



Биол. журн. Армении, 2 (67), 2015

РЕПРОДУКТИВНЫЕ СВОЙСТВА КУЛЬТУР МИКРО- ОРГАНИЗМОВ ПРИ РАЗНЫХ МЕТОДАХ КОНСЕРВАЦИИ

**К.В. ЧИТЧЯН, М.А. КИНОСЯН, Н.Л. КАЗАНЧЯН, Н.С. ХАЧАТУРЯН,
С.А. ГЕВОРГЯН, А.Г. АКОПЯН, Т.С. ДАВИДЯН**

*Центр депонирования микробов НИЦ “Армбиотехнология” НАН РА
microbio@sci.am*

Представлены данные о сравнительной эффективности использования методов поддержания жизнеспособности различных микроорганизмов на питательных средах с использованием глицерина, вазелина и других консервантов.

Установлена эффективность сохранения их репродуктивных свойств при хранении на природных субстратах. Особое внимание уделено хранению культур молочнокислых бактерий, дрожжей, а также грибных организмов.

*Коллекции культур микроорганизмов – молочнокислые бактерии –
фитопатогены – дрожжи – грибы – репродукция*

Տվյալներ են բերվում տարբեր սննդամիջավայրերի վրա մանրէների կենսունակության պահպանման մեթոդների կիրառման համեմատական արդյունավետության մասին՝ օգտագործելով գլիցերին, վազելին և այլ կոնսերվանտներ:

Հաստատվել է բնական սուբստրատների վրա նրանց վերականգնողական հատկությունների պահպանման արդյունավետությունը: Հատուկ ուշադրություն է հատկացվել կաթնաթթվային բակտերիաների, շաքարասնկերի, ինչպես նաև սնկերի պահպանմանը:

*Մանրէների կուլտուրաների հավաքածուներ – կաթնաթթվային բակտերիաներ – ֆիտոպաթոգեններ –
շաքարասնկեր – սնկեր – վերարտադրողականություն*

The data on application of glycerol, vaseline and other conservants for long-term maintenance of various microorganisms are presented.

Efficiency in use of natural substrates for maintenance of their viability on natural substrates has been established. Special emphasis was put to the maintenance of lactobacteria, yeast and fungi.

*Microbial Culture Collection – lactic acid bacteria – phytopathogens –
yeast – fungi – reproductivity*

В Центре депонирования микробов НИЦ “Армбиотехнология” НАН Армении (ЦДМ) поддерживается обширная (около 13000 штаммов) коллекция культур микроорганизмов: аэробные спорообразующие бактерии – 8550 штаммов, молочнокислые бактерии – 500 штаммов, неспорообразующие бактерии – 1000 штаммов, грибы (митоспорические и базидиальные) – более 1200 штаммов, дрожжи и

актиномицеты – более 700 штаммов. Коллекция является основным Республиканским хранилищем генофонда микроорганизмов, представляющих интерес как для проведения научно-исследовательских разработок, так и для создания новых биотехнологий.

Особую ценность представляют микроорганизмы - продуценты различных биологически активных соединений, биодегранты полимерных материалов и другие. Коллекционный фонд микроорганизмов поддерживается методами лиофилизации, криоконсервации, под слоем вазелинового масла, а также периодически пересевами культур на соответствующие питательные среды.

Главной задачей коллекции является гарантийное хранение культур в жизнеспособном состоянии с характерными свойствами, а также предупреждение изменений и мутаций, т.е. сохранение микроорганизма в состоянии, максимально близком к исходно выделенному штамму [1, 4, 7, 10, 11, 18].

Традиционные методы поддержания культур микроорганизмов сводятся к их выращиванию на богатых питательных средах с частыми пересевами. При этом имеют место мутационные изменения и автоселекция, что часто приводит к потере у штаммов важных физиолого-биохимических свойств [2-5, 11, 12].

Целью статьи является выявление эффективности традиционных методов хранения культур применительно к отдельным группам микроорганизмов с сохранением их характерных свойств.

Материал и методика. Объектом исследования служили молочнокислые бактерии (МКБ), дрожжи, митоспорические грибы и неспороносные бактерии разных видов.

Периодические пересевы: традиционным методом хранения культур является их периодический пересев на свежие соответствующие среды. Интервал между пересевами зависит от микроорганизма, используемой среды и условий хранения (от 15 дней до одного года) [1, 4, 15].

Хранение под вазелиновым маслом: культуры выращивали на агаризованных косяках. После инкубации в пробирки заливали слой вазелинового масла не менее 1 см [1, 4, 7, 11].

Криоконсервация в глицерине: 40%-ный раствор глицерина разливали в пробирки по 3 мл и стерилизовали при 1 атм 30 мин, затем вносили по 0,1 мл густой суспензии штаммов и закладывали в холодильную камеру при -20°C , -40°C , -60°C [1, 3, 4].

Криоконсервация в жидком азоте: криопротектор – 10%-ный глицерин разливали по 2 мл и стерилизовали при 1 атм 15 мин. В подготовленные пробирки вносили густую суспензию испытуемых штаммов, взбалтывали и переносили в специальные трубочки с последующим переносом в контейнеры для хранения в жидком азоте при -196°C [1, 4].

Консервация на природных субстратах: песок, почва-песок, цеолит. Кварцевый песок и цеолит в течение 3 сут промывали под проточной водой, периодически размешивая. Высушивали в сушильном шкафу при $100-150^{\circ}\text{C}$. Просеянный песок, смесь песка с почвой (10:1), цеолит помещали по 3г в пробирки и дважды стерилизовали при 120°C в течение часа. В каждую пробирку закапывали 0,1мл густой водной суспензии испытуемого штамма. Пробирки встряхивали и оставляли при комнатной температуре на длительное хранение [1, 4].

Лиофилизация: лиофилизировали культуры микроорганизмов, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, выращенные на средах, соответствующих их физиологическим потребностям. Бактерии смывали в защитные среды и вносили в стерильные ампулы для лиофилизации по 0,3мл густой суспензии. Исходный титр в ампуле составлял 10^9-10^{10} клеток/мл. Суспензии в ампулах замораживали в спирте при $-50 - 60^{\circ}\text{C}$, выдерживали при этой температуре в течение 15-20 мин с последующим высушиванием под вакуумом до остаточной влажности около 1% [1, 2, 4-8, 11, 13, 17].

Для поддержания коллекции митоспорических грибов использовали следующие условия и субстраты хранения и консервации штаммов: питательные среды (систематически пересевами), природные субстраты (песок, смесь песок/почва 10:1, цеолит), криоконсервация в жидком азоте и в разных концентрациях глицерина (20, 40, 60, 100%) и при разной температуре (-10°C , -40°C , -60°C). Для хранения базидиальных грибов использовался метод

периодических пересевов. Оптимальная среда для хранения – сусло-агар, температура культивации 24⁰С, с периодичностью пересевов 6 месяцев. Для МКБ использовали питательную среду МРС [16], для дрожжей – среду ГПА (глюкозо-пептонный агар), а для бактерий – МПА (мясо-пептонный агар).

Репродуктивные свойства штаммов проверяли следующим образом. Предварительно были разлиты в чашки Петри соответствующие среды: для грибов – агаризованная среда Чапека и сусло-агар, для дрожжей – глюкозо-пептонный агар, для МКБ-МРС, для бактерий – рыбо-пептонный агар. На подсушенные чашки переносили по 0,05мл суспензии и ставили на инкубацию – дрожжи и грибы при 28⁰С, бактерии при 30-37⁰С. Через 3-14 сут проводили подсчет выросших колоний.

Результаты и обсуждение. Репродуктивные свойства некоторых культур митоспорических грибов (включая биодеградантов космической техники) при разных условиях консервации представлены в табл. 1. Выявлено, что большинство штаммов грибов, хранимых на естественных субстратах в течение 3-х лет, сохранили высокие репродуктивные свойства, за исключением некоторых: *Aspergillus terreus* ЦДМ 8114, *Penicillium funiculosum* ЦДМ 8120, *Trichoderma viride* ЦДМ 8125, *Penicillium melinii* ЦДМ 12035, *Ulocladium botrytis* ЦДМ12037.

Установлены определенные различия в выживаемости и репродукции культур разных видов грибов при лиофилизации и хранении в жидком азоте. Сравнительная оценка испытанных методов позволяет заключить о больших преимуществах использования жидкого азота (табл.1).

Таблица 1. Сравнительная характеристика жизнеспособности и репродукции грибов при различных условиях консервации

Наименования и номера штаммов по ЦДМ	Репродукция штаммов спустя 3 года			Криоконсервация в жидком азоте в течение		Консервация в глицерине при разных концентрациях и температурах спустя 3 года, %									
	Песок	Почва/песок	Цеолит	3-х лет	4-х лет	-10 ⁰ С			-40 ⁰ С			-60 ⁰ С			
						20	40	60	20	40	60	20	40	60	
<i>Aspergillus niger</i> 8133	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. flavus</i> 8134	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. terreus</i> 8114	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. fumigatus</i> 12036	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Paecilomyces variotii</i> 8135	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i> 8119	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. aurantiogriseum</i> 12040	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. aurantiogriseum</i> 12050	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>P. chrysogenum</i> 8128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. chrysogenum</i> 12039	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. funiculosum</i> 8120	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>P. melinii</i> 12035	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma viride</i> 8125	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Chaetomium globosum</i> 8117	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
<i>Ulocladium botrytis</i> 12037	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-

Примечание: (-) – отсутствие роста.

Выявлены аналогичные данные при криоконсервации в глицерине. Большинство штаммов грибов характеризуется высокой выживаемостью и репродукцией при испытанных температурах и концентрациях глицерина. Сравнительно неблагоприятным является применение 100%-ного глицерина.

Результаты исследования жизнеспособности 32-х базидиальных грибов, хранящихся под вазелиновым маслом в течение года, показали отсутствие репродуктивности у большинства штаммов, только у 3-х штаммов *Pleorotus ostreatus* наблюдали слабый рост. Таким образом, для поддержания коллекции базидиальных грибов приемлем метод периодических пересевов.

Известно несколько способов хранения культур МКБ: периодические пересевы, в 20%-ном растворе глицерина при -20°C , под слоем вазелинового масла на агаризованной среде и в лиофильном состоянии. В литературе часто встречаются факты, свидетельствующие о нестабильности ряда свойств у МКБ [5, 11, 15].

С целью длительной консервации 110 штаммов МКБ и дрожжей разных видов были заложены на хранение под стерильное вазелиновое масло ($4^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$). После 5-ти лет хранения было установлено, что только 30% палочковидных форм МКБ сохранили жизнеспособность, а кокковидных – 60% (табл. 2).

Таблица 2. Репродуктивные свойства молочнокислых культур и дрожжей при хранении под слоем вазелинового масла

Наименования и номера штаммов по ЦДМ и др. Коллекциям	Репродукция штаммов спустя		Наименования и номера штаммов по ЦДМ и др. Коллекциям	Репродукция штаммов спустя	
	1 год	5 лет		1 год	5 лет
<i>Lactobacillus brevis</i> NCDO* 477 <i>L. buchneri</i> VKM 1599 <i>L. casei</i> subsp. <i>Casei</i> NCDO 161 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i> VKM 1596 <i>Enterococcus faecalis</i> CCM 1875 <i>Candida bogoriensis</i> 10007 <i>C. aaseri</i> 10001, <i>C. diffluens</i> 10019 <i>Rhodotorula javanica</i> 10029 <i>Kluyveromyces lactis</i> 10087 <i>K. lodderae</i> 10086, <i>K. delphensis</i> 10082 <i>Arxiozyma telluris</i> 10112 <i>Filobasidiella neoformans</i> 10159 <i>Debaryomyces venrijae</i> 10072	+++	++	<i>Lactobacillus acidophilus</i> MDC 10883, 10889, 10897 <i>L. casei</i> subsp. <i>Rhamnosus</i> MDC 10849 <i>L. plantarum</i> MDC 10882 <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> CCM 1877 <i>Enterococcus durans</i> NCDO 596	++	-
<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> VKM 535 <i>L. plantarum</i> NCDO 82 <i>Candida pintolopesii</i> 10137 <i>C. jamata</i> 10119, <i>C. sake</i> 10053 <i>Rhodotorula muscorum</i> 10044 <i>Kluyveromyces marxianus</i> 10081 <i>Yarrowia lipolytica</i> 10033 <i>Clavispora lusitaniae</i> 10034	++	++	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>Paracasei</i> MDC 10898 <i>Candida blankii</i> 10006 <i>Pichia delfiensis</i> 10167	+	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> VKM 1660 <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> VKM 574 <i>Pichia burtonii</i> 10197	++	+	<i>Lactobacillus acidophilus</i> MDC 9602, 9604, 9606, 9609, 9610, 9611, 10878, 10881, 10883, 10884, 10885, 10887, 10889, 10892, 10893, 10894, 10895 <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> VKPM 7640 <i>L. fermentum</i> NCDO 215 <i>L. helveticus</i> VKM 842 <i>L. lactis</i> MDC 10881 <i>Streptococcus thermophilus</i> MDC 9608	+	-

Примечание: репродуктивность оценивалась по 3-х бальной системе: (-) – отсутствие роста,

*NCDO - National Collection of Dairy Organisms

VKM - All-Russian Collection of Microorganisms

VKPM - Russian National Collection of Industrial Microorganisms

CCM - Czechoslovak Collection of Microorganisms

Микроскопирование показало, что во время длительного хранения под вазелиновым маслом клетки МКБ подвергаются деформации, теряя свои естественные формы, утолщаются, что нельзя сказать о хранении их в глицерине (табл. 3).

Для выявления эффективности методов хранения культуры молочнокислых бактерий и дрожжей в течение 3-х лет поддерживали при -20°C в 20%-ном глицерине (табл.3).

Таблица 3. Репродуктивные свойства молочнокислых бактерий и дрожжей при хранении под глицерином (-20⁰С)

Наименования и номера штаммов по ЦДМ	Репродукция штаммов, спустя		Наименования и номера штаммов по ЦДМ	Репродукция штаммов, спустя	
	1 год	3 года		1 год	3 года
<i>Lactobacillus sp.</i> 10951 <i>Streptococcus sp.</i> 10850, 10857, 10864, 10865, 10867, 10868, 10869, 10870, 10871, 10957, 10960, 10962, 10964, 10965, 10968, 10970, 10976	+++	+++	<i>Streptococcus sp.</i> 10854, 10856, 10861, 10872 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9703 <i>Rodotorula mucilaginosa</i> 9768 <i>Cryptococcus humicolus</i> 10223	+	+
<i>Streptococcus sp.</i> 10859, 10860, 10963, 10966, 10967, 10969, 10971, 10972	+++	++	<i>Lactobacillus sp.</i> 10873, 10874, 10950, 10952, 10954, 10961 <i>Candida albicans</i> 10032 <i>Pichia anomala</i> 10074 <i>Kluyveromyces marxianus</i> 10085	-	-
<i>Streptococcus sp.</i> 10851, 10852, 10853, 10855, 10858, 10862, 10853, 10866, 10953, 10955, 10956, 10958, 10959, 10973, 10974, 10975	++	++			

Примечание: репродуктивность оценивалась по 3-х бальной системе: (-) – отсутствие роста.

Из литературных данных известно о сохранении репродуктивных свойств некоторых культур неспороносных бактерий, хранимых без пересевов под слоем вазелинового масла в течение 14 лет [7]. В связи с этим, представлял интерес проверить жизнеспособность и репродукцию культур микроорганизмов разных родов и видов при более продолжительном хранении. Проверили репродукцию 399 штаммов фитопатогенных бактерий после хранения в течение 25 лет под вазелиновым маслом. Анализ данных показал, что около 25% изученных штаммов сохранили жизнеспособность. Относительно высокая репродуктивность отмечена у штаммов родов *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* (табл.4).

Таблица 4. Репродукция фитопатогенных бактерий после хранения в течение 25 лет под вазелиновым маслом

Наименование видов	Общее число изученных штаммов	Число штаммов после репродукции
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	56	36
<i>A. radiobacter</i>	1	1
<i>Erwinia carotovora</i>	84	8
<i>E. herbicola</i>	1	1
<i>Pseudomonas tabaci</i>	10	3
<i>P. lachrymans</i>	14	5
<i>P. agrobacters</i>	4	4
<i>Pseudomonas sp.</i>	21	8
<i>Rhodococcus fascians</i>	29	19
<i>Clavibacter michiganense subsp. michiganense</i>	11	0
<i>Xantomonas campestris</i>	3	0
<i>X. malvacearum</i>	4	0
<i>X. campestris pv. beticola</i>	140	2
<i>X. campestris pv. vesicatoria</i>	20	4
<i>X. phaseoli</i>	1	1

Как видно из таблицы, только 3 вида *Clavibacter michiganense subsp. Michiganense*, *Xantomonas campestris*, *Xantomonas malvacearum* не репродуцировались. Исходя из этого, можно сделать вывод, что метод длительного хранения под вазелиновым маслом не пригоден для вышеуказанных видов.

Оценка репродуктивности спорообразующих и неспорообразующих бактерий при различных методах консервации (лиофилизация, под слоем вазелинового масла, в жидком азоте и в 20%-ном глицерине) после 5 лет хранения установила, что жизнеспособными оказались 90-95%, а на природных субстратах 60-75%. Жизнеспособность дрожжей сохраняется 70-85% (табл.3), метод лиофилизации для данной группы микроорганизмов не был испытан.

На основании сравнительной оценки испытанных методов можно заключить о преимуществе использования следующих методов консервации: лиофилизация → жидкий азот → глицерин → вазелиновое масло.

Проведенные исследования показали также очевидные различия в репродукции микроорганизмов, относящихся к различным родам и видам.

Авторы выражают благодарность Э.Африкяну за содействие.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Аркадьева З.А.* Методы хранения культур микроорганизмов. В кн.: *Метаболизм микроорганизмов* (под ред. Егорова Н.С.), М., Изд-во МГУ, 57-64, 1986.
2. *Бланков Б.И.* Применение лиофилизации в микробиологии. М, Медгиз, 282с., 1961.
3. *Брюханов А.Л.* Длительное хранение строго анаэробных микроорганизмов в глицерине. *Прикладная биохимия и микробиология*, 42, 2, 2000-2003, 2006.
4. *Герна Р.* Хранение микроорганизмов. В кн.: *Методы общей бактериологии* (под ред. Ф. Герхардта), М., Мир, 512-534, 1983.
5. *Квасников Е.И., Нестеренко О.А.* Молочнокислые бактерии и пути их использования, М., Наука, 389с., 1975.
6. *Куплетская М.Б.* Результаты хранения лиофилизированных культур микроорганизмов в течение 25 лет. *Микробиология*, 56, 3, 488-491, 1987.
7. *Куплетская М.Б., Аркадьева З.А.* Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии Московского государственного университета. *Микробиология*, 66, 2, 283-288, 1997.
8. *Куплетская М.Б., Нетрусов А.И.* Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. *Микробиология*, 80, 6, 842-846, 2011.
9. *Лозина-Лозинский Л.К.* Очерки по криобиологии. Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам. Л., Наука, 288с., 1972.
10. *Сидякина Т.М.* Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы. Пушкино, 81-159, 1991.
11. *Стоянова Л.Г., Аркадьева З.А.* Сравнение способов хранения молочнокислых бактерий. *Микробиология*, 69, 1, 98-104. 2000.
12. *Шмидт П.Я.* Анабиоз. М., Л., Изд-во АН СССР, 436с., 1955.
13. *Фатеева М.В.* Методы хранения коллекционных культур дрожжей. М., Наука, 55-90, 1967.
14. *Juarez T., Bru E., Martos G., Nader-Macias M.E.* Stability of freeze-dried vaginal *Lactobacillus* strains in the presence of different lyoprotectors. *Can. J. Microbiol.*, 55, 5, 544-552, 2009.
15. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods (Eds. Kirsop B.E., Doyle A.), London, New York, Academ. Press, 308p., 1991.
16. *Man J.C. de, Rogosa M., Sharpe M.E.* *J. Appl. Bacteriol.*, 23, 130, 1960.
17. *Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P.* Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. *Biotechnol. Prog.*, 23, 2, 302-315, 2007.
18. *Strasser S., Neureiter M., Geppl M., Braun R., Danner H.* Influence of lyophilization, fluidized bed drying, addition of protectants, and storage on the viability of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.*, 107, 1, 167-177, 2009.

Поступила 11.11.2014