ЭКОБИОТЕХ
ISSN 2618-964X http://ecobiotech-journal.ru

ПОДБОР МЕТОДОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ МИКРОМИЦЕТОВ И ДРОЖЖЕЙ

Утепешева А.А.

Астраханский государственный технический университет, Астрахань
E-mail: utepesheva@mail.ru

Одной из важных проблем микробиологии является сохранение микроорганизмов в жизнеспособном состоянии в лабораторных условиях. Основной задачей хранения любых микроорганизмов является поддержание жизнеспособности, сохранение таксономически важных признаков и полезных свойств, необходимые для науки и практики.

В статье описаны результаты подбора методов хранения коллекционных штаммов микромицетов и дрожжей в лабораторных условиях. В результате исследований были использованы такие методы как хранение микромицетов под минеральным маслом и глицерином в холодильной и морозильной камерах, а также замораживание дрожжевых штаммов с помощью криопротекторов. Установлено, что метод длительного хранения дрожжей методом замораживания с применением питательной среды Сабуро и защитного криопротектора пектина все исследуемые штаммы сохранили свою жизнеспособность.

Хранение микромицетов под минеральным маслом показало, что данный метод наиболее приемлем для сохранения коллекционных штаммов микромицетов как при температуре +4 °С, так и при замораживании при температуре -20 °С.

Ключевые слова: криоконсервация, криопротекторы, длительное хранение, микромицеты, дрожжи, выживаемость

SELECTION OF METHODS FOR LONG STORAGE OF COLLECTION STRAINS OF MICROMYCETES AND YEAST

Utepesheva A.A.

Astrakhan State Technical University, Astrakhan
E-mail: utepesheva@mail.ru

One of the important problems of microbiology is the preservation of microorganisms in a viable state in the laboratory. The main task of storing any microorganisms is to maintain viability, preservation of taxonomically important traits and useful properties necessary for science and practice.

The article describes the results of selecting storage methods for collection strains of micromycetes and yeast in the laboratory. As a result of the research, such methods were used as storing micromycetes under mineral oil and glycerin in refrigerators and freezers, as well as freezing yeast strains using cryoprotectants. It was found that the method of long-term storage of yeast by freezing using a Saburo culture medium and protective pectin cryoprotectant all the studied strains retained their viability.

Storage of micromycetes under mineral oil showed that this method is most suitable for preserving collection strains of micromycetes both at a temperature of +4 °C and when freezing at a temperature of -20 °C.

Keywords: cryopreservation, cryoprotectants, long-term storage, micromycetes, yeast, survival.

Поступила в редакцию: 6.09.2019

DOI: 10.31163/2618-964X-2019-2-4-494-498

ВВЕДЕНИЕ

Основными задачами хранения культур микроорганизмов являются поддержание жизнеспособности, сохранение стабильности таксономически важных признаков, а также хозяйственно-полезных свойств, представляющих интерес для науки и практики.

Помимо сохранения полезных свойств в лабораторных и промышленных условиях необходимо обеспечить выживаемость штаммов при длительном хранении. Самый распространенный метод поддержания жизнедеятельности микроорганизмов –

периодические пересевы культур на свежие питательные среды. Однако при многократных пересевах повышается вероятность реверсии и потери активности микроорганизма, поэтому штаммы лучше хранить в консервированном виде. При этом микроорганизмы сохраняют жизнеспособность в течение десятилетий [Белясова, 2012].

Перспективным методом хранения считается криоконсервация. При этом снижается риск генетических изменений, что приводит к сохранению свойств культур, снижение временных и материальных затрат, а также возможность использования замороженных образцов в качестве прямого инокулята. По литературным данным известно, что микроорганизмы, которые хранятся при низких температурах, повреждаются в меньшей степени и имеют более высокую выживаемость, чем микроорганизмы, хранившиеся в высушенном или лиофилизированном состоянии. Таким образом, метод криоконсервации рекомендован для использования в национальных коллекциях микроорганизмов [Савкина и др., 2014].

Другим широко распространенным методом является хранение культур под слоем минерального масла. Масло предохраняет субстрат от высыхания, ограничивает доступ кислорода воздуха. Спорообразующие микроорганизмы обладают большей устойчивостью при хранении под маслом, поэтому данный метод часто используется для хранения микромицетов. Обычно применяют вазелиновое масло (плотность 0,8–0,9). Масло сначала стерилизуют в автоклаве при 1,0–1,5 кгс/см^2 или в электрическом сушильном шкафу при 150–170 °С в течение 1,5 ч [Охапкина и др., 2009; Похиленко и др., 2009].

Все используемые методы искусственной консервации микроорганизмов являются способом в той или иной степени смоделировать выживаемость микроорганизмов в экстремальных условиях.

Довольно часто при переходе от лабораторных условий к культивированию в промышленных масштабах происходит утрата полезных свойств микроорганизмов. Для снижения потерь полезных свойств необходимо при культивировании создать условия, максимально приближенные к условиям лаборатории [Еремеева, 2011]. Таким образом, поддержание штаммов в жизнеспособном состоянии, сохранение их полезных свойств являются важными условиями любой работы с микроорганизмами – от изучения таксономических свойств до использования их в промышленности [Похиленко и др., 2009].

Целью исследований являлось подобрать оптимальные методы длительного хранения коллекционных штаммов микромицетов и дрожжей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве исследуемых культур использовали штаммы микромицетов и дрожжей, выделенные из различных природных биотопов, расположенных в Нижнем Поволжье.

В ходе работы использовали следующие методы хранения микроорганизмов: хранение под вазелиновым маслом и глицерином в холодильной и морозильной камере и замораживание с помощью криопротекторов.

Хранение под минеральным маслом проводили путем культивирования исследуемых микромицетов на скошенном агаре Чапека и последующим внесении стерильного вазелинового масла и глицерина. Микроорганизмы выращивали в пробирках на поверхности коротко скошенной (под углом 45 ^{o}С) питательной агаризованной среды (5–6 мл). Масло и глицерин стерилизовали в автоклаве, затем выдерживали при комнатной температуре 2–3 суток. Масло заливали не выше 1 см над верхним краем среды. При пересеве избыток масла

удаляют прикосновением петли к внутренней стенке пробирки. Капли масла на поверхности питательной среды снижают скорость роста культур и первом пассировании [Егоров, 1989]. Пробирки помещали в холодильную камеру при температуре +4 ºС и в морозильную камеру – при -20 ºС.

Для хранения в замороженном состоянии коллекционные штаммы дрожжей были законсервированы с использованием криопротекторов – глюкозы и пектина. Для приготовления клеточных суспензий штаммы выращивали на скошенном агаре Сабуро при 30 ºС в течение 24–48 ч до стационарной фазы. Культуру смывали стерильным физиологическим раствором, взвесь с концентрацией 10^6 КОЕ/мл разливали в пробирки со средами. После 18 ч экспозиции при комнатной температуре пробирки помещали в бытовую морозильную камеру при –20 ºС. В качестве защитных сред использовали среду Сабуро и среду с петином. Первое оттаивание проводили через 4 недели замораживания и так же последующие оттаивания периодичностью в 4 недели [Абдулгамидова, 2008].

Помимо выживаемости штаммов, исследовалась сохранение культурально-морфологических свойств, а также линейного роста колоний микромицетов.

Для определения линейного роста измеряли диаметр колонии (от места посева до конца зоны роста мицелия), растущих на плотной среде, обычно в чашках Петри с одинаковым слоем среды, через определенные промежутки времени. В некоторых случаях измерение производят в специальных пробирках с застывшим горизонтальным слоем плотной среды равномерной толщины.

Изучаемый гриб высевали в центр поверхности плотной питательной среды по возможности немного численным инокулюмом всегда одной плотности, особенно при изучении влияния условий культивирования на рост колоний.

Диаметр колонии измеряют в двух взаимноперпендикулярных направлениях в двух-трех повторностях через определенные промежутки времени (каждые 24 ч). Количество измерений зависит от скорости роста гриба, оно больше у быстрорастущих видов. Результаты измерений изображают графически в равномерной или логарифмической шкале. [Еремеева, 2011].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Коллекционные штаммы микромицетов выращивали на скошенном агаре Чапека, затем заливали стерильным вазелиновым маслом и глицерином, затем ставили на хранение в холодильную и морозильную камеры. При восстановлении оценивали стабильность культурально-морфологических признаков. В результате установлено, что все исследуемые культуры сохранили свою жизнеспособность после пересевов. Пересевы осуществляли каждые 4 недели. При этом установлено, что культурально-морфологические свойства остались без изменений за исключением штамма.

Количество выживших клеток микромицетов после восстановления изучали методом Коха, путем высева на поверхность чашки Петри на агар Чапека.

В результате восстановления установлено, все исследуемые штаммы микромицетов сохранили свою жизнеспособность, при этом культурально-морфологические свойства остались без изменений. Исследования по радиальной скорости роста исследуемых микромицетов после восстановления представлены на рисунках 1 и 2.

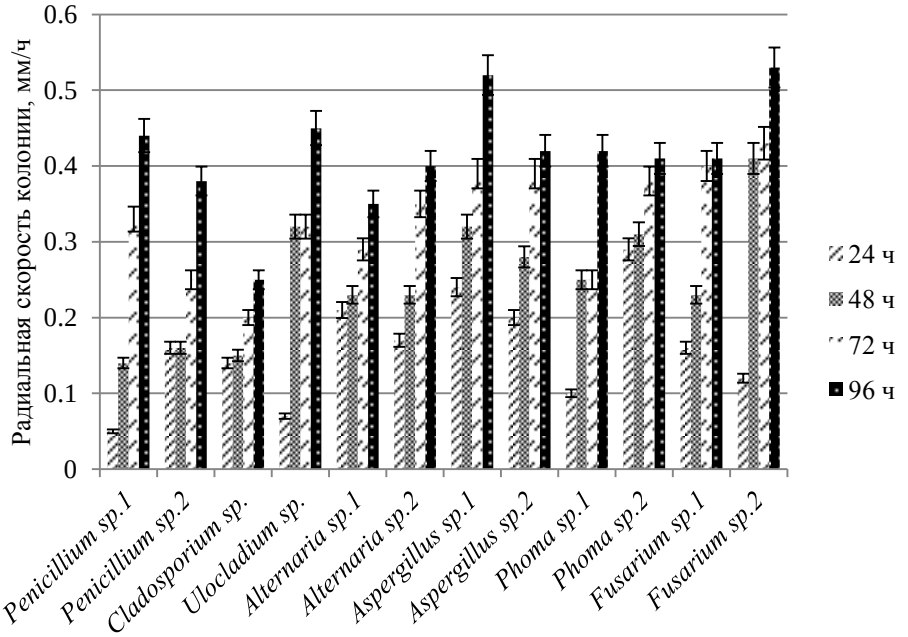

Рис. 1. Радиальная скорость роста микромицетов после хранения под вазелиновым маслом в холодильной камере

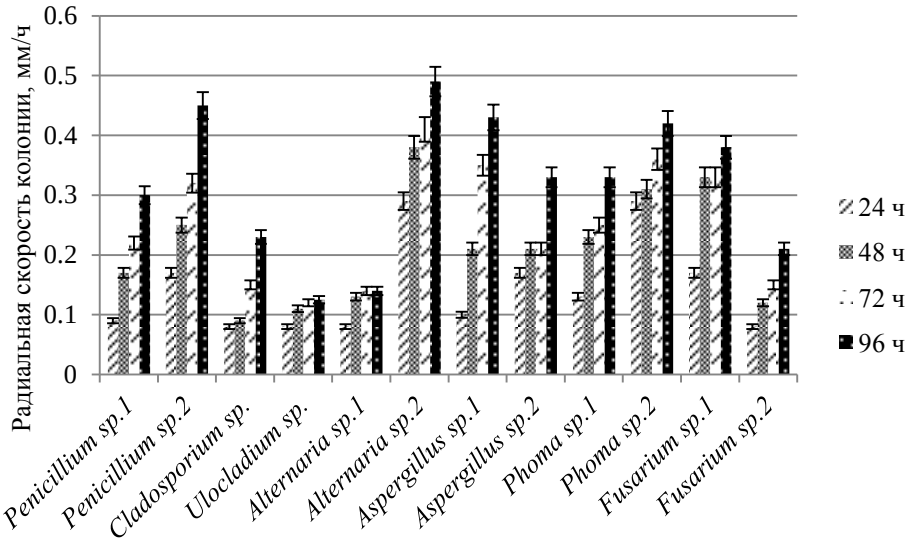

Рис. 2. Радиальная скорость роста микромицетов после хранения под вазелиновым маслом в морозильной камере

В результате изучения радиальной скорости роста при восстановлении установлено, что при хранении в холодильной камере штаммы *Ulocladium sp.*, *Cladosporium sp.* и *Fusarium sp.2* проявляют большую активность, чем при хранении в морозильной камере. Остальные штаммы микромицетов проявляют приблизительно одинаковую активность после восстановления.

Подбор методов длительного хранения штаммов дрожжей показал, что замораживание с использованием криопротекторов глюкозы в составе среды Сабуро и пектина не изменяет культурально-морфологических свойств исследуемых штаммов. При размораживании-оттаивании штаммов дрожжей численность клеток составила 10^4-10^5 КОЕ/мл, что является достаточным для восстановления.

В результате микробиологических исследований установлено, что метод хранения под минеральным маслом и глицерином является оптимальным методом хранения штаммов микромицетов в лабораторных условиях, при этом хранение под минеральным маслом в холодильной камере не влияет на культурально морфологические свойства исследуемых штаммов. Замораживание штаммов дрожжей на среде Сабуро и среде с пектином показало, что после восстановления все исследуемые штаммы сохранили свою жизнеспособность.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алиев Р.А., Звягинцев Д.Г. Влияние предварительной температурной обработки на ферментативную активность почв // Биол. науки, 1976. № 3. С. 106-113.
2. Абдулгамидова, С.М. Сравнительная эффективность различных методов длительного хранения дрожжей рода Candida // Вестник Харьковского Национального Университета, №828. Серия: Биология. 2008. В.8. С.132-136.
3. Белясова, В.И. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2012. № 4 (12). С. 99-121.
4. Егоров, Н.С. Практикум по микробиологии. Учебное пособие. М. : изд-во Моск. ун-та, 1976. 308 с.
5. Еремеева, С.В. Плесневые грибы. Методы выделения, идентификации, хранения: учеб, пособие. Астрахань. гос. техн. ут-т. Астрахань: Изд-во АГТУ, 2011. 112 с.
6. Охапкина В. Ю., Шабалин Б. А. Методы поддержания микробных культур. Часть 1. Криоконсервация // Теоретическая и прикладная экология, 2009. № 1. С. 18–26.
7. Похиленко В. Д., Баранов А. М., Детушев К. В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. 2009. № 4 (12). С. 99–121.
8. Савкина О. А., Терновский Г. В., Локачук М. Н., Павловская Е. Н., Сафронова В. И. Криоконсервация – перспективный метод хранения промышленно ценных штаммов молочнокислых бактерий и дрожжей // Сельскохозяйственная биология. 2014. № 4. С. 112-119.