

МЕТОДЫ ПОДДЕРЖАНИЯ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР

О. П. Цуркан, Т. Ф. Сырбу

*Национальная коллекция непатогенных микроорганизмов,
Технический университет Молдовы, olga.turcan@imb.utm.md*

Представлен краткий обзор методов сохранения микроорганизмов, используемых в национальных и международных коллекциях живых культур. Описаны важные факторы этапа подготовки отбираемых для консервирования микробных культур, влияющие на результат их хранения. Рассмотрены пути совершенствования методов длительного хранения микроорганизмов, которые могут быть полезны в практической работе.

Ключевые слова: микроорганизмы, консервация, лиофилизация, криоконсервация, криопротекторы.

Биотехнология, основанная на функциональных возможностях микроорганизмов, чрезвычайно важна для мировой экономики. Микроорганизмы (бактерии, в том числе актиномицеты, дрожжи, микромицеты, микроводоросли и цианобактерии) являются прекрасными поставщиками биологически активных веществ, успешно используемых в различных основных отраслях производства, включая сельское хозяйство, медицину и фармацевтику, биоремедиацию, пищевую промышленность, производство биотоплива и др. [1].

Коллекции культур лежат в основе усилий по сохранению биоразнообразия. Их основной целью является хранение точно идентифицированного безмикробного жизнеспособного материала (штаммы микроорганизмов) для исследований, предоставление культур и чистого генетического материала, необходимых для различных биотехнологических приложений, таких как обучение, исследования и другие цели, поскольку их основной задачей является сбор, сохранение и возможность производить общедоступные микробные штаммы. Таким образом, коллекции культур играют важную роль не только в развитии биотехнологических отраслей и образования, но, что более важно, в сохранении штаммов микроорганизмов, являющихся частью наследия страны [1, 2].

В настоящее время для консервации микроорганизмов применяют различные методы, но все современные методы консервации и длительного хранения культур микроорганизмов основаны на переводе клеток в анабиотическое состояние с частичным состоянием (хранение на средах с минимальным содержанием питательных веществ, в стерильных сосудах, под слоем минерального масла, в дистиллированной воде, при пониженных температурах и др.) или полного (высушивание, лиофилизация, криоконсервация и др.) прекращения обмена веществ. Каждый из методов имеет свои преимущества и недостатки и может по-разному влиять не только на жизнеспособность, но и на сохранение характерных свойств и физиологических, биохимических и ге-

нетических признаков культуры [3–5]. Наиболее распространенными методами сохранения микроорганизмов в коллекциях являются:

1. Поддержание культур путем периодического пересева их на жидкие и/или агаризованные среды – традиционный способ хранения микроорганизмов, осуществляемый путем периодического культивирования на свежих питательных средах. Коллекции культур выращивают как в жидкой среде, так и на агар-агаре. Интервал между пересевами зависит от вида микроорганизма, используемой среды и внешних условий. Некоторые микроорганизмы необходимо постоянно пересевать, другие – через несколько недель или месяцев. При использовании этого метода необходимо учитывать следующие условия: 1) подходящая питательная среда; 2) условия выращивания (температура хранения, световой режим); 3) необходимый период выращивания и пересева. В целом поддержание различных штаммов микроорганизмов в коллекциях в жизнеспособном состоянии требует значительных затрат материальных средств, времени и требует высокой квалификации персонала. Например, любая коллекция, в том числе признанные коллекции типа SAG, UTEX, CCAP, сталкивается с явлениями непредсказуемой гибели культур; контаминацией штаммов грибами, бактериями, простейшими и др.; с проблемами ошибок маркировки при пересевах штаммов. Необходимость поддерживать генетическую стабильность видов, а также высокая стоимость и трудоемкость последовательного пересева привели к разработке методов долгосрочного сохранения, которые имеют разную эффективность [1, 4, 6].

Одним из современных методов консервирования микроорганизмов является *лиофилизация* – способ содержания клеток в сухом состоянии в течение длительного времени без доступа кислорода, влаги и света, при низких температурах, обычно при 4°C [7]. Лиофилизация не обеспечивает 100% сохранения жизнеспособности клеток микроорганизмов и не всегда обеспечивает высочайшее качество высушенного продукта. Установлено, что процесс лиофилизации приводит к отбору в культуре наиболее устойчивых клеток, которые могут не обладать нужными свойствами. На процесс лиофилизации могут влиять негативные факторы, воздействующие на клеточные структуры, а именно кристаллы льда механически повреждают мембрану и внутриклеточные структуры. Особую опасность они представляют при медленном замораживании, когда образуются более крупные кристаллы. Большое количество экспериментальных данных показывает, что процесс сублимационной сушки вызывает мутации многих видов микроорганизмов [2, 8]. Однако некоторые исследователи считают, что лиофилизация обеспечивает большую стабильность, чем периодический пересев, для широкого спектра микроорганизмов, а клетки, пережившие процесс лиофилизации, могут сохранять жизнеспособность в течение многих лет. Экспериментально установлено, что метод лиофилизации успешно применяется для сохранения микроорганизмов, размножающихся акинетами (спорами), таких как цианобактерии, микромицеты, актиномицеты, бактерии [9]. Важным моментом в процессе лиофилизации является использование веществ, защищающих клетки от негативного воз-

действия низких температур – криопротекторов. В качестве криопротекторов используют обезжиренное молоко, глюкозу, сахарозу, глицерин, ДМСО (диметилсульфоксид) и др. Например, в случае водорослей в качестве криопротекторов в большинстве случаев используют ДМСО (диметилсульфоксид) или глицерин в концентрациях 5 или 10% [3, 6].

Криоконсервация считается наиболее эффективным методом длительного сохранения организмов путем содержания микроорганизмов при низкой температуре. Способ заключается в переводе биологических объектов в состояние холодового анабиоза с последующим возвратом их к метаболической активности в физиологически оптимальных условиях культивирования. По температуре заморзания все методы криоконсервации можно разделить на два основных типа: а) методы, предусматривающие выдерживание клеток при температуре выше температуры жидкого азота; б) методы криоконсервации, предусматривающие хранение клеток при температуре жидкого азота. Наиболее благоприятный диапазон температур для холодильного хранения микробных культур составляет от -60°C до -130°C , т. е. температуры значительно ниже эвтектической точки клеточных суспензий (для большинства суспензий микроорганизмов эвтектическая точка находится в интервале при -5°C до -15°C , но для некоторых растворов ниже -30°C) [5, 8]. Для успешного сохранения различных видов микроорганизмов методами низкотемпературного хранения и криоконсервации применяют предварительную сушку клеток на обезвоженных носителях, что способствует их безболезненному замораживанию в состоянии холодового анабиоза. Известно, что чем более обезвожен микроорганизм, тем лучше он переносит замораживание и повторные циклы замораживания – оттаивания. Для криоконсервации можно использовать суспензию клеток или спор микроорганизмов, либо 5% агаровые диски с культурой, как в растворе криопротектора, так и без него [10].

Другим методом, используемым в практике коллекции культур, является *иммобилизация клеток*, или захват в гелеобразующей матрице. Данный метод является еще одной альтернативой для длительного сохранения жизнеспособности и функциональности микробов. Хорошо известным методом является образование микрокапель или шариков с различными гелеобразующими агентами, такими как альгинат и гуммиарабик. Имобилизованные клетки микроорганизмов обычно лучше переносят стрессы, связанные с лабораторной консервацией. Мягкая иммобилизация может создавать специфическое микроокружение для отдельных клеток, в этом случае иммобилизационная матрица функционирует как капсула или гликокаликс – структура с реальным образом жизни и сохранением микроорганизмов в естественных условиях [6, 11]. Этому методу уделяется особое внимание в пробиотической промышленности из-за высокой выживаемости и функциональности иммобилизованных клеток по сравнению с другими методами. Несколько микроорганизмов, имеющих пробиотическое значение, таких как бифидобактерии и энтерококки, были сохранены с помощью этого метода с хорошим ответом [7, 12].

Таким образом, можно сказать, что многочисленные исследования показали, что не существует единого метода или протокола консервации и криопротектора, оптимально работающего для каждого типа образцов. Разные образцы и клетки ведут себя по-разному с разными криопротекторами и условиями хранения. Поэтому концепция сохранения микроорганизмов актуальна, и вызывает интерес ученых к разработке новых стратегий сохранения микробного биоразнообразия в течение длительного периода времени без изменения организации, жизнеспособности и функциональности микроорганизмов.

Библиографический список

1. Day J. G., Brand J. J. Cryopreservation methods for maintaining cultures // In: *Algal Culturing Techniques*. Eds. R. A. Andersen. Academic Press : New York, 2005. P. 165–187.
2. Cryopreservation of economically valuable marine micro – algae in the classes Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cyanophyceae, Dinophyceae, Haptophyceae, Prasinophyceae, and Rhodophyceae / L. Rhodes, J. Smith, R. Tervit, R. Roberts, J. Adamson, S. Adams, M. Decker // *Cryobiology*. 2006. Vol. 52. Iss. 1. P. 152–156.
3. Beker M. E., Liepin'sh G. K., Kudryavtsev V. I. Liofilizatsiya bakterij [Lyophilization of bacteria]. In : *Metody hraneniya kollektzij kul'tur* [Methods for storing crop collections]. Moscow : Nauka, 1967. P. 119–130.
4. The Characteristics and Importance of Microalgae Culture Collections / D. Y. Duygu, A. U. Udoh, T. Özer, I. A. Erkaya // *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*. 2017. Vol. 13. No. 1. P. 80–87.
5. Sidiyakina T. M. Metody konservatsii mikroorganizmov [Microorganism Preservation Methods]. In : *Seriya «Konservatsiya geneticheskikh resursov»* [Series «Conservation of genetic resources»]. ONTI NTSBI AN SSS, Puschino, 1988. P. 58.
6. Conservation of microalgal type material : Approaches needed for 21st century science / J. G. Day, T. Proschold, T. Friedl, z M. Loren, P. S. Silva // *TAXON*. 2010. Vol. 59. No. 1. P. 3–6. doi: 10.2307/27757045
7. Kupletskaya M. B., Netrusov A. I. Viability of Lyophilized Microorganisms after 50Year Storage // *Microbiology*. 2011. Vol. 80. No. 6. P. 850–853. doi: 10.1134/S0026261711060129
8. Iturriaga R., Sullivan C. V. Long-term preservation of microalgal cells and their optical properties // *Oceanography*. 2015. Vol. 3. No. 1. P. 2332–2632. doi: 10.4172/2332-2632.1000134
9. Lin L. P. Microstructure of spray-dried and freeze-dried microalgal powders // *Food microstructure*. 1985. Vol. 4. No. 2. P. 341–348.
10. Zdenek H. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms // *Cryobiology*. 2003. Vol. 46. No. 3. P. 205–229. doi: 10.1016/S0011-2240(03)00046-4
11. Luz E. De-B., Bashan Y. Joint Immobilization of Plant Growth-Promoting Bacteria and GreenMicroalgae in Alginate Beads as an Experimental Model for Studying Plant-Bacterium Interactions // *Applied and environmental microbiology*. 2008. Vol. 74. No. 21. P. 6797–6802. doi: 10.1128/AEM.00518-08
12. Om. P., Nimonkar Y. S., Desai D. A Recent Overview of Microbes and Microbiome Preservation // *Indian Journal of Microbiology*. 2020. Vol. 60. No. 3. P. 297–309. doi: 10.1007/s12088-020-00880-9