

## СОХРАНЕНИЕ СВОЙСТВ *BACILLUS SUBTILIS-MESENTERICUS* ПРИ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

А. А. ХАЧАТУРЯН, Э. К. АФРИКЯН

Изучено влияние лиофилизации на основные физиологические свойства 40 культур группы *Bacillus subtilis-mesentericus* и родственных видов. Установлено, что использование сыворотки крови в качестве суспензионной среды в целом обеспечивает стабильность основных физиолого-биохимических признаков у большинства изученных культур в течение 2-х лет.

*Ключевые слова:* спорообразующие бактерии, лиофилизация.

Разработка эффективных методов длительной консервации культур микроорганизмов представляет важную научно-производственную задачу. Аэробные спорообразующие бактерии, благодаря образованию эндоспор, обладают высокой степенью жизнеспособности в самых разнообразных условиях. В этой связи наибольший интерес представляет изучение сохранения у них исходных физиологических свойств. Данные многих авторов показывают, что одним из надежных способов хранения культур многих родов и видов является лиофильное высушивание с предварительным замораживанием [1—6]. При этом одним из важнейших условий является правильный выбор суспензионной среды. С этой целью разные авторы предлагают различные субстраты и их комбинации [7, 12].

Основываясь на результатах наших ранних исследований, мы остановились на применении в качестве оптимальной суспензионной среды нормальной бычьей или лошадиной сыворотки без добавления каких-либо других соединений [7].

Особый практический интерес приобретает исследование стабильности различных свойств для разработки системы дифференциации и идентификации бацилл. Ряд авторов провели подобные исследования для разработки методов кластерного анализа с применением ЭВМ [8, 9].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния лиофилизации на основные физиолого-биохимические свойства штаммов группы *Bacillus subtilis-mesentericus* и родственных видов.

*Материал и методика.* В работе использованы коллекционные культуры групп *Bac. subtilis-mesentericus*, а также родственных видов *Bac. pumilus* и *Bac. licheniformis*. Всего было изучено 40 штаммов, выделенных нами и полученных из зарубежных и отечественных коллекций. Было использовано по 10 штаммов каждого вида.

Для лиофилизации штаммы выращивались на мясо-пептовом агаре с добавлением 1% дрожжевого автолизата до полного высыпания спор, затем суспендировались в нормальной лошадиной сыворотке и разливались по 0,2 мл в стерильные ампулы с внутренним диаметром 0,5 и длиной 10 см. Лиофилизацию проводили следующим образом. Для быстрого замораживания ампулы погружались на 15—20 мин в смесь сухого льда с изопропиловым спиртом ( $-70^{\circ}$ ), затем переносились в холодильную камеру при температуре  $-40^{\circ}$  на 4—6 часов. Высушивание осуществлялось в лиофильной камере типа ТГ-15 производства ГДР под вакуумом  $10^{-1} - 10^{-1.5}$  при начальной температуре 5—8°, которая повышалась до 37° и сохранялась на этом уровне до полного высыхания осадка. Весь процесс длился 18—20 часов. Лиофилизированные ампулы запаковывались, проверялись на наличие вакуума и хранились при комнатной температуре в течение двух лет. Выведение культур из состояния анабиоза проводилось путем инкубации во вскрытую ампулу 0,2 мл стерильной дистиллированной воды и выдержки в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее суспензии высевались на мясо-пептовый агар с 1% дрожжевого автолизата и изучались изменения основных физиолого-биохимических свойств по сравнению с исходными штаммами. Изучение признаков проводилось согласно общепринятым тестам, применительно к аэробным спорообразующим бактериям [10—12].

**Результаты и обсуждение.** Изучение влияния лиофилизации на свойства культур после двухлетнего хранения выявило различную стабильность признаков у штаммов разных видов бацилл.

Для штаммов группы *Bac. subtilis-mesentericus*, как видно из табл. 1—2, стабильными оказались: наличие каталазной, казеиназной, амилитической (за исключением одного штамма *Bac. subtilis*) и инвертазной активностей, образование ацетилметилкарбинола (АМК), рост

Таблица 1

Сохранение некоторых физиолого-биохимических свойств у бактерий *Bac. subtilis-mesentericus* в лиофилизированном состоянии (учет результатов после 2-х лет, по 10 штаммов каждого вида)

Тесты	<i>Bac. subtilis</i>		Расхождение, %	<i>Bac. mesentericus</i>		Расхождение, %
	количество активных			количество активных		
	до лиофилизации	после лиофилизации		до лиофилизации	после лиофилизации	
Каталаза	10	10	0	10	10	0
Желатиназа	8	6	25	10	10	0
Амилаза	10	9	10	10	10	0
Инвертаза	10	10	0	10	10	0
Протеолиз казеина	10	10	0	10	10	0
Денитрификация	10	9	10	10	9	10
Образование АМК	10	10	0	10	10	0
Рост при pH 5,7	10	10	0	10	10	0
Рост с 7% NaCl	10	10	0	10	10	0

при pH 5,7 и в среде с 7% поваренной соли, отсутствие лецитиназной активности и усвоения пропионата натрия. Желатиназная активность изменилась у двух штаммов *Bac. subtilis* (к двум неактивным штаммам прибавилось еще два), денитрификация—у одного штамма *Bac. subtilis* и *Bac. mesentericus*.

Влияние лиофилизации на усвоение разных источников углерода штаммами *Bac. subtilis*

Источники углерода	Количество ферментирующих		Расхождение, %
	до лиофилизации	после лиофилизации	
Глюкоза, фруктоза, сахароза, трегалоза, маннит, глицерин, сорбит, салицин, молочная кислота	10	10	40
Рибоза, галактоза, мальтоза, лимонная кислота	8	9	15
Манноза, целлобиоза	8	8	0
Ксилоза	8	7	15
Рамноза	5	5	0
Лактоза	7	8	15
Раффиноза	9	7	20
Декстрин	8	5	30
Уксусная кислота	6	6	0
Сорбоза, инулин, дульцит	0	0	0

Данные табл. 2 показывают, что способность усваивать различные источники углерода сохранилась после хранения в лиофилизированном состоянии у разных штаммов по-разному. Так, у штаммов *Bac. subtilis* стабильны ферментирующие свойства в отношении глюкозы, фруктозы, сахарозы, трегалозы, рамнозы, маннита, глицерина, сорбита, молочной кислоты, маннозы и целлобиозы. Другие использованные источники углерода проявляют вариабельность и до лиофилизации, а после нее, например, у штамма *Bac. subtilis* отмечается усвоение лактозы, рибозы, галактозы, мальтозы и лимонной кислоты. Это явление чаще наблюдается у штаммов вида *Bac. mesentericus* (табл. 3). Среди последних наиболее стабильна способность расти на глюкозе, фруктозе, сахарозе и глицерине. Усвоение других источников углерода, указанных в таблице, вариабельно, в особенности у штаммов 12, 63, 1861, 1869.

У большинства штаммов вида *Bac. pumilus* (табл. 4) почти все изученные физиологические свойства оказались стабильными. Это касается и тех культур, которые составляли исключение из данной группы по таксономическим признакам: два штамма из десяти обладали амилолитической способностью и сохранили ее после лиофилизации.

Лиофилизированный штамм 1891 потерял это свойство, желатиназная активность утрачивалась у двух штаммов (1893, 1894), один штамм из десяти (1895) восстанавливал нитраты и до и после лиофилизации.

Усвоение разных источников углерода (табл. 5) также сравнительно более стабильно, чем у группы *Bac. subtilis-mesentericus*—из 10 штаммов *Bac. pumilus* только у одного или двух культур исчезает или появляется свойство усваивать тот или иной сахар, а именно ксилозу, фруктозу, галактозу, трегалозу, маннит, глицерин, декстрин, молочную кислоту. Особенно вариабельны эти признаки у штамма 1892, который стабильно усваивает арабинозу, рибозу, глюкозу, маннозу, раффинозу, целлобиозу, сахарозу, салицин и лимонную кислоту.

Таблица 3

Влияние лиофилизации на усвоение источников углерода штаммами *Bac. mesentericus*

Источники углерода	Количество ферментирующих		Расхождение, %
	без лиофилизации	после лиофилизации	
Глюкоза, фруктоза, сахароза, глицерин	10	10	0
Ксилоза	2	1	50
Лактоза	2	4	50
Арабиноза, рибоза, салицин	5	9	50
Манноза	8	10	20
Галактоза, целлобиоза	6	10	50
Мальтоза	10	9	10
Раффиноза	5	6	20
Инулин	3	0	30
Маннит	9	10	10
Декстрин	9	2	20
Сорбит	7	10	30
Молочная кислота	9	10	10
Рамноза, дульцит	0	0	0

Таблица 4

Влияние лиофилизации на физиолого-биохимические свойства штаммов *Bac. pumilus*

Тесты	Из них активны	Активны после лиофилизации	Расхождение, %
Каталаза	10	10	0
Лецитиназа	0	0	0
Желатиназа	9	7	20
Протеолиз казеина	10	10	0
Амилаза	3	2	60
Денитрификация	1	1	0
Образование АМК	9	9	0
Усвоение цитрата	10	10	0
Усвоение пропионата	7	6	15
Рост при 7% NaCl	10	10	0
Рост при pH 5,7	10	10	0

Таблица 5

Влияние лиофилизации на усвоение источников углерода штаммами *Bac. pumilus*

Источники углерода	Количество ферментирующих		
	до лиофилизации	после лиофилизации	расхождение, %
Арабиноза, рибоза, манноза, глюкоза	10	10	0
Фруктоза, галактоза, трегалоза, маннит, глицерин	9	10	10
Раффиноза, лимонная кислота	9	9	0
Целлобиоза, сахароза, салицин	9	9	0
Ксилоза, молочная кислота	8	9	15
Лактоза	7	10	30
Мальтоза	6	6	0
Сорбоза, инулин, дульцит	0	0	0

Аналогичные с *Bac. pumilus* по стабильности данные получены у культур вида *Bac. licheniformis*. Из табл. 6 видно, что после лиофилизации сохранились каталазная, лецитиназная, казеиназная, амилолитическая активность, рост при pH 5,7 и с 7% поваренной соли, усвоение цитрата натрия, образование АМК. В этой группе после лиофилизации только штамм 1911 потерял способность восстанавливать нитраты и усваивать пропионат натрия. Последнее отсутствовало также у штамма 1908. Перечисленные признаки имеют таксономическое значение для дифференциации: *Bac. licheniformis* от *Bac. subtilis* и *Bac. pumilus* [10].

Таблица 6

Влияние лиофилизации на физиолого-биохимические свойства штаммов  
*Bac. licheniformis*

Тесты	Количество активных		
	до лиофилизации	после лиофилизации	расхождение, %
Каталаза	10	10	0
Лецитиназа	0	0	0
Желатиназа	2	2	0
Протеолиз казеина	10	10	0
Амилаза	9	9	0
Денитрификация	10	9	10
Образование АМК	10	10	0
Усвоение цитрата	10	10	0
Усвоение пропионата	10	8	20
Рост при 7% NaCl	0	10	0
Рост при pH 5,7	10	10	0

Таблица 7

Влияние лиофилизации на усвоение источников углерода штаммами  
*Bac. licheniformis*

Источники углерода	Количество ферментирующих		
	до лиофилизации	после лиофилизации	расхождение, %
Арабиноза, рибоза, фруктоза, глюкоза, целлобиоза, маннит, молочная кислота	10	10	0
Галактоза, манноза, мальтоза, трегалоза, глицерин, сорбит, салицин	9	10	10
Ксилоза	8	6	31
Рамноза	7	9	15
Лактоза	6	10	40
Сахароза	10	6	40
Раффиноза	10	9	10
Инулин	1	5	20
Декстрин	9	6	30
Уксусная кислота	7	6	15
Лимонная кислота	10	7	30

Из источников углерода (табл. 7) изученные культуры после хранения в течение 2-х лет в лиофилизированном виде стабильно усваивают арабинозу, рибозу, фруктозу, глюкозу, целлобиозу, маннит, молочную кислоту.

Штамм 1910 после лиофилизации усваивает галактозу, маннозу, мальтозу, трегалозу, глицерин, сорбит, салицил. Значительное число штаммов *Bac. licheniformis* проявляет выраженную вариабильность по ферментации ксилозы, рамнозы, лактозы, сахарозы, инсулина, декстрина, уксусной и молочной кислот.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что физиолого-биохимические признаки культур видов *Bac. subtilis-mesentericus*, *Bac. pumilus*, *Bac. licheniformis* при лиофилизации в основном сохраняют стабильность и могут быть использованы в качестве диагностических и после лиофилизации. Вместе с тем, усвоение различных источников углерода, характеризующихся значительной вариабильностью при хранении культур на питательных средах и в условиях лиофилизации, должно быть использовано с определенной предосторожностью.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 17.11 1981 г.

### BACILLUS SUBTILIS-MESENTERICUS

ԽՄՐԻ ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՊԱՀՊԱՆՈՒՄԸ  
ԼԻՈՖԻԼԻԶԱՑՄԱՆ ԸՆԹԱՑՔՈՒՄ

Ա. Ա. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ, Է. Գ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է լիոֆիլիզացիայի ազդեցությունը *Bacillus subtilis-mesentericus* խմբի կուլտուրաների և ցեղակից տեսակների հիմնական ֆիզիոլոգիական հատկությունների վրա: Հաստատվել է, որ արյան շինուկի օգտագործումը որպես սուսպենզիոն միջավայր, ամրապահում է ուսումնասիրված կուլտուրաների մեծ մասի ֆիզիոլոգիական և բիոքիմիական հատկանիշների պահպանումը երկու տարվա ընթացքում:

### MAINTENANCE OF PROPERTIES OF BACILLUS SUBTILIS-MESENTERICUS GROUP OF BACTERIA DURING LYOPHILIZATION

A. A. KHACHATURIAN, E. G. AFRIKIAN

The maintenance of biochemical properties of 40 cultures of aerobic spore forming bacteria of *Bac. subtilis-mesentericus*, *Bac. pumilus*, *Bac. licheniformis* during lyophilization for 2 years has been investigated. The beef and horse serum as suspension medium has been used. The main diagnostic properties of studied species cultures were stable, but the relation to some carbohydrates significantly varies.

### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Барбишова Н., Владимирова Г., Ермолова В. Тр. ВНИИ с/х микробиологии, 48, 190, Л., 1979.

2. Беккер М. Е. Изв. АН Латв. ССР, 3, 332, 3, 1975.
3. Зубенко Т. Ф., Султанова И. Г., Закиров М. З. Прикл. биохимия и микробиология, 15, 4, 636, 1979.
4. Кузнецов В. Д., Семенов С. М. Антибиотики, 15, 11, 977, 1970.
5. Лаузне Э. Я., Клишаре А. А. В кн. Продукты аминокислот и ферментов, 44, Рига, 1978.
6. Родионова Г. С., Степаненко В. Г. Микробиологический синтез, 6, 27, 1974.
7. Хачатурян А. А., Бобикян Р. А., Мартиросова Т. А., Аветян Ж. Н., Африкян Э. К. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 391, 1980.
8. Logan N. A., Berkeley R. C. W. In: The Aerobic endospore-forming bacteria, 105—140, AP, 1981.
9. Bonde G. J. Danish Med. Bull., 41, 1975.
10. Gordon R. E., Haynes W. S., Fang C. H.-N. Agric. Research service, US Dept of Agriculture Washington, D. C., 1973.
11. Holding J., Collee J. G. In: Methods in Microbiology, 6 A, AP, 1971.
12. Lapage S. P., Shelton J. E., Mitchell T. G., Mackenzie A. R. In: Methods In Microbiology, 3A, AP, 1970.