговременного его сохранения.

**Материалы и методы.** Объект исследования – штамм *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMB B-7001, который хранится в Депозитарии микроорганизмов Института микробиологии и вирусологии НАН Украины. Культивирование штамма осуществляли в течение 2-х суток при  $+28^{\circ}\text{C}$  на картофельном (КА) или картофельно-глюкозном агаре (КАГ). Для хранения использовали разные методы: криоконсервацию, лиофилизацию и периодические перевивки каждые 4 месяца (авторские образцы культуры). После восстановления из анабиоза поддерживали культуру еженедельным пассированием и хранением при комнатной температуре. Для лиофилизации и криоконсервации использовали суспензию 48-часовых клеток в защитных средах с проникающими криоконсервантами: 4 % этиленгликоль (ЭГ),

5 % диметилсульфоксид (ДМСО), 10 % глицерин (ГЛ), – и не проникающими: 10 % сахараза+1 % желатин (С10Ж1).

Криоконсервацию осуществляли в 2 мл криопробирках при  $-135 \pm 2,5^\circ\text{C}$  и  $-70 \pm 2^\circ\text{C}$  в морозильных камерах НПО «Холод». Регенерацию из замороженного состояния вели быстро – на водяной бане при  $+37^\circ\text{C}$ , или медленно – за счет конвекции воздуха при  $+4^\circ\text{C}$ .

Лиофилизацию проводили в условиях: ампулы на 5 мл, среда защиты С10Ж1, замораживание при  $-50^\circ\text{C}$ , сублимация в зоне эвтектических температур  $-10 \div -15^\circ\text{C}$ , десорбция влаги при  $+20^\circ\text{C}$ , остаточная влажность  $\leq 4,5\%$ , ампулы запаивали под вакуумом и хранили при  $+4^\circ\text{C}$  и/или  $-20^\circ\text{C}$ .

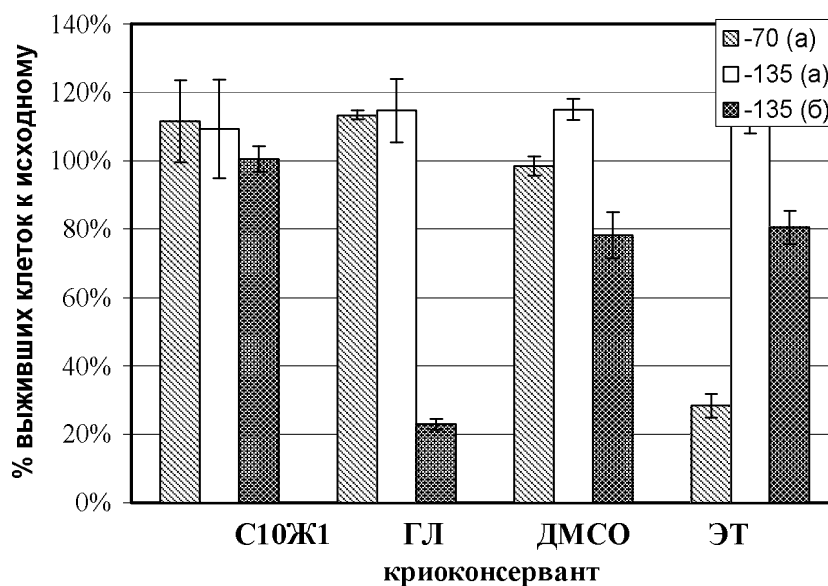
Титр жизнеспособных бактерий (КОЕ) определяли методом Коха, константу скорости отмирания клеток при хранении ( $K$ , мес.<sup>-1</sup>) по [7].

Синтез ЭПС изучали при культивировании штамма в течение 3-х суток на качалочных колбах (50 мл среды, 1 мл посевного с концентрацией  $2 \times 10^9$  КОЕ/мл, перемешивание 210 об./мин.). Использовали питательную среду с мелассой и весовой метод определения количества ЭПС по [10].

Результаты статистически обрабатывали, в качестве критерия достоверности использовали тест Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что при суспендировании клеток в растворах криопротекторов наблюдается увеличение КОЕ (%): С10Ж1  $146 \pm 16,3 >$  ГЛ  $140 \pm 4,2 >$  ДМСО  $134 \pm 0,6 >$  ЕГ  $124 \pm 1,1 >$  вода  $100 \pm 2,6$ . Очевидно, физико-химические особенности криопротекторов сказываются на эффективности разрывов цепочек клеток, которые характерны для культуры на КА и КГА.

Показано, что, в общем, сам процесс замораживания-размораживания до  $-135^\circ\text{C}$  и  $-70^\circ\text{C}$  во всех исследованных криопротекторах не приводит к потере жизнеспособности клеток бактерий при условии быстрого оттаивания. Исключение составляет этиленгликоль при  $-70^\circ\text{C}$ , где сохранялось 28 % клеток. В условиях медленного размораживания обнаружена существенная потеря живых клеток (рис. 1). Губительное влияние медленного оттаивания было обнаружено ранее на дрожжах, а относительная токсичность ЕГ – на культуре клеток [14, 15]. Полагают, что гибель клеток при медленном размораживании указывает на скрытые нелетальные повреждения, которые становятся критичными в этих условиях.



**Рис. 1. Выживание клеток штамма В-7001 в разных криопротекторах после замораживании до  $-70$  и  $-135^\circ\text{C}$  при быстром (а) и медленном (б) оттаивании.**

Исследование динамики количества жизнеспособных бактерий при криоконсервации позволило рассчитать прогнозируемый период их сохранности. Так, при  $-70^{\circ}\text{C}$  он составляет для ДМСО и ЭГ около 2 лет и для С10Ж1 и ГЛ 6÷8 лет (табл. 1). При  $-135^{\circ}\text{C}$ , не зависимо от вида криоконсерванта,  $K$  уменьшается до  $-0,027\div-0,037\text{мес.}^{-1}$ , что позволяет продлить планируемое хранение бактерий до 30 лет. Постепенную гибель клеток, хранящихся при  $-70^{\circ}\text{C}$ , связывают с медленными химическими реакциями в жидкой части переохлажденной воды [2], в то время как при криогенных температурах – с процессами кристаллизации, рекристаллизации, со сменой структуры биополимеров клеток, с колебаниями температуры хранения [3, 5, 12].

Таблица 1

Выживание клеток *X. campestris pv. campestris* IMB В-7001 после замораживания до  $-70^{\circ}\text{C}$  и хранения при этой температуре

Криоконсервант	Выживание после замораживания, %	Хранение			
		Выживание после 9 месяцев хранения, %	Зависимость выживания от времени $M = M_0 \cdot e^{Kt}$	$K$ , мес. <sup>-1</sup>	Прогнозируемый период хранения*, годы
С10Ж1	112±12	19,7±1,2	$7,71 \cdot 10^9 e^{-0,2023t}$	0,2023	6,5±0,7
ГЛ	113±1,3	26,8±1,9	$7,5 \cdot 10^9 e^{-0,1664t}$	0,1664	7,9±0,2
ДМСО	98±3,2	1,1±0,09	$6,2 \cdot 10^9 e^{-0,5615t}$	0,5615	2,3±0,1
ЭГ	28±2,4	0,3±0,03	$1,7 \cdot 10^9 e^{-0,7245t}$	0,7245	1,7±0,1

\* титр клеток в конечный период хранения не ниже 1000 КОЕ/мл.

Установлено, что при лиофилизации гибель исследованных бактерий достигает 85 %, что говорит о большой чувствительности их к сублимационному высушиванию, чем к процессу замораживания-оттаивания (табл. 2). Скорость отмирания клеток при последующем хранении составила около  $K=0,1 \text{ мес.}^{-1}$ , что ограничивает период хранения до 8–10 лет. Высокая чувствительность клеток к сублимации и существенная последующая их гибель при хранении могут быть связаны с образованием культурой экзополисахаридной капсулы, которая затрудняет контакт компонентов защитной среды с клеточной стенкой. Основным компонентом используемой нами защитной среды является сахароза. Сахароза – непроницающий криопротектор и на сегодня механизм ее действия не совсем ясен. Его связывают с модификацией клеточной стенки за счет замещения части молекул воды, структурированием супертонких слоев молекул воды, усилением межмолекулярных гидрофобных связей [2, 3, 12]. Известно, что у других видов бактерий с мощной слизистой оболочкой скорость отмирания лиофилизированных клеток еще большая – у миксобактерий  $K$  достигает 3,6 [7], у метанотрофов – 0,1065 мес.<sup>-1</sup> [8]. В то же время у лактобацилл и бацилл, для которых не характерен обильный синтез ЭПС,  $K=0,004\div0,07 \text{ мес.}^{-1}$ .

Для лиофилизации использовали клетки штамма, выращенные на КГА. Поскольку синтез ЭПС у исследуемого штамма зависит от присутствия в среде углеводов, мы исключили из состава среды глюкозу. При этом, выживаемость бактерий в процессе сублимации увеличивается с 16 до 28,6%, а  $K$  при хранении уменьшается с 0,1061 до 0,068 мес.<sup>-1</sup>. Понижение температуры хранения высушенных клеток с  $+4^{\circ}\text{C}$  до  $-20^{\circ}\text{C}$  позволяет уменьшить  $K$  до 0,035 мес.<sup>-1</sup> и увеличить прогнозируемое время хранения до 29 лет (табл. 2).

Таблица 2

Выживание бактерий после лиофилизации и хранения

Среда выращивания	Выживание после лиофилизации, %	Хранение			
		Температура хранения, $^{\circ}\text{C}$	Зависимость выживания от времени $M = M_0 \cdot e^{Kt}$	$K$ , мес. <sup>-1</sup>	Прогнозируемый период хранения*, годы
КГА	16,8±1,8	+4	$1,3 \cdot 10^9 e^{-0,1061t}$	0,1061	9±1
		+4	$1,9 \cdot 10^9 e^{-0,0677t}$	0,0677	15±1,4
КА	28,6±2,6	-20	$2 \cdot 10^9 e^{-0,0346t}$	0,0346	29±2,7

\* титр клеток в конечный период хранения не ниже 1000 КОЕ/мл.

Замораживание – стрессовый фактор, действие которого связывают с механическими повреждениями клеточных структур (клеточной стенки, мембраны, ДНК) и с влиянием критических физико-химических факторов (осмотический и температурный шок, изменение внутриклеточного pH) [15]. Такие действия стрессов могут приводить как к гибели части клеток, так и к усилению популяционной изменчивости, изменению физиологической активности. Нами не отмечено диссоциации колоний исследованного штамма после действия замораживания-отогрева и лиофилизации, а также после контакта с криоконсервантами. Однако, мы наблюдали увеличение синтеза ЭПС ( $p < 0,05$ ) после регенерации клеток штамма из замороженного состояния с защитной средой С10Ж1. Контролем служили клетки, хранившиеся с помощью периодических перевивок (табл. 3). Стимулирующий эффект на штамм В-7001 увеличивается со снижением температуры замораживания от  $-70$  до  $-135^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,05$ ), что предполагает наличие в клетках механизма оценки температуры. Выявленная нами физиологическая стимуляция низкими температурами проявляется непосредственно при регенерации и постепенно нивелируется при дальнейших пассажах (рис. 2, 3). Длительное пассирование (до 16 пассажей) приводит к падению синтеза ЭПС в контроле и опыте, что уже было отмечено ранее для штаммов этого вида. Сообщалось также об отдельных случаях нестабильного увеличения синтеза ЭПС у штаммов *X. campestris* при сочетанном действии мутагенов и замораживания до  $-5$  или  $-10^{\circ}\text{C}$  [6].

Таблица 3

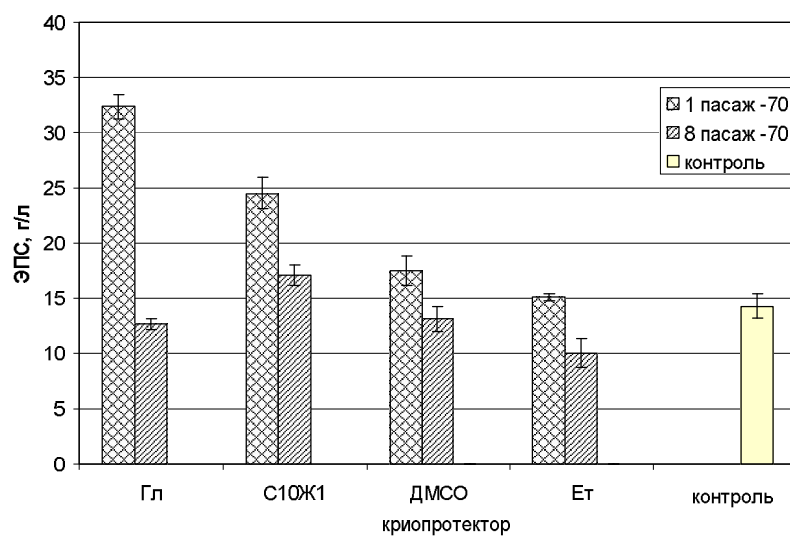
**Синтез ЭПС штаммом В-7001 после регенерации из замороженного и лиофилизованного состояния в среде защиты С10Ж1**

Способ хранения	Условия хранения	Синтез ЭПС (г/л) номер пассажа		
Замораживание	$-70^{\circ}\text{C}$ , 2 мес.	$\frac{24,5 \pm 1,0^*}{1}$	$\frac{17,0 \pm 0,7^*}{8}$	$\frac{8,8 \pm 0,1}{10}$
	$-135^{\circ}\text{C}$ , 2 мес.	н.о.	$\frac{21,8 \pm 0,3^*}{8}$	$\frac{11,6 \pm 0,4}{10}$
Лиофилизация	$-20^{\circ}\text{C}$ , 12 лет	$\frac{16,3 \pm 1,4^{**}}{2}$	$\frac{12,5 \pm 1,2}{8}$	$\frac{10,6 \pm 0,9}{14}$
	$+4^{\circ}\text{C}$ , 5 лет	н.о.	$\frac{11,2 \pm 0,7}{8}$	н.о.

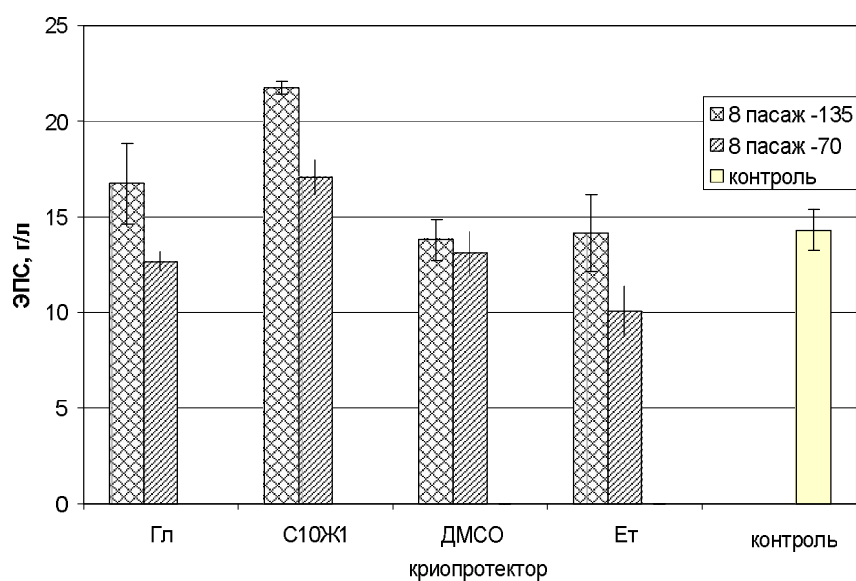
**Примечание:** \* -  $p < 0,05$ ; \*\* -  $p = 0,13$ . н.о. – не определяли. Синтез ЭПС в условиях данного опыта клетками В-7001, хранившимися с помощью периодических перевивок, во 2 пассаже составляет  $14,3 \pm 0,8$  г/л.

Применение других криоконсервантов при замораживании показало, что увеличение продуктивности штамма В-7001 наблюдается при использовании ГЛ и в незначительной степени – ЭГ или ДМСО. Как и в случае сахарозы, снижение температуры замораживания приводит к увеличению синтеза ЭПС (рис. 2, 3).

Установлена тенденция к увеличению синтеза ЭПС и после лиофилизации, однако полученный эффект статистически менее достоверен ( $p = 0,13 \pm 0,21$ ) (табл. 3).



**Рис. 2.** Влияние замораживания до  $-70^{\circ}\text{C}$  и криопротекторов на синтез ЭПС штаммом В-7001. 1, 8 – номер пассажа после регенерации из анабиоза, контроль – синтез ЭПС во 2-м пассаже при хранении методом перевивок.



**Рис. 3.** Влияние замораживания до  $-70^{\circ}\text{C}$  и  $-135^{\circ}\text{C}$  и криопротекторов на синтез ЭПС штаммом В-7001 в 8 пассаже после регенерации из анабиоза. Контроль – синтез ЭПС во 2-м пассаже при хранении методом перевивок.

Временное увеличение синтеза ЭПС под действием криостресса может иметь в первую очередь защитную функцию и, скорее всего, связано с выживанием клеток в природе. Ведь ЭПС – фактор, защищающий клетку и регулирующий влажность среды вокруг нее, фактор антигенной специфичности, коммуникативности, фитопатогенности... Известно о временном увеличении синтеза экзополимеров под действием ингибиторов у сульфатовосстанавливающих бактерий [11], синтеза тилозина у *Streptomyces fradiae* после криоконсервации [1]. Согласно Цуцаевой А.А. [1, 14, 15], при холодовом стрессе отличия от «нормы» чаще всего регистрируются в первом пассаже или первых клеточных делениях после регенерации. Исследования механизмов стрессовых эффектов на клетки микроорганизмов, растений и животных показы-

вают, что стресс вызывает экспрессию генов и синтез каскада защитных белков, белков-шаперонов, белков теплового шока, основная функция которых сохранить клетку живой. Дискутируется вопрос универсальности стресс-ответов у микроорганизмов разных таксономических групп и их общебиологической универсальности [4, 9].

Таким образом, установлены особенности влияния криоконсервации и лиофилизации на *X. campestris* pv. *campestris* IMV B-7001, позволяющие удлинить сроки их хранения. Эффективность исследованных криоконсервантов располагается в ряду: С10Ж1 ≥ ГЛ > ДМСО > ЭГ. Прогнозируемая сохранность жизнеспособности находится в пределах 2-8 лет при -70°C и достигает 30 лет при -135°C и лиофилизации. Результаты последней зависят от состава среды, условий хранения. С целью лиофилизации исследованные штаммы рекомендуется выращивать на средах и в условиях снижающих синтез ЭПС. При лиофилизации и криоконсервации синтез ЭПС у культур сохраняется, проявляя тенденцию к временному увеличению продуктивности при регенерации из анабиоза. Такой стимулирующий эффект сильнее выражен при криоконсервации, зависит от криопротектора и увеличивается при снижении температуры замораживания.

*Т.Н.Головач, Л.И.Грома*

*Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ*

**ВЛИВ КРИОКОНСЕРВАЦІЇ І ЛІОФІЛІЗАЦІЇ НА СИНТЕЗ  
ЕКЗОПОЛІСАХАРИДУ ТА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ XANTOMONAS  
CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS IMV B-7001**

**Резюме**

Показано, що продуцент екзополісахариду *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMV B-7001 більш чутливий до сублімаційного висушування, ніж до заморожування-розморожування і зберігає стабільні морфологічні ознаки. Прогнозована збереженість життєздатності при -70 °C не перевищує 8 років і досягає 30 років при -135 °C і при ліофілізації. Вперше встановлено, що після регенерації культури із анабіоза спостерігається тимчасове збільшення синтезу екзополісахариду. Стимулюючий ефект вище при криоконсервації, підвищується зі зниженням температури заморожування та залежить від виду криопротектора. По збільшенню збереженості життєздатності клітин та продуктивності штама досліджені криоконсерванти розміщуються у ряді: 4% етиленгліколь < 5% диметилсульфоксид < 10% гліцерин ≤ 10% сахароза+1% желатин.

К л ю ч о в і с л о в а: криоконсервація, ліофілізація, екзополісахариди.

*T.N. Golovach, L.I. Groma*

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

**INFLUENCE OF CRYOPRESERVATION AND LYOPHILIZATION ON  
EXOPOLYSACCHARIDE SYNTHESIS AND VIABILITY OF XANTOMONAS  
CAMPESTRIS PV. CAMPESTRIS IMV B-7001**

**S u m m a r y**

It is shown, that the producer of exopolysaccharides *Xantomonas campestris* pv. *campestris* IMV B-7001 is more sensitive to freeze-drying, than to freezing-thawing and keeps stable morphological properties. Predicted preservation of viability is within the limits of 2-8 years at -70 °C and exceeds 30 years at -135 °C and freeze-drying. Results of the latter essentially depend on the medium composition and storage conditions. Synthesis of exopolysaccharides at preservation is kept, showing the tendency to temporal increase of productivity at regeneration from anabiosis. Such stimulating effect is more expressed at cryopreservation and depends on the cryoprotector and freezing temperature. The investigated cryoprotectors are arranged in a line according to their efficiency: 10 % sucrose +1 % gelatin ≥ 10 % glycerin > 5 % dimethylsulfoxide > 4 % ethylene glycol.

The paper is presented in Russian.

Key words: cryopreservation, freeze-drying, exopolysaccharides.

The author's address: Golovach T.N., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology NAS of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv, MSP, D 03680, Ukraine.

1. Ананьина А.Е., Цуцаева А.А., Балыбердина Л.М., Степанюк Л.В., Чернышенко Л.Г. Опыт многолетнего хранения промышленных микроорганизмов и высших грибов в жидком азоте // Проблемы криобиологии. – 2005. – **15**, №3. – С.290–291.
2. Белоус А.М., Грищенко В.И. Криобиология. – Киев: Наук. думка, 1994. – 432 с.
3. Волков В.Я. К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах устойчивости микроорганизмов к замораживанию и высушиванию. // Микробиология. – 1994. – **63**, №1. – С.5–16.
4. Воробьева Л.И. Стрессоры, стрессы и выживаемость бактерий (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – **40**, №3. – С. 261–269.
5. Высеканцев И.П., Кудогоцева О.В., Петренко Т.Ф., Гурина Т.М., Грошевой М.И., Марценюк В.Ф., Коший С.В. Влияние колебаний температуры хранения на жизнеспособность криоконсервированных клеток про- и эукариот. // Проблемы криобиологии. – 2005. – **15**, №1. – С.33–41.
6. Гвоздяк Р.И., Матышевская М.С., Григорьев Е.Ф., Литвинчук О.А. Микробный полисахарид ксантан. – Киев: Наук. думка, 1989. – 212 с.
7. Иванюца В.А., Рахимова Е.Л. Жизнеспособность лиофилизированных клеток *Xanthosoccus xanthus* УКМ 10041 и *Polyangium cellulosum* УКМ 10043 в присутствии различных антиоксидантов // Микробиол. журн. – 2002. – **64**, №5. – С.3–9.
8. Кошелев А.В., Нестеров А.И. Ускоренный тест прогнозирования выживаемости лиофилизированных культур метанотрофных бактерий // Микробиология. – 1987. – **56**, №3. – С. 492–496.
9. Николаев Ю.А. Внеклеточные факторы адаптации бактерий к неблагоприятным условиям среды // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – **40**, №4. – С. 387–397.
10. Пат. №26648 Україна МКІ С 12 N 1/20 Штам *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* - продуцент гетерополисахариду // Р.І. Гвоздяк, О.О. Литвинчук, В.А. Болоховська, С.К. Воцелко, Н.Б. Мартинюк, О.В. Нагорна. – Опубл. 11.10.99 р. – Бюл. №6.
11. Пуриш Л.М., Асауленко Л.Г., Козлова И.П. Влияние ингибитора коррозии на продуцирование экзополимерного комплекса сульфатвосстанавливающими бактериями // Микробиол. журн. – 2007. – **69**, №3. – С. 43–50.
12. Ругаль А.А., Барвинченко В.Н., Галаган Н.П., Сиора И.В., Туров В.В. Влияние сахаров на дегидратацию биополимерных молекул в процессе криоконсервирования. // Проблемы криобиологии. – 2007. – **17**, №4. – С. 374–384.
13. Стоянова Л.Г., Аркадьева З.Ф. Сравнение способов хранения молочнокислых бактерий // Микробиология. – 2000. – **69**, №1. – С. 98–104.
14. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Балыбердина Л.М., Степанюк Л.В. Методология разработки технологий криоконсервации промышленных штаммов микроорганизмов // Цитология. – 2004. – **46**, №10. – С. 878.
15. Цуцаева А.А., Микулинский Ю.Е., Высеканцев И.П. Холодовой стресс и биологические системы. – Киев: Наук. думка, 1991. – 176 с.

Отримано 13.10.2012