Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии, эпидемиологии, вирусологии и микробиологии РЦГЭиОЗ

Международная научно-практическая конференция «Здоровье и окружающая среда», приуроченная к 100-летию санитарно-эпидемиологической службы Республики Беларусь, 19-20.11.2026

Сателлитная конференция «Новые концепции и методы в микробиологии, вирусологии и иммунологии»

Оценка жизнеспособности коллекционных культур *Francisella tularensis после длительного хранения*

Лютина Я.В., Климович О.В., Родионова Л.П., Шипуль В.Н.

Сохранение микроорганизмов в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени является одним из наиболее значимых направлений деятельности Республиканской коллекции патогенных биологических агентов (далее – РКПБА). Эффективная консервация с полным сохранением популяций и геномов разнообразных микроорганизмов представляет собой пока еще не решенную проблему, нуждающуюся в изучении.

В настоящее время криоконсервация (криоанабиоз) является наиболее перспективным методом долгосрочного хранения микроорганизмов. Существенным преимуществом криоконсервации перед высушиванием и лиофилизацией является возможность сохранения высокой биохимической активности и генетической стабильности коллекционных культур.

Целью данного исследования являлось определение жизнеспособности штаммов возбудителей туляремии после долговременного низкотемпературного хранения на примере тест-штаммов *Francisella tularensis* из фонда РКПБА.

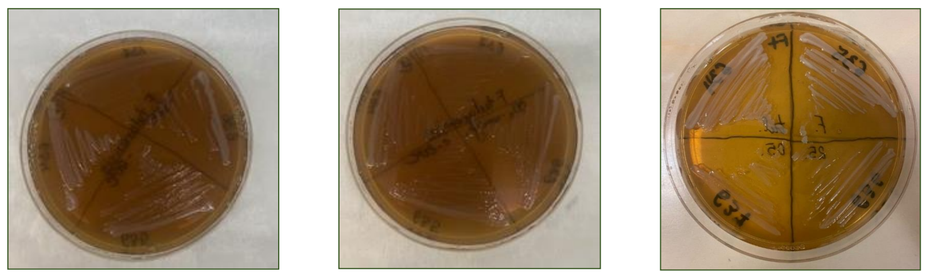
Материалы и методы.

- В работе использованы штаммы из фонда РКПБА: *F. tularensis*-Chashniki-1-220/11 — РКПБА-Б-2022-634 (далее FT-634), *F. tularensis*-Brest-2-119/14 — РКПБА-Б-2022-635 (далее FT-635), *F.tularensis*-Gomel-9-2319/16 — РКПБА-Б-2022-636 (далее FT-636), *F. tularensis*-Novopolock-B-220/17 — РКПБА-Б-2022-637 (далее FT-637).
- Штаммы на скошенном питательном агаре для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT-агар) хранили при температуре -70^{0}С в полипропиленовых пробирках.
- Учет жизнеспособности проводили путем высева на FT-агар с добавлением глюкозо-витаминной и селективной добавок через 3, 6, 9, 12, 24, 30 месяцев хранения.
- Процент выживаемости микроорганизмов после 1-ого и 2-ого восстановительных пассажей определяли по отношению числа сохранившихся клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100%.
- Подтверждение аутентичности восстановленных штаммов проводили в ПЦР-РВ по генам *fopA* и *tul4*.

Результаты.

- Показано, что при восстановлении культур *Francisella tularensis* (FT-634, FT-635, FT-636, FT-637) после длительного хранения при температурном режиме -70^{0}С в течение 3, 6, 9, 12 месяцев наблюдался активный, обильный рост культур, с образованием колоний молочно-белого цвета, блестящих с голубоватым отливом (рисунок 1), что свидетельствует о полном сохранении жизнеспособности культур в данных условиях на протяжении, как минимум, 12 месяцев. Процентное содержание жизнеспособных клеток составило от 79 до 96% (таблица).

При восстановлении культур *F. tularensis* после хранения в течение 24 и 30 месяцев содержание жизнеспособных клеток несколько снизилось и составило от 37 до 51%, наблюдался скудный, малоактивный рост с образованием колоний молочно-белого цвета, блестящих с голубоватым отливом. Однако при последующем пассаже данной генерации рост всех четырех штаммов был активным, обильным, процентное содержание жизнеспособных клеток от исходного количества составило от 75 до 88% (таблица).



А Б В

Рисунок 1 — Рост штаммов *Francisella tularensis* после: А – 6, Б – 9, В – 12 месяцев криохранения

Таблица. Процентное содержание жизнеспособных клеток от исходного количества

Время наблюдения (месяц/ пассаж)	Выживаемость, %			
	F. tularensis-Chashniki-1-220/11 РКПБА-Б-2022-634	*F. tularensis*-Brest-2-119/14 РКПБА-Б-2022-635	*F. tularensis*-Gomel-9-2319/16 РКПБА-Б-2022-636	*F. tularensis*-Novopolock-B-220/17 РКПБА-Б-2022-637
0	100	100	100	100
3/1	93	89	96	90
6/1	93	87	95	90
9/1	89	85	95	85
12/1	85	79	93	86
24/1	49	48	51	48
24/2	79	77	75	88
30/1	41	39	46	37
30/2	82	76	84	75

Аутентичность восстановленных после 30 месяцев хранения штаммов подтверждена методом ПЦР-РВ (рисунок 2).

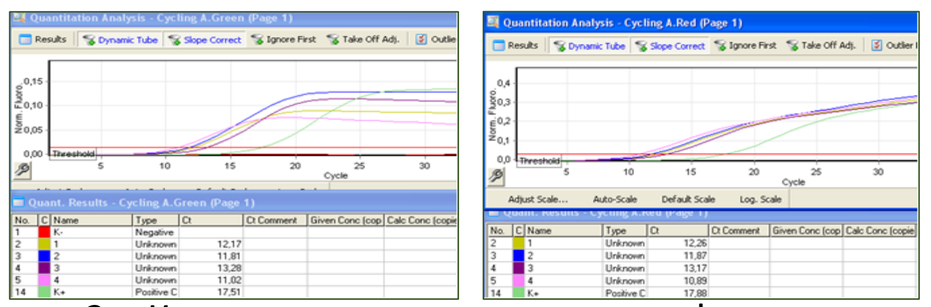


Рисунок 2 – Кривые роста интенсивности флюоресценции по каналу Green для участков генов *fopA* и по каналу Red для участков генов *tul4*: 1- FT-634, 2 - FT-635, 3 - FT-636, 4 - FT-637

Выводы. Таким образом, на примере штаммов *F. tularensis* из фонда РКПБА установлена возможность длительного хранения культур *Francisella* в условиях низкотемпературного замораживания (-70^{0}С) на скошенном FT-агаре. Указанный способ освобождает специалистов лабораторий от постоянной рутинной работы по поддержанию жизнеспособности культур; позволяет обеспечить сохранение микроорганизма в состоянии, максимально близком к исходно выделенному варианту.

lab.biosafety@belriem.by