

## Жизнеспособность споровой культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ-25А' после воздействия некоторых факторов процесса лиофилизации

А.А. ЦУЦАЕВА<sup>1</sup>, А.Е. АНАНЬИНА<sup>1</sup>, Н.В. ПАВЛЕНКО<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковский государственный медицинский университет

## Viability of *Streptomyces fradiae* VNIIG-25' Spore Culture after Some Factor Effect of Freeze-Drying Process

TSUTSAYEVA A.A.<sup>1</sup>, ANANYIINA A.E.<sup>1</sup>, PAVLENKO N.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy  
of Sciences of the Ukraine, Kharkov

<sup>2</sup>Kharkov State Medical University

Изучали влияние показателей остаточной влажности и способов регидратации на жизнеспособность и антибиотическую активность после лиофилизации споровой культуры *S. fradiae* ВНИИГ-25А'. Показано, что для получения высокоактивных образцов лиофилизированной микробной культуры оптимальные показатели остаточной влажности соответствовали 1,0-2,0% и регидратация проводилась при одномоментном добавлении дистиллированной воды с последующей экспозицией в течение 1 ч при температуре 20°C.

**Ключевые слова:** микроорганизмы, лиофилизация, остаточная влажность, регидратация.

Вивчали вплив показників залишкової вологості і способів регідратації на життєздатність і антибіотичну активність після ліофілізації спорової культури *S. fradiae* ВНДІГ-25А. Показано, що для одержання високоактивних зразків ліофілізованої микробної культури оптимальні показники залишкової вологості відповідали 1,0-2,0% і регідратація проводилась при одномоментному додаванні дистильованої води з подальшою експозицією на протязі 1 год при температурі 20°C.

**Ключові слова:** мікроорганізми, ліофілізація, залишкова вологість, регідратація.

There was studied the effect of residual humidity indices and rehydration ways on the viability and antibiotic activity after freeze-drying of *Streptomyces fradiae* VNIIG-25' spore culture. It was demonstrated, that in order to obtain the highly active samples of frozen-dried microbial culture the optimal indices of a residual humidity corresponded to 1.0-2.0% and the rehydration was carried-out by one-step addition of distilled water with following exposure for 1 hr under 20°C.

**Key words:** microorganisms, freeze-drying, residual humidity, rehydration.

Биологические объекты на этапах перевода их в состояние глубокого холодого анабиоза способом лиофилизации подвергаются в разной степени отрицательному воздействию физико-химических факторов, приводящих к изменению морфофункциональных свойств. Степень сохранности микроорганизмов зависит от параметров сублимационного процесса [1, 6, 7], важными из которых являются остаточная влажность и способ регидратации лиофилизированных образцов [2].

Цель настоящей работы – изучение влияния показателей остаточной влажности и способа регидратации на жизнеспособность и специфическую активность лиофилизированной споровой культуры *S. fradiae* ВНИИГ-25А'.

### Материалы и методы

В опытах использовали споровую культуру *S. fradiae* ВНИИГ-25А' (продуцент антибиотика тилозина), выращенную на твердой питательной

Biological objects at the stages of their transfer into the state of deep cold anabiosis by freeze-drying are differently subjected to a negative effect of physical and chemical factors, resulting in a change of morpho-functional properties. The integrity extent for microorganisms depends on the parameters of sublimation process [1, 6, 7], among them the important ones are residual humidity and rehydration way for frozen-dried samples [2].

The aim of the work was to study the effect of residual humidity indices and rehydration way on the viability and specific activity of frozen-dried *S. fradiae* VNIIG-25' spore culture.

### Materials and methods

The *S. fradiae* VNIIG-25' spore culture (producent of tylosin antibiotic), cultured on the CP-15 solid nutrient medium with caffeine under 0.1 mg/ml final concentration for 10 days at 28°C, was used in the experiments [8].

**Адрес для корреспонденции:** Цуцаева А.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Перейславская, 23, Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7720126, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

**Address for correspondence:** Tsutsayeva A.A., Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7720126, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua.

среде CP-15 с кофеином в конечной концентрации 0,1 мг/мл в течение 10 сут при 28°C [8].

Образцы для лиофилизации готовили следующим образом: споровую микробную культуру после 10 дней культивирования смывали дистиллированной водой объемом 5 мл со скошенной агаризованной питательной среды и центрифугировали в течение 15 мин при 4000 об/мин. После удаления надосадочной жидкости к осадку добавляли 10%-е обезжиренное молоко в таком количестве, чтобы концентрация спор в суспензии составила  $1 \times 10^8$  кл/мл. Полученную споровую суспензию разливали в пенициллиновые флаконы по 1 мл.

Ллиофилизацию споровой культуры проводили на установке УЗВ-2 (СКТБ с ОП ИПКиК НАН Украины, г. Харьков). Замораживали образцы со скоростью 1°C/мин до -20°C (начальная температура сушки) на полках установки с последующей сублимацией. Остаточное давление в камере при сублимации соответствовало 0,013-0,018 Па.

Количество жизнеспособных клеток определяли по числу сформировавшихся макроколоний на твердой питательной регламентной среде CP-15 в течение 10 сут при температуре 28 °C [5].

Антибиотическую активность культуры до и после лиофилизации определяли диффузным методом с применением лунок в толще агаризованной питательной среды. В качестве тест-культуры использовали *Bacillus subtilis*, штамм 720 [3].

Остаточную влажность образцов определяли в процентах общепринятым весовым методом [2].

Статистическую обработку полученных результатов проводили общепринятыми методами [4].

### Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов изучали влияние различных значений остаточной влажности на количество жизнеспособных клеток и их специфическую активность после лиофилизации.

При остаточной влажности 0,1-0,5% в лиофилизированных образцах отмечалось достоверное уменьшение как количества жизнеспособных клеток, так и их антибиотической активности (табл.1).

При значениях остаточной влажности 1,0-2,0 и 3,0-4,0% количество жизнеспособных клеток и их специфическая активность после лиофилизации достоверно не изменялись.

После месяца хранения лиофилизированных образцов с разными значениями остаточной влажности при 4°C было установлено, что при остаточной влажности, 0,1-0,5 и 3,0-4,0% отмечалось достоверное снижение как количества жизнеспособных клеток, так и их антибиотической активности по сравнению со значениями этих показателей после лиофилизации (табл.2).

В следующей серии экспериментов изучали влияние способов регидратации лиофилизирован-

The samples for freeze-drying were prepared in the following way: a spore microbial culture after 10 days of culturing was washed with 5 ml of distilled water out of a sloping agarised nutrient medium and centrifuged for 15 min under 4000 rpm. After removal of a supernatant liquid, 10% skimmed milk was added to the sediment in such amount, that the spore concentration in the suspension would make  $1 \times 10^8$  cells/ml. The obtained spore suspension was put into penicillin flasks by 1ml.

The spore culture freeze-drying was carried-out with UZV-2 device (Special Design & Construction Bureau with Experimental Unit of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov). The samples were frozen with 1°C/min rate down to -20°C (initial temperature of drying) on the device shelves with following sublimation. A residual pressure in a chamber during sublimation corresponded to 0.013-0.018 Pa.

The amount of viable cells was determined by a number of formed macrocolonies on a solid nutritive reglementary medium CP-15 for 10 min under 28°C [5].

An antibiotic activity of culture before and after freeze-drying was determined using a diffusive method with application of wells in the agarised nutritive medium depth. As the test-culture we used *Bacillus subtilis*, strain 720 [3].

The residual humidity of the samples was determined in percentage with a standard weight method [2].

The obtained results were statistically processed with the traditionally used methods [4].

### Results and discussion

In the first series of the experiments we studied the influence of different values of residual humidity on a number of viable cells and their specific activity after freeze-drying.

At a residual humidity, equal to 0.1-0.5%, a considerable and true decrease in both viable cells number and their antibiotic activity was observed in the frozen-dried samples (Table 1).

Under residual humidity values of 1.0-2.0 and 3.0-4.0% a number of viable cells and their specific activity after freeze-drying did not statistically and significantly change.

After one month storage of frozen-dried samples with different values of residual humidity under 4°C we established, that under residual humidity of 0.1-0.5 and 3.0-4.0% a considerable and true decrease in both number of viable cells and their antibiotic activity in comparison with these indices values after freeze-drying was observed (Table 2).

In the following experiment series we studied the effect of rehydration ways for the *S. fradiae* VNIIG-25' frozen-dried spore culture on viable cells number and their specific activity. The rehydration was

ной споровой культуры *S. fradiae* ВНИИГ-25 А' на количество жизнеспособных клеток и их специфическую активность. Регидратацию проводили 4 способами: 1 – одномоментное добавление дистиллированной воды в пенициллиновые флаконы до исходного объема, флаконы встряхивали и оставляли на 5 мин при температуре 20°C с последующим определением колониеобразующей способности и специфической активности; 2 – одномоментное добавление дистиллированной воды до исходного объема, встряхивание флаконов с последующей экспозицией в течение 1 ч при температуре 20°C; 3 – дробное добавление в образцы дистиллированной воды до исходного объема в 4 приема (через каждые 15 мин в течение 1 ч); 4 – образцы лиофилизированной споровой культуры в открытых пенициллиновых флаконах оставляли на 24 ч во влажной камере с обеспечением их стерильности.

Использование 1-, 3- и 4-го способов регидратации лиофилизированной микробной культуры приводило к достоверному снижению количества жизнеспособных клеток и их антибиотической активности (табл. 3).

Высокие показатели жизнеспособности и антибиотической активности споровой лиофилизированной микробной культуры были получены при регидратации образцов способом 2. Результаты

**Таблица 2.** Количество жизнеспособных клеток и антибиотическая активность лиофилизированной споровой культуры *S. fradiae* ВНИИГ-25А' после хранения при 4°C в течение 1 мес

**Table 2.** Number of viable cells and antibiotic activity of *S. fradiae* VNIIG-25' frozen-dried spore culture after storage under 4°C for a month

Условия эксперимента Experiment conditions		Количество жизнеспособных клеток, % Number of viable cells, %	Антибиотическая активность, % Antibiotic activity, %
Защитная среда Protective medium	Остаточная влажность, % Residual humidity	$\bar{x} \pm S \bar{x}$	$\bar{x} \pm S \bar{x}$
10% – е обезжиренное молоко 10% skimmed milk	0,1 – 0,5	50,4±9,76*	27,25±4,3*
	1,0 – 2,0	98,3±0,57	98,4±0
	3,0 – 4,0	69,95±9,12*	68,2±6,22*

**Примечание.** \* – уровень доверительной вероятности между средними значениями количества жизнеспособных клеток и их антибиотической активности после лиофилизации и хранения в течение 1 мес.

**Note.** \* - the level of confidence probability between average values of viable cells number and their antibiotic activity after freeze-drying and storage for 1 month.

**Таблица 1.** Зависимость жизнеспособности и антибиотической активности лиофилизированной культуры *S. fradiae* ВНИИГ-25А' от показателей остаточной влажности

**Table 1.** Dependence of viability and antibiotic activity of *S. fradiae* VNIIG-25' frozen-dried culture on the residual humidity indices

Условия эксперимента Experiment conditions		Количество жизнеспособных клеток, % Number of viable cells, %	Антибиотическая активность, % Antibiotic activity, %
Защитная среда Protective medium	Остаточная влажность, % Residual humidity	$\bar{x} \pm S \bar{x}$	$\bar{x} \pm S \bar{x}$
10% – е обезжиренное молоко 10% skimmed milk	0,1 – 0,5	80,5±5,94*	52,85±6,43*
	1,0 – 2,0	99,15±0,64	99,65±0,21
	3,0 – 4,0	99,1±0,99	99,85±0,21

**Примечание.** \* – уровень доверительной вероятности между средними значениями количества жизнеспособных клеток и их антибиотической активности в исходной культуре и культуре после лиофилизации.

**Note.** \* - the level of confidence probability between average values of viable cells number and their antibiotic activity in initial culture and in that after freeze-drying.

performed by 4 ways: 1 – one-step addition of distilled water into penicillin flasks up to the initial volume, the flasks were shaken up and left for 5 min under 20°C with further determination of a colony-forming ability and specific activity; 2 – one-step addition of distilled water up to the initial volume, flask shaking up with following exposure for 1 hr under 20°C; 3 – 4-step addition of distilled water up to the initial volume in the samples (every 15 min during 1 hr); 4 – the samples of frozen-dried culture in opened penicillin flasks were maintained for 24 hrs in a humid chamber with their sterility providing.

The usage of the 1<sup>st</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> ways for the frozen-dried microbial culture rehydration resulted in a considerable and true decrease in a number of viable cells and their antibiotic activity (Table 3).

High indices of the viability and antibiotic activity for a spore frozen-dried microbial culture were obtained when rehydrating the samples with the 2<sup>nd</sup> way. The results testify to the fact, that the residual humidity affects the spore culture viability and specific activity not only after freeze-drying, but after storage as well. Thus, under low values of residual humidity (0.1-0.5%) after freeze-drying the death in 19.5% of viable cells was noted and the values for antibiotic activity decreased down to 62.5%. When storing the frozen-dried samples under 4°C the death in 30% of viable microbial cells was observed, and a specific activity reduced down to 27.25%.

свидетельствуют о том, что остаточная влажность оказывает влияние на жизнеспособность и специфическую активность споровой культуры не только сразу после лиофилизации, но и после хранения. Так, при низких значениях остаточной влажности (0,1-0,5%) после лиофилизации отмечалась гибель 19,5% жизнеспособных клеток, а показатели антибиотической активности снижались до 52,5%. В процессе хранения лиофилированных образцов при 4°C через месяц отмечалась гибель 30% жизнеспособных микробных клеток, а специфическая активность снижалась до 27,25%.

При низких значениях остаточной влажности развиваются как летальные, так и нелетальные повреждения. Летальные являются причиной гибели жизнеспособных клеток и снижения антибиотической активности, нелетальные (развивающиеся в клетках при более интенсивном обезвоживании) – причиной гибели микробных клеток в лиофилированных образцах, хранившихся в течение месяца при 4°C. Вероятно, при этих условиях хранения нелетальные повреждения трансформируются в летальные. При данном температурном режиме хранения образцов после лиофилизации реализуются метаболические процессы с низкой энергией активации, приводящие к накоплению промежуточных продуктов обмена, которые могут оказывать токсический эффект на микробные клетки, вызывая их гибель и снижение специфической активности.

При значениях остаточной влажности в образцах в пределах 1,0-2,0% отмечался высокий процент жизнеспособных клеток и их специфической активности как после лиофилизации, так и после хранения при 4°C.

При повышении значений остаточной влажности до 3,0-4,0% жизнеспособность и антибиотическая активность споровой культуры после лиофилизации соответствовали 99,0%. Но в процессе хранения при 4°C количество жизнеспособных клеток и их специфическая активность снижались на 30,0%. При высоких показателях остаточной влажности превалируют нелетальные повреждения, которые переходят в летальные в процессе хранения, что приводит к гибели микробных клеток и соответственно к снижению их антибиотической активности.

Under low values of residual humidity there is the development of both lethal and non-lethal damages. The lethal ones cause the death of viable cells and a decrease in antibiotic activity, the non-lethal ones (developing in cells under more intensive dehydration) lead to microbial cell death in the frozen-dried samples, stored for a month under 4°C. Probably, under these storage conditions the non-lethal damages are transformed into the lethal ones. Under this temperature regimen for sample storage after freeze-drying there is the realisation of metabolic processes with a low activation energy, resulting in the accumulation of intermediate metabolism products, which can toxically affect the microbial cells, by causing their death and a specific activity decrease.

A high percent of viable cells and their specific activity was noted under residual humidity values in the samples within the limits of 1.0-2.0% both after freeze-drying and storage under 4°C.

When increasing the residual humidity values up to 3.0-4.0% the viability and antibiotic activity of spore culture after freeze-drying corresponded to 99.0%. However during storage under 4°C a number of viable cells and their specific activity decreased by 30.0%. Under high indices of residual humidity there is the predomination of non-lethal damages, transferring into the lethal ones during storage, that results in a death of microbial cells and in a decrease in their antibiotic activity, correspondingly.

The experiment results testify to the fact, that the cell integrity depends on a rehydration way [1, 2, 7]. A

**Таблица 3.** Количество жизнеспособных клеток и антибиотическая активность лиофилизованной споровой культуры *S. fradiae* ВНИИГ-25 А' в зависимости от способов регидратации

**Table 3.** Number of viable cells and antibiotic activity of *S. fradiae* VNIIG-25' frozen-dried spore culture depending on rehydration ways

Условия эксперимента Experiment conditions			Количество жизнеспособных клеток, % Number of viable cells, %	Антибиотическая активность, % Antibiotic activity, %
Способы регидратации Rehydration ways	Температура, °C Temperature, °C	Экспозиция Exposure	$\bar{x} \pm S \bar{x}$	$\bar{x} \pm S \bar{x}$
1	20	5 мин 5 min	83,6±4,1*	78,5±1,9*
2		1 ч 1 hr	98,5±3,2	96,7±2,4
3		1 ч 1 hr	89,8±1,3*	85,3±4,2*
4		24 ч 24 hrs	42,7±3,6*	38,2±3,8*

**Примечание.** \* – уровень доверительной вероятности между средними значениями количества жизнеспособных клеток и их антибиотической активности в исходной культуре и культуре после лиофилизации.

**Note.** \* - the level of confidence probability between average values of viable cells number and their antibiotic activity in initial culture and in that after freeze-drying.

Результаты экспериментов свидетельствуют о том, что сохранность клеток зависит от способа регидратации [1, 2, 7]. Дробная, быстрая регидратация и регидратация во влажной камере приводили к достоверному снижению количества жизнеспособных клеток и их специфической активности. По-видимому, на этапах сублимационного высушивания могут повреждаться мембраны микробных клеток, в результате чего нарушается активный и пассивный транспорт воды, вызывающий гибель микробной культуры при регидратации. Высокая сохранность микробной культуры и ее свойств обеспечивалась одномоментным добавлением дистиллированной воды к лиофилизированным образцам с последующей экспозицией при температуре 20°C в течение часа.

### Выводы

Проведенные исследования показали, что значения остаточной влажности и способ регидратации оказывают существенное влияние на жизнеспособность и специфическую активность споровой культуры *S. fradiae* ВНИИГ-25 А'.

Регидратация путем одномоментного добавления дистиллированной воды с последующей экспозицией в течение 1 ч при 20°C и остаточной влажности лиофилизированных образцов в пределах 1,0-2,0% позволяла получить 98,5% жизнеспособных клеток с высокой антибиотической активностью.

### Литература

1. Аркадьева З.А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // Биологические науки.– 1983.– N4.– С. 93-105.
2. Бланков Б.И., Клебанов Д.Л. Применение лиофилизации в микробиологии.– М.: Медгиз, 1961.– 263 с.
3. Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках.– М.: Высш.школа, 1986.– 476 с.
4. Лакин Г.Ф. Биометрия.– М.: Высш.школа, 1980.– 293 с.
5. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С.Егорова.– М.: Изд-во МГУ.– 1976.– 307 с.
6. Рубан Е.Л. Хранение культур микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология.– 1989. – Т.25, №3.– С.291-301.
7. Тутова Э.Г. Идельчик М.С. Способы консервации микроорганизмов и продуктов их биосинтеза (сушка и хранение) // Труды института тепло- и массообмена АН БССР.– 1984.– № 1.– 61 с.
8. Цуцаева А.А., Ананьина А.Е. Изучение влияния некоторых параметров процесса лиофилизации на жизнеспособность споровой культуры *Streptomyces fradiae* ВНИИГ-25 А' // Пробл. криобиологии.– 2002.– №2.– С. 26-29.
9. Antheunisse J. Viability of lyophilized microorganisms after storage // Antonie van Leeuwengock.– 1973.– Vol.39, N2.– P.243.
10. Bunse T., Steigleder G.K. The preservation of fungal cultures by lyophilization // Mycoses.– 1991.– Vol.34, N3-4.– P.173-178.

Поступила 04.11.2003

multi-step, prompt rehydration and that in a humid chamber resulted in a considerable and true decrease in a number of viable cells and their specific activity. Apparently, at these stages of sublimation the damages in microbial cell membranes can occur, as a result there is the disorder in an active and passive water transport, causing the death of microbial culture during rehydration. A high integrity of microbial culture and its properties was provided by one-step addition of distilled water to frozen-dried samples with following exposure under 20°C for 1 hr.

### Conclusions

The conducted investigations demonstrated, that the values of residual humidity and the rehydration way caused a considerable effect on viability and specific activity of *S. fradiae* VNIIG-25' spore culture.

The rehydration by one-step addition of a distilled water with following exposure for 1 hr under 20°C and a residual humidity in frozen-dried samples within 1.0-2.0% allowed to obtain 98.5% of viable cells with a high antibiotic activity.

### References

1. Arkadijeva Z.A. Factors, affecting the viability and properties of microorganisms under different storage methods // Biologicheskie nauki.– 1983.– N4.– P.93-105.
2. Blankov B.I., Klebanov D.L. Freeze-drying application in microbiology.– Moscow: Medgiz, 1961.– 263p.
3. Egorov N.S. Grounds of study on antibiotics.– Moscow: Vysshaya shkola, 1986.– 476p.
4. Lakin G.F. Biometry.– Moscow: Vysshaya shkola, 1980.– 293p.
5. Practical work on microbiology / Edited by Egorova N.S.– Moscow: Publishing House of Moscow State University, 1976.– 307 p.
6. Ruban E.L. Storage of microorganism cultures // Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya.– 1989.– Vol.25, N3.– P.291-301.
7. Tutova E.G., Idelchik M.S. Ways for preservation of microorganisms and products of their biosynthesis (drying and storage) // Proceedings of the Institute of Heat and Mass Exchange of the Academy of Sciences of Byelorussian SSR.– 1984.– N1.– 61 p.
8. Tsutsayeva A.A., Ananyiina A.E. Study of the effect of some parameters of freeze-drying process on the viability of *Streptomyces fradiae* VNIIG-25' spore culture // Problems of cryobiology.– 2002.– N2.– P. 26-29.
9. Antheunisse J. Viability of lyophilized microorganisms after storage // Antonie van Leeuwengock.– 1973.– Vol.39, N2.– P. 243.
10. Bunse T., Steigleder G.K. The preservation of fungal cultures by lyophilization // Mycoses.– 1991.– Vol.34.– N3-4.– P. 173-178.

Accepted in 04.11.2003