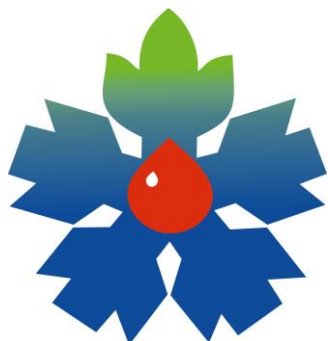


**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**



**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ**

Методичні рекомендації для самостійної роботи

аспірантів 2 курсу

галузь знань 09 Біологія

спеціальність 091 Біологія

Дисципліна «Методи тривалого зберігання мікроорганізмів»

**Харків 2022**

Рецензенти: О.В. Книш – доктор медичних наук, старший дослідник, провідний науковий співробітник лабораторії та клінічного відділу молекулярної імунофармакології, ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова».

Н.М. Моїсєєва – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник; провідний науковий співробітник відділу холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України.

*Затверджено до друку рішенням освітньо-наукової секції вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол №10 від 25.11.2022 р.)*

Кріоконсервування мікроорганізмів: Методичні рекомендації для самостійної роботи аспірантів 2 курсу (галузь знань 09 Біологія, спеціальність 091 Біологія) з дисципліни «Методи тривалого зберігання мікроорганізмів» / *Висеканцев І.П., Гуріна Т.М., Устиченко В.Д.* / [Електронний ресурс] 18 с.

У методичних рекомендаціях розглядаються питання щодо ролі мікроорганізмів у життєдіяльності людини, методів визначення їх життєздатності, теоретичних та практичних основ кріоконсервування бактерій, дріжджів і вірусів, та особливостей кріоконсервування мікроорганізмів на етапах біотехнологічних виробництв.

Для здобувачів вищої освіти на третьому освітньо-науковому рівні (доктор філософії).

## ЗМІСТ

|     |                                                                                   |    |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.  | <i>Світ мікробів та їх роль у життєдіяльності людини</i>                          | 3  |
| 2.  | <i>Методи визначення життєздатності мікроорганізмів</i>                           | 4  |
| 3.  | <i>Застосування кріоконсервування для депонування мікроорганізмів у колекціях</i> | 5  |
| 4.  | <i>Кріоконсервування мікроорганізмів на етапах біотехнологічних виробництв</i>    | 5  |
| 5.  | <i>Кріоконсервування бактерій</i>                                                 | 7  |
| 6.  | <i>Кріоконсервування вірусів</i>                                                  | 11 |
| 7.  | <i>Кріоконсервування грибів</i>                                                   | 13 |
| 7.1 | <i>Кріоконсервування дріжджів та дріжджоподібних грибів</i>                       | 13 |
| 7.2 | <i>Кріоконсервування міцеліальних грибів</i>                                      | 14 |
|     | <i>Контрольні запитання</i>                                                       | 16 |
|     | <i>Список рекомендованої літератури</i>                                           | 17 |

## **1. Світ мікробів та їх роль у життєдіяльності людини**

Мікроорганізми надзвичайно поширені в біосфері. Вони живуть у ґрунті, воді, атмосфері, в організмі людини та всіх видів тварин, у рослинах. Мікроорганізми істотно впливають на газовий склад атмосфери, родючість ґрунту, беруть участь у кругообігу органічних та неорганічних речовин, виконують санітарні функції і, навпаки, викликають захворювання у людей, тварин, рослин. У практиці людства існує безліч технологій та процесів, у яких задіяні різні мікроорганізми. За допомогою біотехнологічних процесів, в яких використовують мікроорганізми, виробляють біологічно активні речовини та лікарські препарати для медицини та ветеринарії, мікробіологічні засоби захисту рослин від хвороб та шкідників, бактеріальні добрива та регулятори росту рослин, кормові добавки (кормові білки, амінокислоти, ферменти, вітаміни для тваринництва), пробіотичні препарати, сировину для харчової промисловості, засоби для переробки сільськогосподарських, побутових та промислових відходів та ін. Мікроорганізми широко використовуються в наукових дослідженнях, присвячених молекулярній генетиці та генній інженерії, біофізиці, радіобіології, екології та в інших сферах.

У зв'язку з цим є велика потреба у методах довгострокового зберігання мікроорганізмів. У сучасній практиці найчастіше використовують два методи довгострокового зберігання мікроорганізмів – ліофілізацію (висушування із замороженого стану) та кріоконсервування.

Значні відмінності у будові клітин мікроорганізмів та їх фізіології зумовлюють і значні відмінності у природній чутливості мікроорганізмів до низьких температур в умовах довкілля. Так, пептококи та пептострептококи гинуть під дією холоду у зовнішньому середовищі через кілька хвилин, стрептококи та нейссерії – через кілька годин, стафілококи – через кілька тижнів. Збудник чуми зберігається у навколишньому середовищі при мінус 22°C до 4-х місяців, а в заморожених трупах та блохах – до одного року. Ентеропатогенні ієрсинії зберігають життєздатність та патогенність при температурах від мінус 15 до мінус 20°C протягом кількох місяців і можуть розмножуватися при 4°C. Бруцели зберігаються у ґрунті при негативних температурах до 3-х місяців, збудник туляремії – до року, мікобактерії туберкульозу – кілька років. У пробах повітря, взятих у стратосфері, при температурах від мінус 20 до мінус 40°C виявлено ґрунтові бактерії. Різні за кількістю популяції бактерій виявлені в льоді полярних морів.

Ці факти стали основою помилкової думки про те, що для зберігання всіх мікроорганізмів достатньо використовувати помірно низькі температури. Однак у процесі зберігання за таких температур відбувається загибель багатьох видів мікроорганізмів, селекція окремих, стійких до холоду штамів, молекулярні перебудови, що призводять до мутацій, втрата деяких таксономічних ознак.

Аналіз застосування різних технологій консервування мікроорганізмів свідчить про те, що найефективнішим та найнадійнішим методом їх довгострокового зберігання є кріоконсервування.

Кріоконсервування мікроорганізмів має низку переваг. Незначні втрати життєздатних мікроорганізмів можливі лише на етапах заморожування – відтаювання. Терміни зберігання при постійній низькій температурі не впливають на кількість клітин у зразках, що зберігаються. Кріоконсервування гарантує повну безпеку геному та генетично детермінованих біологічних властивостей мікроорганізму протягом тривалого часу. Сьогодні у міжнародних колекціях накопичено досвід зберігання мікроорганізмів при температурі рідкого азоту протягом 50-70 років без зниження життєздатності та втрати генетично детермінованих властивостей.

## **2. Методи визначення життєздатності мікроорганізмів**

Життєздатність мікроорганізмів – інтегральна характеристика збереження ростового потенціалу і здатності до розмноження, генотипної та фенотипної повноцінності.

Показник життєздатності (застосовується для популяцій бактерій, дріжджів та одноклітинних водоростей) – відношення числа життєздатних клітин до загального числа клітин, які знаходяться у досліджуваному зразку. Зазвичай виражають у відсотках.

Для визначення життєздатності клітинних форм мікроорганізмів існують дві групи методів – прямі та опосередковані. До прямих відносяться методи, засновані на врахуванні репродуктивної здатності живих клітин. До непрямих – методи, засновані на реєстрації непрямих проявів життєдіяльності клітин.

Найбільш точними та інформативними є прямі методи, а серед них – *культуральні методи*, в яких диференціюючим критерієм служить реєстрація наявності у клітин репродуктивної здатності (здатності до поділу). Класичними культуральними методами є «чашковий» метод Коха та метод граничних розведень, а також десятки їх модифікацій.

При використанні «чашкового» методу виробляють серійні розведення вихідної суспензії мікробних клітин і з кожного розведення певний об'єм суспензії висівають на поверхню щільного живильного середовища або пробірки з напіврідким агаром. Посіви культивують і підраховують кількість колоній, що вирости. Кожна колонія утворена клоном, що сформувався з однієї життєздатної клітини.

При використанні методу граничних розведень з матеріалу, що досліджується, готують ряд послідовних розведень. Потім певним об'ємом з кожного розведення роблять посів у пробірки з прозорим рідким живильним середовищем. Після інкубації враховують пробірки з помутнілим (пророслим) і прозорим живильним середовищем. Приймається, що у пробірки із прозорим середовищем не потрапила жодна жива клітина. За спеціальною таблицею Мак-Креді, розробленою на підставі методів варіаційної статистики, визначають найбільш ймовірну кількість життєздатних клітин у вихідній суспензії.

Виражають концентрацію життєздатних клітин числом колонієутворюючих одиниць (КОЕ) в 1 мл.

Життєздатність вірусів визначають за їх здатністю до репродукції у культурах клітин. Про репродукцію судять або за прямою цитопатичною дією (ЦПД), яка носить різноманітний характер залежно від виду вірусу, по бляшкоутворенню в клітинному моношарі, по сорбції на інфікованих клітинах еритроцитів або моноклональних антитілах до вірусу. Виражають концентрацію життєздатного вірусу в «інфекційному титрі вірусу» – числі віріонів в одиниці об'єму досліджуваного матеріалу, здатних викликати інфекцію.

### **3. Застосування кріоконсервування для депонування мікроорганізмів у колекціях**

У зв'язку з широким розвитком і дедалі більшим значенням для економік розвинених країн біотехнологічних виробництв з використанням мікроорганізмів зросла роль колекцій мікроорганізмів різного рівня (міжнародних, національних, відомчих). Це пов'язано з тим, що всі ці винаходи, на яких засновані мікробіологічні технології, неможливо здійснити без наявності у виробництві мікроорганізму, який застосовується. Для захисту авторських прав та страхування виробництв від втрати штаму-продуцента запроваджено процедуру депонування. Порядок депонування та використання запатентованого мікроорганізму регламентовано «Будапештським договором про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів з метою патентної процедури» (1979). Україна приєдналася до нього у 1996 р. Процедура депонування передбачає гарантоване довгострокове зберігання мікроорганізму та свідоцтво про життєздатність штаму під час його видачі. Для тривалого зберігання мікроорганізмів у колекціях використовують кріоконсервування та ліофілізацію (висушування із замороженого стану).

### **4. Кріоконсервування мікроорганізмів на етапах біотехнологічних виробництв**

Завданнями мікробіологічних виробництв в загальних рисах є отримання цільового продукту мікробного синтезу або мікробної біомаси за мінімальний час з мінімальною витратою енергоресурсів та з максимально ефективним використанням поживних субстратів. На всіх стадіях технологічного процесу мікроорганізми-продуценти зазнають дії комплексу технологічних факторів, що спричиняють загибель частини мікроорганізмів, інактивацію продуктів мікробного синтезу, контамінацію культури-продуцента сторонньою мікрофлорою. До того ж, мікробіологічні виробництва повинні бути гарантовано забезпечені високоактивними штамами-продуцентами, адаптованими до умов конкретного виробництва.

Уникнути або зменшити негативну дію технологічних факторів та забезпечувати виробництво високоактивними штамами-продуцентами повною мірою дозволяють технології кріоконсервування мікроорганізмів. Кріоконсервування мікроорганізмів рекомендовано на наведених нижче етапах мікробіологічного виробництва.

У мікробіологічній лабораторії, яка може обслуговувати одразу кілька підприємств, у кріоконсервованому стані зберігають:

- колекційні штами, які використовують у дослідженнях з одержання та селекції штамів-продуцентів;
- селекціоновані штами;
- штами-продуценти, отримані з інших колекцій та банків мікроорганізмів (рис. 1).

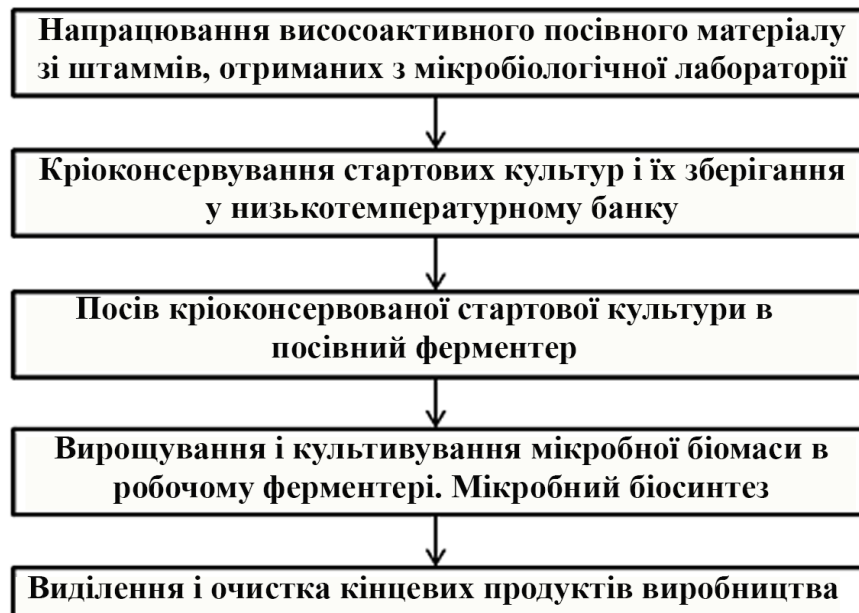


**Рис. 1. Застосування кріоконсервування у мікробіологічних лабораторіях підприємств мікробіологічної промисловості.**

З мікробіологічної лабораторії штами-продуценти у ліофілізованому чи кріоконсервованому стані передаються на виробництво. На виробництві отримані штами вносять у живильні середовища та отримують стартові культури (посівний матеріал), які зберігають у кріоконсервованому вигляді. На початку кожного виробничого циклу одну стартову культуру розморожують та висівають у посівний ферментер, де вирощують посівну культуру штаму-продуцента. Посівну культуру пересівають у робочий ферментер. Усі стандартні етапи виробничого циклу наведено на рис. 2.

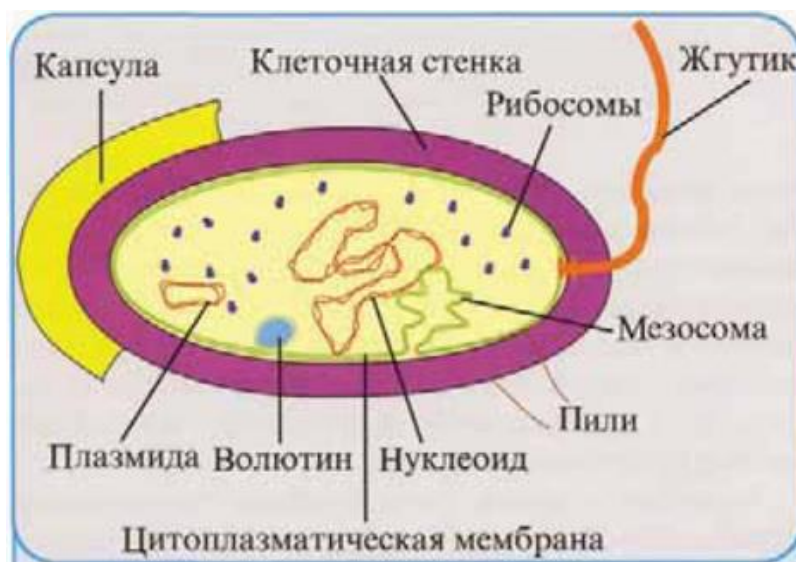
## **5. Кріоконсервування бактерій**

На рисунку 3 представлено будову бактеріальної клітини. Оболонка бактеріальної клітини складається з клітинної стінки та цитоплазматичної мембрани. Під оболонкою знаходиться протоплазма, що складається з нуклеоїду, цитоплазми, органел та включень. Нуклеоїд бактерій не має оболонки, ядерця та гістонів. Він представлений двонитковою ДНК,



**Рис. 2. Застосування кріоконсервування у мікробіологічному виробництві.**

замкненою в кільце і щільно упакованою. У цитоплазмі бактерій знаходяться рибосоми з коефіцієнтом седиментації 70S, рибосомальні РНК, включення. Різні види бактерій можуть мати також капсулу, джгутики та ворсинки. Капсула – гідрофільна слизова оболонка з полісахаридів, пов'язана із зовнішньою стороною клітинної стінки.



**Рис. 3. Схема будови бактеріальної клітини (А.А. Воробйов, 2003).**

Капсула оберігає бактерії від висихання та захищає бактеріальну клітину в організмі людини та тварин від імунних факторів. Джгутики – тонкі нитки з білка – флагеліну, що беруть початок від мембрани. Забезпечують активну рухливість бактеріальних клітин. Ворсинки –

ниткоподібні утворення з білка пеліну. Відповідають за адгезію, водно-сольовий обмін та кон'югацію.

Бактерії, як і інші види мікроорганізмів, пошкоджуються в процесі заморожування-відтавання внаслідок впливу низки фізико-хімічних факторів, пов'язаних із кристалізацією та рекристалізацією внутрішньоклітинної та позаклітинної води. Найбільш уразливими для кріоушкоджуючих факторів структурами бактеріальних клітин є мембрана, клітинна стінка, рибосоми, ендферменти, що забезпечують енергетичний метаболізм.

На життєздатність та збереження біологічних властивостей бактерій впливають такі фактори:

- будова клітин, зумовлена належністю до певного сімейства, роду та виду;
- вихідні морфологічні та функціональні властивості клітин, на які впливають умови культивування (склад живильного середовища, аерація, температура культивування);
- вихідні морфологічні та функціональні властивості клітин, зумовлені фазою зростання періодичної культури;
- склад консервуючого середовища;
- концентрація клітин у зразку, що заморожується;
- режим охолодження.

Бактерії з різних сімейств, родів та видів мають значні відмінності у будові клітин, що впливає на їх вихідну кріорезистентність. Так, бактерії кулястої форми (стафілококи, стрептококи) більш стійкі до заморожування, ніж бактерії паличкоподібної форми (родина ентеробактерій та ін.). Велике значення для вихідної кріорезистентності має будова клітинної стінки. Маркером відмінностей у будові клітинної стінки є здатність забарвлюватися методом Грама (рис. 4).

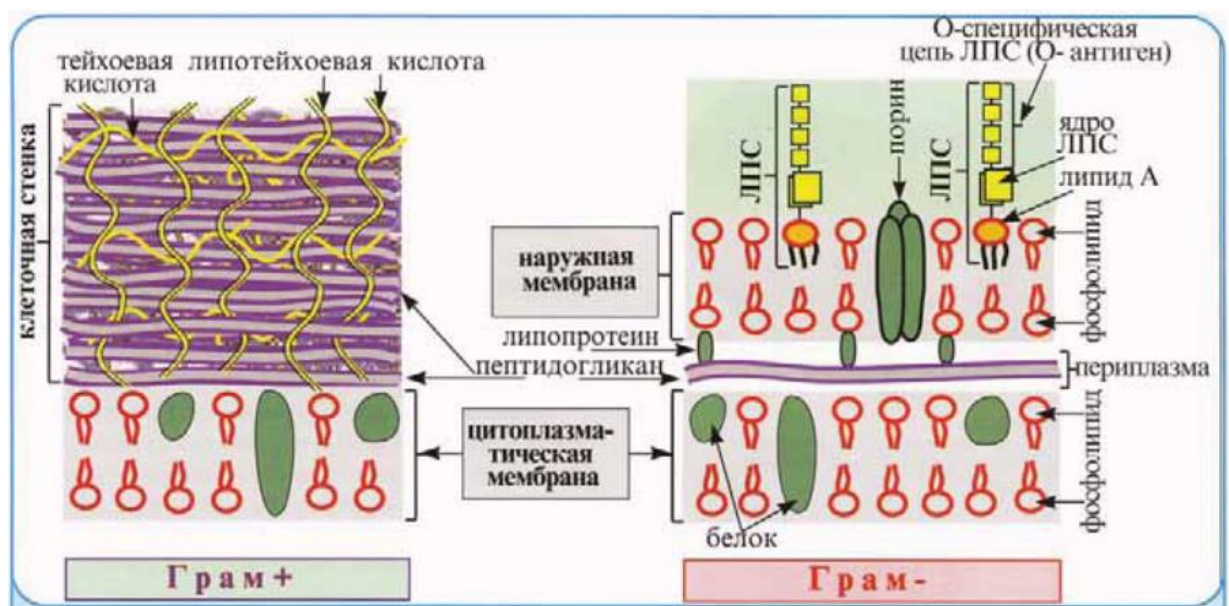


Рис. 4. Схема будови оболонок грамозитивних та грамнегативних бактерій (А.А. Воробйов, 2003).

Основним компонентом клітинної стінки грампозитивних бактерій є багат шаровий пептидоглікан (50-80% сухої маси клітини). Він має жорстку волокнисту структуру з пептидними поперечними зшивками. Товщина клітинної стінки у грампозитивних бактерій сягає 50 нм і більше. Така структура пептидоглікану забезпечує високу міцність бактеріальним клітинам, у тому числі резистентність до пошкоджуючих факторів, що супроводжують процеси заморожування-відтаювання. У грамнегативних бактерій пептидоглікан клітинної стінки становить 1-10% від сухої маси клітини. Він займає один шар. Зовні з шаром пептидоглікану, що підлягає, пов'язана зовнішня мембрана клітинної стінки грамнегативних бактерій. Вона є мозаїчною структурою з ліпополісахаридів, фосфоліпідів, білків. Клітинна стінка грамнегативних бактерій більш чутлива до процесів заморожування.

Умови культивування можуть суттєво впливати на склад та співвідношення компонентів цитоплазматичної мембрани (зокрема, співвідношення насичених та ненасичених жирних кислот), кількість молекул АТФ, кількість та склад ендоензимів, особливості ультраструктури та метаболізму, а також інші характеристики клітин, від яких залежить їх криорезистентність.

Фаза зростання періодичної культури також впливає на характеристики клітин, від яких залежить їх стійкість до заморожування. Клітини з логарифмічної фази росту більш чутливі до шкідливої дії заморожування в порівнянні з клітинами зі стаціонарної фази росту, тому що в клітинах з логарифмічної фази росту відбуваються найбільш активні метаболічні процеси а, отже, є значна кількість «мішеней», чутливих до фізико-хімічних факторів, що супроводжують процеси заморожування - відтавання.

Концентрація клітин у зразках, що заморожуються, впливає на виживання бактерій переважно при заморожуванні в суспензійних середовищах без кріопротекторів. У зразках з вихідною концентрацією  $10^{11}$  і більше клітин на 1 мл виживання бактерій значно зростає.

Склад консервуючого середовища та режим охолодження є найбільш значущими факторами, від яких залежить виживання бактерій у процесі кріоконсервування. Універсальних для всіх бактерій режимів охолодження та складів консервуючих середовищ немає. Як правило, розробляють технології кріоконсервування окремих родів. У ці технології входять і індивідуальні режими охолодження, і склади кріозахисних середовищ.

Для кріоконсервування бактерій в якості кріопротекторів використовують велику кількість різних хімічних речовин і сполук: диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, манітол, сорбітол, мальтозу, трегалозу та інші моно-, оліго-, полісахариди, етанол, етиленгліколь, пропіленгліколь, метилцелюлозу, декстран, інактивовану сироватку крові тварин, знежирене молоко, бактопептон, желатин та ін. Концентрації цих речовин та сполук у складі захисних середовищ коливаються від 3-х до 40%, найчастіше – від 5 до 10%. Механізми захисної дії перерахованих вище кріопротективних речовин щодо бактерій такі ж, як і щодо клітин та тканин

еукаріотів. У зазначених концентраціях ці кріопротективні речовини не мають токсичної дії на бактерії. Після кріоконсервування бактерії від кріопротекторів не відмивають.

Під час підготовки до процесу кріоконсервування бактерії не обов'язково переводити із ростового середовища у свіже середовище кріоконсервування. Найчастіше кріопротектор вносять прямо в бактеріальну культуру в ростовому середовищі. При необхідності кріоконсервування у водному розчині кріопротектора клітини осаджують центрифугуванням і ресуспендують у розчині кріопротектора. Час інкубації бактерій у захисному середовищі із кріопротекторами 15–30 хвилин.

Режими охолодження бактерій також різні. Одні види бактерій добре переносять і повільне, і швидке охолодження, інші – тільки повільне.

Для кріоконсервування більшості бактерій можна рекомендувати наступний режим охолодження: від кімнатної температури до  $-40^{\circ}\text{C}$  зі швидкістю 1–5 град/хв. та подальше занурення у рідкий азот.

Відтаюють зразки на водяній бані за температури 30–40 $^{\circ}\text{C}$ .

Нижче наведено приклади низки технологій кріоконсервування бактерій.

- Фототрофні бактерії. У ростове середовище (індивідуальне для конкретного виду фототрофних бактерій) додають один із кріопротекторів (6–9 % полівінілового спирту, 2–10% метанолу, 5–10% ДМСО, суміш із 5% ДМСО та 5% етиленгліколю). Після 30-хвилинної інкубації зразки заморожують зі швидкістю 1,5–3 град/хв. до мінус 40 $^{\circ}\text{C}$ , потім занурюють у рідкий азот.

- Бактерії із сімейства ентеробактерій. Бактерії вирощують у рідких середовищах на основі м'ясного бульйону та бактопептону. До бактеріальної культури додають один із кріопротекторів – гліцерин, сахарозу в концентрації 10%, або ДМСО у концентрації 5%. Після 15–30-хвилинної інкубації зразки занурюють у рідкий азот.

- Молочнокислі бактерії сімейства *Lactobacillus* та роду *Bifidobacterium*. Бактерії вирощують у поживному середовищі Блаурокка і осаджують центрифугуванням. Осаджену біомасу бактерій ресуспендують у захисному середовищі, що містить 2% сахарози, 5% знежиреного молока, 1% лактози. Кінцева концентрація бактерій становить  $10^{10}$ – $10^{11}$  КУО/мл. Заморожують зануренням зразків у рідкий азот.

- Ціанобактерії (синьо-зелені водорості). До вирощеної в рідкому ростовому середовищі культури ціанобактерій додають ДМСО у кінцевій концентрації 5–10%. Час інкубації ціанобактерій із ДМСО становить 30–60 хвилин. Після цього бактеріальну суспензію вносять у кріопробірки та заморожують. Спорогенні види ціанобактерій заморожують зануренням контейнерів або кріопробірок у рідкий азот, аспорогенні види – зі швидкістю охолодження 1–5 град/хв. до мінус 40 $^{\circ}\text{C}$ , потім занурюють у рідкий азот.

- Неспороутворюючі анаеробні бактерії (родів *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Mobiluncus*, *Veillonella*, *Peptostreptococcus*, *Peptococcus*). Після вирощування бактерії осаджують центрифугуванням і

ресуспендують у захисному середовищі до кінцевої концентрації  $10^8$ – $10^{10}$  КУО/мл. Склад консервуючого середовища: сухе тіогліколеве середовище – 33,0 г; пептон – 15,0 г; натрію тіогліколят – 1,0 г; натрію гідросульфід – 0,1 г; натрій фосфорнокислий двозаміщений – 1,0 г; хлористий калій – 1,0 г; тіомочевина 2 г; ДМСО – 5 мл; Твін-80 – 1,0 мл; поживний бульйон – до 1,0 л. Час інкубації 15 хв. Заморожують зразки до мінус 30°C зі швидкістю 2 град/хв., потім до мінус 80°C зі швидкістю 20–25 град/хв. і занурюють у рідкий азот.

- Бактерії *Streptococcus pneumoniae*. Після вирощування бактерії змивають з поверхні агаризованого середовища середовищем консервування (м'ясо-пептонний поживний бульйон з додаванням 30% сироватки великої рогатої худоби (ВРХ) або кінської сироватки, 0,01 мл, 1%-го геміну, 5% глюкози та 5% сахарози). Заморожують зразки зі швидкістю 1-2 град/хв. до мінус 30°C, потім зі швидкістю 20–25 град/хв. до мінус 80°C і занурюють у рідкий азот. Після кріоконсервування за описаними протоколами життєздатність бактерій становить 50–100 %, залежно від роду та виду.

## 6. Кріоконсервування вірусів

Віруси – облігатні внутрішньоклітинні паразити, які розмножуються лише в живих клітинах (рис. 5).

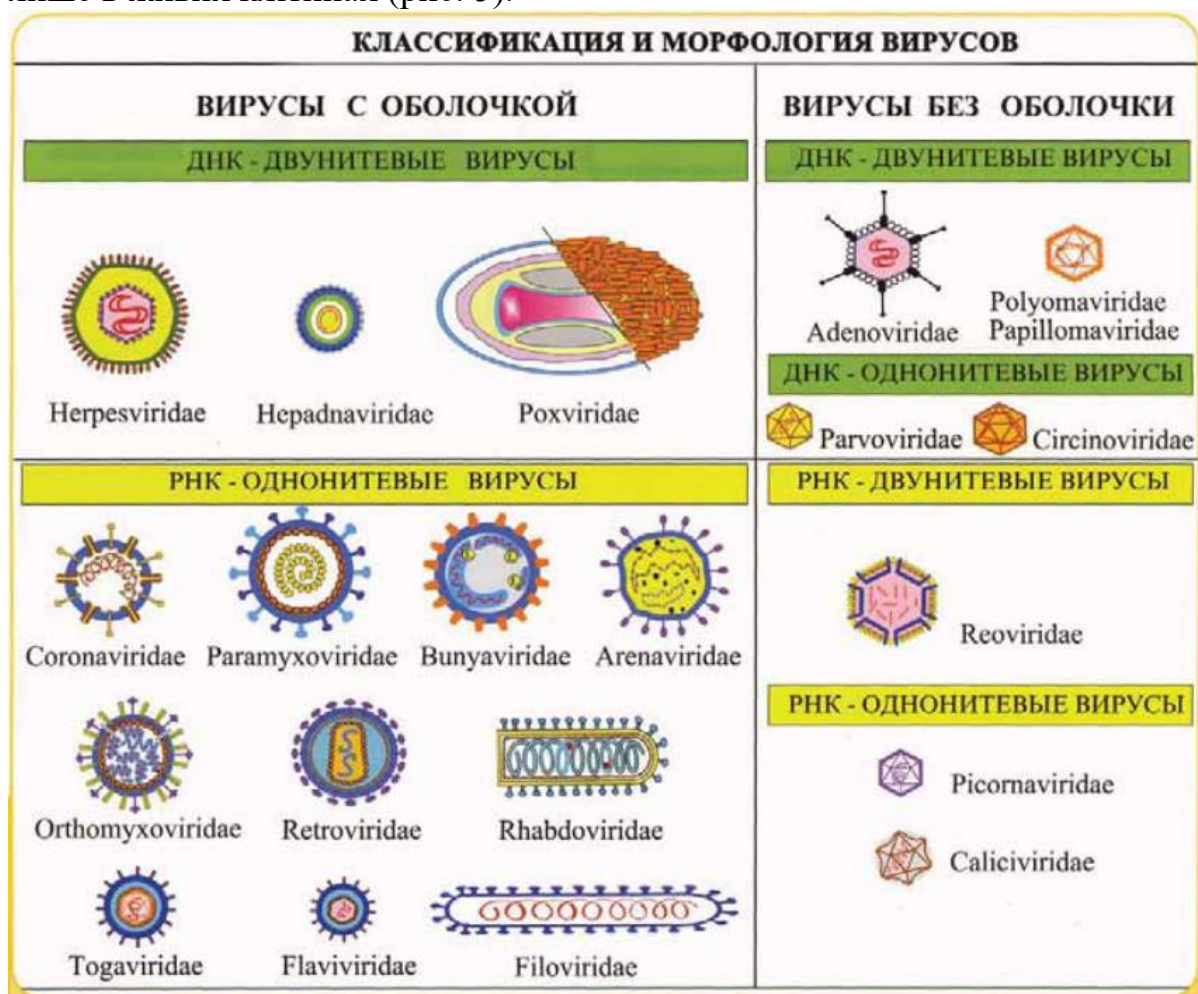


Рис. 5. Схема будови вірусів (А.А. Воробйов, 2003).

Найчастіше віруси розмножують у культурах клітин. Культури – вирощені *in vitro* у спеціальних рідких середовищах клітини, похідні різних тканин тварин та людини. Клітини вирощують до одержання клітинного моношару, після чого заражають вірусом. Поживні середовища, у яких культивують клітини, складні за складом. Вони містять необхідний набір солей, амінокислот, пуринів, піримідинів, вуглеводів, вітамінів з додаванням ембріональної сироватки. Переважно використовують живильні середовища 199, Ігла, DMEM, MEM, RPMI. Після репродукції вірусів середовище культивування містить велику кількість віріонів та фрагментів клітин, зруйнованих під час репродукції та виходу з клітин дочірніх віріонів.

Виділення із середовища культивування чистих препаратів вірусів – трудомістка та складна процедура. Тому для кріоконсервування застосовують матеріал на основі культуральних середовищ, у яких здійснювали репродукцію вірусу.

Після закінчення культивування вірусу культуральне середовище центрифугують для осадження клітин, в яких вирощували вірус, і відбирають надосадову рідину, що містить віріони. Потім до цієї надосадової рідини додають кріопротективні речовини. Отриману суспензію вірусів у захисному середовищі витримують при кімнатній температурі протягом 15–20 хвилин, розфасовують у кріопробірки або контейнери та заморожують.

Для кріоконсервування вірусів використовують наступні кріопротективні добавки в кінцевих концентраціях:

- ембріональна сироватка ВРХ, інактивована сироватка крові ВРХ або коней у концентрації 10–20%;
- ДМСО у концентрації 5–10 % (0.73М – 1.46М);
- гліцерин у концентрації 10% (1.11М);
- сироватковий альбумін людини у концентрації 0,1–4%;
- сахароза, трегалоза, або сорбітол у концентрації 10%;
- бактопептон чи знежирене молоко у концентрації 5–10 %;
- 5% (0.55М) гліцерин + 5% (0.7М) ДМСО + 5% ембріональної сироватки ВРХ;
- 5% сахарози + 0,2% сироваткового альбуміну людини.

Віруси, суспендовані із зазначеними вище кріопротективними добавками, меншою мірою, порівняно з бактеріями та дріжджами, чутливі до режиму охолодження. Тому їх заморожують прямим зануренням кріопробірок та контейнерів у рідкий азот або розміщенням у парах азоту.

Деякі віруси вирощують у 7-13 – денних курячих ембріонах та в організмі сприйнятливих лабораторних тварин. У цих випадках тканини курячого ембріона та фрагменти внутрішніх органів тварин подрібнюють та гомогенізують. Розтерті органи заливають фосфатним буфером (рН=7–8) з додаванням антибіотика широкого спектра дії і готують 10% завис. Отриману суспензію центрифугують 15-20 хв. при 1000g. Відбирають надосадову рідину, що містить віріони, додають одну з кріозахисних добавок, зазначених вище, розливають у кріопробірки або контейнери і заморожують.

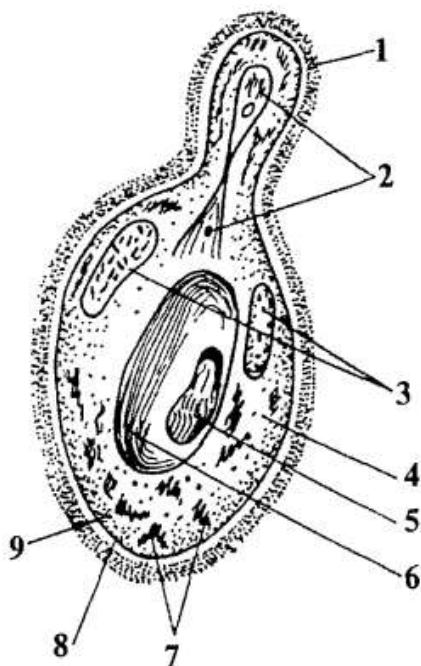
Основним механізмом кріопошкодження віріонів при заморожуванні-відтаванні є осмотичний шок: гіпертонічний шок на етапі заморожування з високими швидкостями охолодження та гіпотонічний шок на етапі нагрівання після заморожування з низькими швидкостями охолодження. Під впливом осмотичного шоку відбувається пошкодження капсиду у простовлаштованих вірусів та капсиду з суперкапсидом у складно влаштованих вірусів з виходом нуклеїнової кислоти у навколишнє середовище.

Життєздатність вірусів після кріоконсервування в залежності від виду може знижуватись на 0,1–0,5lg від вихідного інфекційного титру.

## 7. Кріоконсервування грибів

### 7.1 Кріоконсервування дріжджів та дріжджоподібних грибів.

Дріжджі – одноклітинні гриби (рис. 6). Мають округлу або еліпсоїдну форму. Розмір від 25 до 10 мкм. Можуть жити як у гаплоїдній, так і у диплоїдній формах. Гаплоїдні клітини розмножуються лише вегетативним шляхом – утворенням бруньок. За будовою дріжджі відносяться до нижчих еукаріотів. Мають усі клітинні структури, характерні для еукаріотів – тришарову клітинну стінку, цитоплазматичну мембрану, ядро, мітохондрії, 80S рибосоми, цитоплазму з включеннями.



**Рис. 6. Схема будови клітини дріжджів (Воробйов А.А., 2004):** 1 – клітинна стінка, 2 – ядро, що ділиться, 3 – зерна глікогену, 4 – цитоплазма, 5 – метакроматин, 6 – вакуоль, 7 – мітохондрії, 8 – клітинна мембрана, 9 – рибосоми.

Необхідність у кріоконсервуванні колекційних видів та стартових культур дріжджів обумовлена їх широким застосуванням у харчовій промисловості – у виробництві хлібобулочних виробів, етилового спирту, у виноробстві та пивоварінні. Дріжджі використовують також у виробництві медичних препаратів, продуктів дієтичного харчування, кормів для сільськогосподарських тварин.

Дріжджоподібні гриби – одноклітинні гриби округлої форми. Від справжніх дріжджів відрізняються наявністю псевдоміцелію та відсутністю

аскоспор. Вони мають усі структури, властиві еукаріотичним клітинам. Є збудниками грибкових захворювань людини, якими на сьогодні страждає 1/5 частина населення Землі.

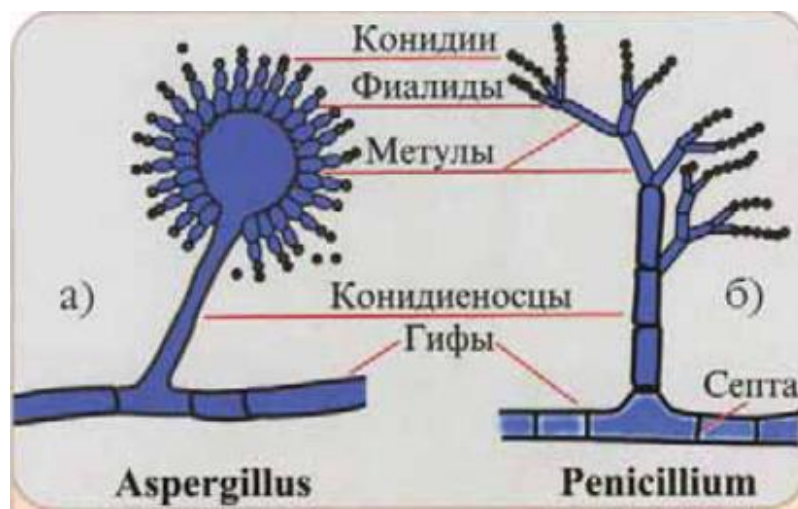
Колекції дріжджоподібних грибів створюють для епідеміологічного моніторингу участі різних видів цих грибів у патогенезі захворювань людини та сільськогосподарських тварин, для розробки нових антифунгальних препаратів та препаратів специфічної профілактики.

Для кріоконсервування дріжджів та дріжджоподібних грибів використовують такі консервуючі середовища: 5–10%-й (0.7 – 1.41M) розчин ДМСО; ростове середовище на основі пивного суслу (8% сухих речовин за Балінгом) з додаванням 5% (0.7M) ДМСО або 5% (0.55M) гліцерину. Час інкубації – 20 хвилин. Зразки охолоджують зі швидкістю 1–5 град/хв. до мінус 40°C, потім занурюють рідкий азот. Відтають зразки у водяній бані за температури 30°C.

Після кріоконсервування за описаними протоколами зберігаються життєздатними 85–100% клітин дріжджів та дріжджоподібних грибів.

### 7.2 Кріоконсервування міцеліальних грибів.

Міцеліальні гриби – багатоклітинні нефотосинтезуючі мікроорганізми з клітинною стінкою (рис. 7).



**Рис. 7. Схема будови міцеліальних грибів (Воробйов А.А., 2003): а – *Aspergillus*; б – *Penicillium*.**

Вони належать до вищих еукаріотів. Мають ядро з ядерною оболонкою, цитоплазму з органелами, цитоплазматичну мембрану, багатшарову клітинну стінку, що складається з кількох типів полісахаридів (маннанів, глюканів, целюлози, хітину), білків, ліпідів. Цитоплазматична мембрана містить глікопротеїни, фосфоліпіди та ергостероли. Тіло гриба називають талломом. Міцеліальні гриби утворюють тонкі нитки (гіфи), що гілкуються, сплітаються в грибницю – міцелій. Гіфи, які вростають у поживний субстрат, називаються вегетативними гіфами (відповідають за харчування гриба). Гіфи, що ростуть над поверхнею субстрату, –

репродуктивними гіфами (відповідають за безстатеве розмноження). Гіфи нижчих грибів не мають перегородок, гіфи вищих грибів розділені перегородками.

Міцеліальні гриби використовують у виробництві харчових продуктів та як продуценти антибіотичних та ферментних препаратів для медицини та ветеринарії. Це також зумовлює необхідність їхнього кріоконсервування в колекціях та банках.

Для кріоконсервування міцеліальних грибів використовують такі середовища консервування: 5% (0.5M) розчини ДМСО або (0.55M) гліцерину, 10% розчин лактози, 10% знежирене молоко. Час інкубації – 20 хвилин. Зразки заморожують зануренням рідкий азот, відтаюють у водяній бані при 30°C.

Після кріоконсервування у захисних середовищах зберігається 20–90 % грибів залежно від роду.

## Контрольні питання

1. Будова та фізіологія клітин бактерій, грибів, найпростіших.
2. Будова та репродукція вірусів.
3. Методи оцінки життєздатності та метаболічної активності бактерій, грибів, найпростіших.
4. Методи оцінки життєздатності вірусів.
5. Етапи технології кріоконсервування мікроорганізмів.
6. Вплив будови клітин бактерій та грибів на їх вихідну кріорезистентність.
7. Вплив умов культивування (склад ростового середовища, аерація, температура культивування) та фази росту періодичних культур на життєздатність бактерій і дріжджів під час зберігання за низьких температур та на етапах процесу ліофілізації.
8. Чинники, які впливають на життєздатність мікроорганізмів на етапах процесу кріоконсервування: склад консервуючих середовищ, концентрація клітин у зразках, режими охолодження та нагрівання.
9. Вплив складу захисних середовищ, температури та термінів зберігання під час зберігання мікроорганізмів від  $-20$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ .
10. Найбільш вживані середовища консервування за низьких температур бактерій та грибів.
11. Кріоконсервування вірусів: середовища консервування, режими охолодження-нагрівання. Зберігання вірусів за температур від  $-20$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## ЛІТЕРАТУРА

1. Варяница В.В., Высеканцев И.П. Методы хранения сложных РНК-содержащих вирусов. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017, Т. 27(4):287–296.
2. Криобиология и биотехнология / Цуцаева А.А., Попов В.Г., Сытник К.М. и др.; Под общ. Ред. Цуцаевой А.А. Киев: Наук. думка, 1987. 216с.
3. Пирог Т.П., Антонюк М.М., Скроцька О.І., Кігель Н.Ф. Харчова біотехнологія: підручник. К.: Ліра-К, 2016. 408 с.
4. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студентів вищих медичних навчальних закладів IV рівня акредитації / За редакцією академіка НАН України В.П.Широбокова.– Вінниця: Нова Книга, 2011.– 952с.
5. Пирог Т.П., Ігнатова Т.П. Загальна біотехнологія : підручник. К.: НУХТ, 2009. 336 с.
6. ATCC Virology Guide. Tips and techniques for propagating virus in tissue culture and embryonated chicken eggs. Manassas: ATCC, 2016. 32 p.
7. Біотехнологія: підручник / В. Г. Герасименко, М. О. Герасименко, М. І. Цвіліховський та ін. ; за заг. ред. В. Г. Герасименка. – Київ : Інкос, 2006. – 647 с.
8. Олефір А. До проблеми правової охорони біотехнологій // Теорія і практика інтелектуальної власності. – 2015. – № 1 (81). – С. 71–83.
9. Капрельянц Л.В. Пребиотики: химия, технология, применение : монография . Киев : ЭнтерПринт, 2015. – 252 с.
10. Капрельянц Л.В., Пирог, Т. П., Пенчук Ю.М. Біохімічні основи мікробного синтезу. Київ : Ліра-К, 2019. – 258 с.
11. Харчова біотехнологія [Електронний ресурс] : наук.-допом. бібліогр. покажч. / [упоряд. О. В. Олабоді] ; Нац. ун-т харч. технол., Наук.-техн. б-ка. – Київ, 2021. – 136 с.

Висеканцев І.П.  
Гуріна Т.М.  
Устиченко В.Д.

**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ МІКРООРГАНІЗМІВ**

Методичні рекомендації для самостійної роботи  
аспірантів 2 курсу

галузь знань 09 Біологія  
спеціальність 091 Біологія

Дисципліна «Методи тривалого зберігання мікроорганізмів»

Електронний ресурс. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2022.