

Nové poznatky o uchovávání produkčních kmenů mikroorganismů

Ing. HANA RYŠÁNOVÁ, Výzkumný ústav antibiotik a biotransformací, Roztoky u Prahy

Klíčová slova: konzervace, lyofilizace, skladování konzerv, ochranná média, kryoprotektiva

Úvod

Konzervace produkčních kmenů mikroorganismů lyofilizací se v našem ústavu provádí od roku 1962. Lyofilizační technika až do dnešní doby prošla dalším vývojem nejen v zahraničí ale i v ČSSR. Při šlechtění mikroorganismů je nezbytně nutné vypracovat takový způsob konzervace, který zaručuje uchovávání získaných vlastností kultur. Jedna z vhodných metod je lyofilizace. Tato technika se v průběhu let vyvíjela a o její zdokonalení se zasloužily jednak vhodně upravené lyofilizační aparatury, jednak nové poznatky o lyofilizačních médiích s účinnými protekčními vlastnostmi.

Další vhodnou metodou je konzervace produkčních kmenů mikroorganismů tekutým dusíkem, která se v současné době stále častěji pro své dobré výsledky používá. Mnozí autoři zkoušejí různé způsoby uchovávání bakteriálních kmenů, vhodnost protekčních médií, různé teploty a dobu při uskladnění lyofilizačních konzerv a uchovávání mikrobiologických materiálů v tekutém dusíku.

Šourek [1] sledoval řadu jednoduchých a složených lyofilizačních prostředí v protekčním účinku na životnost více než 50 bakteriálních rodů patogenních mikroorganismů. Za podmínek užití lyofilizační techniky ukázala optimální výsledky směs telecího séra nebo beraní defibrinované krve s roztokem laktosy (do finální koncentrace 5 až 10 %) a Annaerovo médium s peptonem.

Antheunisse [2] pěstoval kultury baktérií, kvasinek a hub v obyčejném agarovém médiu ve zkumavkách. Přibližně za týden po maximálním nárůstu byly vatové zátky nahrazeny aseptickými pryžovými zátkami. Kultury byly dále uchovávány ve tmě při pokojové teplotě nebo při 4 °C. Testy životnosti byly provedeny v intervalech mezi 1 až 10 léty.

Antheunisse [3] lyofilizoval bakterie, kvasinky a houby v médiu skládajícím se z 5 % dextranu a 1 % glutamátu sodného při pH 7. Konzervy s lyofilizátem byly uchovávány ve tmě a při pokojové teplotě. Po 6 letech uskladnění byla provedena zkouška životnosti organismů. Ze 48 druhů přežilo 31 velmi dobře (tj. 80 až 100 %) a 9 méně úspěšně (tj. z 50 až 80 %), nebo nepřežilo. Mnoha druhům z rodu *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Lipomyces* a *Microcyclus* se nepodařilo přežít vůbec. Výsledky tohoto experimentu byly porovnány se stejnými druhy baktérií, uchováva-

ných jiným způsobem, a sice na šikmé agarové půdě v uzavřené zkumavce.

Shipper *et. al.* [4] se v roce 1976 rozhodli, že by bylo vhodné vyzkoušet životnost mikroorganismů z nejstarších lyofilizačních preparátů. K tomuto účelu byly vybrány konzervy 17 až 18 let staré, kde hlavní místo zaujímají především kmeny *Penicillium* a *Aspergillus*. Obsah každé konzervy byl rehydratován 2 ml sterilní vody, přeočkován na vhodnou půdu a inkubován při 25 °C. Mikroorganismy z testovaných konzerv rostly při různých teplotách a osvětlení. Výsledek testu životnosti kultur byl takový, že 91 kultur ze 100 bylo živých. Ty, které nenarostly, zřejmě trpěly nedostatkem vzduchu (vakuum) během doby uchovávání.

Hubálek [5] testoval 20 druhů kvasinek 17 rodů na přežití v tekutém dusíku při -196 °C, kde byly uloženy po dobu 75 dní. Protekční prostředí obsahovalo: sladový extrakt (2,5 %), kvasničný extrakt (0,25 %), pepton (0,5 %), telecí sérum (15 %) a dimethylsulfoxid (10 %). Životnost buněk v tomto médiu po rychlém nekontrolovaném zmrazení a roztání v pevně uzavřených plastických ampulích dosahuje 2 až 98 %, průměrně 67 % při porovnání s životností buněk před zmrazením. Pouze u 4 rodů bylo přežití nižší než 50 %.

Smentek [6] sledoval uchovávání 140 kmenů kvasinek v tekutém dusíku při -196 °C se zřetelem na složení ochranného média. Nejlepší výsledky byly získány s ochrannou směsí obsahující dimethylsulfoxid, Skim Milk a Ficoll 400, kde 74 % zkoušených kmenů vykazovalo přežívání buněk vyšší než 60 %.

Belichova [7] pěstovala mycelium a spory různých hub na agaru. Kultury byly převedeny do roztoku 10 % glycerinu a rychle zmrazeny v tekutém dusíku na dobu delší než 24 hodin. Pak byly rychle zahřáty na 38 až 40 °C pro zjištění životnosti. Ze 38 zkoušených kultur pouze 5 nenarostlo a ostatní byly živé. Po dlouhodobém uchovávání kultur hub byla prokázána celková redukce hladin (aktivit) enzymů. Jejich aktivita nebyla zcela obnovena ani po několikerém pasážování.

Gilmour [8] uvedl jednoduchý způsob, vhodný pro ochranu gramnegativních anaerobních ale i ostatních baktérií v tekutém dusíku. Polypropylenová stěbla byla použita jako speciální pouzdra a jejich úsporné rozměry umožnily skladování většího množství kultur. Jako kryoprotektiva bylo použito 0,4 mol.l⁻¹ polyvinylpyrrolidonu. Ten byl svými vlastnostmi lepší než glycerol

nebo dimethylsulfoxid. Všechny mikroorganismy byly po 1 roce uchovávány v tekutém dusíku schopny ožít.

Břemek [9] zjistil, že uchovávání kultury po dobu 1 týdne při 4°C po ukončení růstu a sporulace kultury má pozitivní vliv na produkci alkaloidů. Produkce se zvýšila až o 15 %. Nejlepší výsledky z užitých ochranných médií byly získány při použití média tohoto složení: 2 % hmotn. želatiny a 1,2 % hmotn. glukosy. Při testování metody skladování konidíí zkoumaných kmenů v tekutém dusíku bylo jako kryoprotektivního média užito inaktivovaného koňského séra s 10 až 20 % glycerolu. Zmrazovací proces kultury velmi dobře přežily.

Uchovávání kmenů v kapalném dusíku řeší problém nestability konzervovaného biologického materiálu s časem [10]. Například u *Streptomyces aureofaciens* nebyl zjištěn pokles produkce chlortetracyklinu v průběhu skladování ve srovnání s hodnotou stanovenou ihned po zakonzervování. U lyofilizovaných kmenů byl tento pokles velmi častý. Pro zmrazení se osvědčila média běžně užívaná při lyofilizaci streptomycet s přidávkou 10 % glycerolu. Izoláty jsou uloženy v polyetylenových polštářcích, které oproti skleněným ampulím jsou při manipulaci mnohem pohodlnější a bezpečnější.

Ve Výzkumném ústavu antibiotik a biotransformací se používá lyofilizační metoda pro uchovávání produkčních kmenů mikroorganismů produkujících antibiotika na přístroji LZ-9C z n. p. Frigera Kolín.

Homogenizace bakteriální kultury v lyofilizačním médiu

Jako média se používá většinou aseptického inaktivovaného koňského séra, roztoku želatiny s glukosou (5 % a 5 %) nebo média Skim Milk (15 %). Povrch narostlých bakteriálních kultur v Endově agaru se řádně smyje tímto médiem a plní pipetou do lyofilizačních zkumavek do výše 1 cm. Vše se provádí přísně asepticky.

Předmrazení kultury

Provádí se přímo v lyofilizačním zařízení Frigera nejdéle do 1 hodiny po rozplnění. Doba namrazení je asi 1 až 1,5 hodiny při dosažení maximální teploty produktu —35 až —40°C.

Vlastní dehydratační proces — sušení

Po zmrazení produktu se zapne vývěva a tlak se ve vakuové skříni sníží až na hodnoty nižší, než je tenze páry nad ledem. Při sublimaci, jež je pochodem endotermickým, by se látka dále ochlazovala, proto se musí teplo postupně zvolna dodávat tak, že z počátku je teplota nižší než 0°C. Při dosušení se zvyšuje (až na 25 až 28°C). Jakmile produkt dosáhne této teploty, je vysušen a lyofilizace je skončena. Proces mrazení a sušení trvá přibližně 10 až 14 hodin. Vlhkost finálního produktu se zpravidla pohybuje kolem 1 až 2 %. Teplotu produktu během sušicího procesu kontrolujeme kontaktním teploměrem, ponořeným do obsahu lyofilizátu v jedné ampulce.

Kapilarizace a zatavení pod vakuem

Jeden den po lyofilizaci se zkumavky s obsahem kultury asi v polovině délky naříznou, zkrátí a v boxu se uzavřou aseptickými vatovými zátkami. Ochranný obal konzervy je větší zkumavka (rozměry 140 × 14 mm), do které se současně vkládají etikety s názvem kultury a indikátor vlhkosti (proužek filtračního papíru, nasyceného 3% roztokem CaCl_2) s datem provedené lyofilizace. Zkumavky se po kapilarizaci a následné evakuaci 5 až 10 min zatavují pod vakuem. Přítomnost vakua je možno ověřit přidáním zařízení lyofilizačního přístroje Speedivac Gauge, model B5 (firma Edwards Haigh Vacuum Ltd.) na principu fialově zbarveného záření v ionizovaném prostoru evakuované zkumavky.

Skladování konzerv

Konzervy jsou uloženy ve skříňových lednicích při teplotě 5°C pod pořadovým číslem lyofilizace. Jedenkrát za 2 až 3 roky se provádí revize jejich kvality.

Kromě uvedených metod je potřeba se zmínit o významných faktorech, ovlivňujících samotný lyofilizační proces. Jsou to především:

a) volba a význam vhodného média, b) proces předmrazení, c) druh a stáří kultury, d) proces sušení, doba sušení, e) podmínky při skladování kultur, teplota, účinky světla, f) rehydratace.

a) Volba lyofilizačního média pro jednotlivé druhy bakterií je velmi důležitá, zvláště u bakterií s některými labilními vlastnostmi. Základní kritéria protektivní hodnoty lyofilizačního prostředí lze shrnout takto:

1. ochrana proti účinkům nízkých teplot —70 až —196°C při rychlém zmrazení,

2. ochrana proti účinkům vyšších teplot ve vysokém vakuu při sušení,

3. ochrana proti účinkům rehydratace.

Medium kromě svých ochranných vlastností zajišťuje dále maximální rozpustnost jednotlivých složek a jejich stabilitu v roztoku. Chrání buňky bakterií před nepříznivými vlivy chemických reakcí, přejímá i vlastnosti pufru a nesmí ovlivňovat antigenní ani ostatní charakteristické vlastnosti kultury [11].

b) Efekt předmrazení produktu [11] je velmi důležitý, neboť kdyby se sušily buňky při pokojové teplotě, došlo by k jejich nevratnému poškození silami povrchového napětí. Jakmile se však buňky nejprve zmrazí, voda může sublimovat z ledových krystalů při relativně nízké teplotě bez pozorovatelných cytologických změn. Dalším faktorem při lyofilizaci je rychlost zmrazování produktu. Optimální rychlost zmrazování buněk je 1°C za minutu.

c) Dalším činitelem je druh mikroorganismů [11]. Uvádí se, že rezistence k lyofilizaci je ve vztahu k buňčné stěně, její stavbě a tloušťce. Obecně jsou podle toho odolnější grampozitivní bakterie oproti gramnegativním. V neposlední řadě je významné i stáří kultury použité pro lyofilizaci. Je potvrzeno, že buňky ve stationární fázi růstu jsou méně citlivé na nepříznivé vlivy mrazení a sušení. Zpravidla se doporučuje použít k lyofilizaci populace buněk na počátku této fáze.

d) Při správné dehydrataci lze pozorovat tvorbu sušiny postupující od hladiny suspenze směrem dolů, spojenou i se změnou barvy. Standardní růstovou hodnotu dává vždy sušina uložená na dně zkumavky ve tvaru „zátky“ [11]. Sušení nejvyšší vrstvy lyofilizovaného materiálu probíhá rychle, později se zpomaluje tím, že vodní pára difunduje z nižších, ještě led obsahujících vrstev, přes vrstvu již vysušenou. Bakteriální suspenze se nesmí na začátku ani během evakuace při sušení rozpustit. Tento případ jsme zjistili u některých streptomycet, u nichž se používalo jako média želatiny (5% želatina, 5% glukosa). Lyofilizát se po 10 až 12 hodinách sušení zcela roztekl. Doba sušení bude zřejmě nutno prodloužit o další 4 až 6 hodin při max. teplotě sušení 25 až 28°C a navíc též změnit obsah želatiny na 1 % při zachování 5 až 10 % obsahu glukosy a pH 7,2 až 7,4.

Za nejúčinnější dehydrataci je považována ta, která je provedena v co nejkratší době, aby se zabránilo nepříznivým vlivům, k nimž dochází při pomalé dehydrataci. Všechny úseky pracovního procesu jsme zkrátili tak, že doba sušení je 10 až 14 hodin. Za tuto dobu je produkt zcela suchý a navíc se ušetří elektrická energie.

e) Podmínky skladování. Atmosféru uvnitř ampulky může tvořit vzduch, inertní plyn nebo vakuum. Vodní páry a kyslík ze vzduchu však působí na buňky nepříznivě. Proto se z konzerv, určených pro dlouhodobé uskladnění, vzduch před zatavením odstraní. Teplota při skladování ampulí: čím je skladovací teplota vyšší, tím je nižší životnost buněk i při použití nejvhodnějších médií. Optimální skladovací teplota pro bakterie je mezi 4 až 6°C. Účinky světla na životnost lyofilizované bakteriální kultury jsou zhoubné a způsobí jejich smrt v poměrně krátkém čase.

f) Při rozpouštění lyofilizátu pro očkování na půdy živného agaru používáme pouze aseptickou destilovanou vodu.

Dalším způsobem konzervace bakteriálních buněk, hlavních buněk, krve, tkáňových řezů atd. je uchovávání v tekutém dusíku. V naší kmenové sbírce jsme