

У.Т.Арыкпаева, К.Х.Алмагамбетов, К.А.Калдарбекова,
Б.Б.Динкаева, А.С.Махатова, А.А.Ескараева, Р.К.Ергебаева

*РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», Астана
(E-mail: rcmkz@list.ru)*

Перспективы инновационной технологии хранения промышленных микроорганизмов контактно-сорбционным методом

Были разработаны и испытаны 6 вариантов контактно-сорбционного метода, все они показали эффективность их применения, которое оценивалось с учетом максимального показателя жизнеспособности. В качестве сорбента были взяты отечественные препараты «Тагансорбент» с ионами серебра, «Алтайсорбент» (ТОО «Сорбент», г. Усть-Каменогорск, РК). Также были отобраны наиболее доступные, простые в использовании и менее затратные варианты закладки на хранение контактно-сорбционным методом.

Ключевые слова: коллекция, контактно-сорбционный метод, сорбенты, микроорганизмы различной таксономической группы, жизнеспособность, хранение, лиофилизация, криоконсервация, субкультивирование, биологическая активность.

Введение

Актуальной остается проблема разработки комплексного подхода к консервации микроорганизмов, учитывающего как известные сведения о процессах, выработанных естественным отбором и способствующих сохранению микроорганизмов в природе, так и эмпирические достижения лабораторного хранения.

Длительное хранение клеток без утраты ценных свойств проводится методами, обеспечивающими существенное торможение протекающих у них жизненных процессов. Это достигается путем глубокого замораживания микроорганизмов или их высушивания из замороженного (лиофилизация) либо непосредственно из жидкого состояний (*L*-высушивание). Известно, что при длительном хранении культур микроорганизмов в музейных условиях, отличающихся от природных и производственных, некоторые свойства коллекционных культур ослабевают или даже утрачиваются [1, 2].

Одно из решений существующей проблемы по эффективному сохранению и развитию ресурсов промышленных коллекций заключается во внедрении методов хранения ценных культур современными технологиями с использованием субкультивирования контактно-сорбционным методом на различных носителях.

Успешность лабораторных программ консервации, несомненно, может быть повышена, если будут использоваться популяции клеток, реализующие свойственные им процессы «самоконсервации» либо индуцированные к этому соответствующими экспериментальными воздействиями с использованием различных инновационных методов хранения, в том числе субкультивирование с использованием контактно-сорбционного метода на различных носителях [3].

Материалы и методы

Объекты исследования: коллекционные культуры — бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы, бациллы, лактобактерии, различные сорбенты отечественного производства.

Методы исследования: микробиологические.

Оценка жизнеспособности и культурально-морфологических свойств микроорганизмов различных таксономических групп коллекции, заложенных на хранение субкультивированием контактно-сорбционным методом на носителях, путем их сравнения для определения преимуществ и недостатков того или иного носителя [4].

Культуральные признаки изучали на плотных и жидких питательных средах. Инкубировали в зависимости от таксономической группы при оптимальной температуре до 2–7 суток. Описание характера роста на жидких питательных средах оценивали по следующим признакам: 1) наличие пристеночного кольца; 2) наличие, характер, толщина поверхностной пленки; 3) характер и интенсивность мути; 4) цвет, структура, количество осадка.

Оценка показателя жизнеспособности культур микроорганизмов методом Miles&Misra и определение количества жизнеспособных клеток культуры методом последовательных посевов [5, 6].

Результаты и обсуждение

Нами были испытаны 6 вариантов контактно-сорбционного метода, все они показали эффективность их применения, которое оценивалось с учетом максимального показателя жизнеспособности. В качестве сорбента брали отечественные препараты «Тагансорбент» с ионами серебра, «Алтайсорбент» (ТОО «Сорбент», г. Усть-Каменогорск, РК) на первом этапе хранения.

В ходе работы установлено, что показатель жизнеспособности стабилен при хранении во всех шести вариантах. Поэтому нами был проведен сравнительный анализ этапов подготовки каждого варианта с учетом доступности, простоты в использовании и менее затратных вариантов закладки на хранение контактно-сорбционным методом.

Недостатки 1-го варианта: на этапе стерилизации сорбента при температуре 110 °С тратилось много времени, т.е. 20–22 ч. Перед началом работ пробирки с сорбентом влаги охлаждали в течение 1–2 ч при температуре минус 20 °С, также проводили дополнительную процедуру, требующую времени.

Недостатки 2-го варианта: проведение контактно-сорбционного обезвоживания целевого продукта (микроорганизмы) на 2 этапе требуется охлаждать до минус 8–10 °С сорбентом с остаточной влажностью менее 1 % при массовом соотношении 1:10, требуется дополнительное время на охлаждение и регламентацию остаточной влажности.

Недостатки 4-го варианта: полученную клеточную суспензию смешивают с охлажденным до –18...–22 °С сорбентом в соотношении 1:6,5–7,5, проводится дополнительная процедура охлаждения. На этапе досушивания при комнатной температуре требуется по регламенту длительное время, т.е. 65–72 ч (до 3-х суток) в запечатанных пробирках.

Недостатки 5-го варианта: высушивали нелиофильным способом в течение 48 ч при температуре 50 °С, использовался адсорбционный метод сушки культуры, этот фактор (50 °С) отрицательно влиял на культуральные свойства, вызывая изменения S-формы колоний в R-форму, практически все штаммы дрожжей диссоциировали в данном варианте.

В силу этих причин для дальнейшей работы были отобраны наиболее доступные, простые в использовании и менее затратные варианты закладки на хранение контактно-сорбционным методом: 3 и 6, которые при текущем этапе работы, с учетом всех результатов и количества отработанной суспензии и защитной среды, были признаны эффективными.

В вариантах контактно-сорбционного метода также были отработаны следующие положения:

1. Отработан объем суспензии (250 мкл суспензии микроорганизмов + 250 мкл 10 % молока), при внесении в адсорбент образуется минимум жидкости, при этом меньше времени уходит на сушку при использовании 3 и 6 вариантов.

2. Количество адсорбента 200 мг является наиболее оптимальным для поглощения 500 мкл жидкости.

Также нами в ходе работы была выбрана наиболее упрощенная схема реактивации. Реактивацию после консервации методом КСО проводили введением в часть пробирок физиологического раствора, охлажденного до 2–4 °С, в часть пробирок неохлажденного физиологического раствора, с последующим высевом 0,1 мл содержимого на плотную питательную среду. При сравнении использованных физиологических растворов, охлажденного до 2–4 °С и неохлажденного, не установлено влияния разницы на результаты, поэтому мы исключили процедуру охлаждения физиологического раствора. В дальнейших исследованиях предусмотрена серия опытов по лиофилизации дубликатов культур вариантов, заложенных на хранение контактно-сорбционным методом.

Микроскопия препаратов, приготовленных из коллекционных микроорганизмов различных таксономических групп, заложенных на хранение контактно-сорбционным методом с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента» на 3-м и 6-м вариантах КСО, показала полное соответствие морфологии клеток исходным данным до закладки на хранение и паспортным данным по этому признаку.

Для продолжения экспериментального исследования на втором этапе нами были использованы отобранные варианты заложенных на хранение контактно-сорбционным методом: 3 и 6 с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента» выше приведенных коллекционных штаммов микроорганизмов различных таксономических групп. Была определена эффективность хранения микроорганизмов контактно-сорбционным методом через 3 месяца с их количественной оценкой ЖСП по мето-

ду Miles&Misra и методом последовательных посевов, контролем количественной оценки служил качественный показатель высева штамма после реактивации (табл. 1).

Т а б л и ц а 1

Количественная характеристика микроорганизмов через 3 месяца хранения на 3-м варианте с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента»

Таксономическая группа	Количество клеток		Результаты М±m	
	степень разведений 10 ⁸	степень разведений 10 ⁹	10 ⁸	10 ⁹
Бактерии («Тагансорбент») ТС	От 1,8 до 5,2	От 0,8 до 2,2	3,5±0,7	3,4±0,7
Бактерии («Алтайсорбент») АС	От 2,2 до 5,6	От 1,8 до 3,8	4,2±0,6	2,5±0,6
Дрожжи (ТС)	От 2,8 до 5,4	От 2,2 до 4,2	3,9±0,6	3,5±0,5
Дрожжи (АС)	От 4,4 до 6,6	От 3,8 до 5,2	5±0,6	3,7±0,5
Грибы (ТС)	От 7,4 до 8,6	От 1,4 до 5,8	5±0,7	3,3±0,7
Грибы (АС)	От 4,6 до 8,2	От 2,8 до 4,4	4,8±0,8	3,8±0,6

Окончательный вариант реактивации после консервации методом КСО включает: введение в пробирки с испытуемым штаммом физиологического раствора с последующим высевом 0,1 мл содержимого на соответствующую данному микроорганизму плотную питательную среду (см. рис.).

На рисунке показана количественная характеристика МКБ через 3 месяца хранения с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента» после реактивации и титрования.

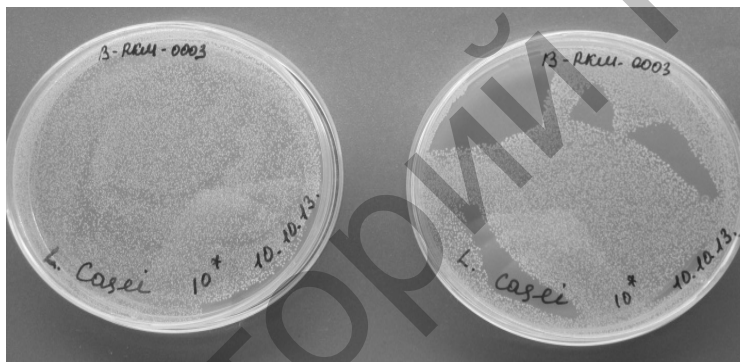


Рисунок. Количественная характеристика МКБ *Lactobacillus casei* MRKM 0003 через 3 месяца хранения с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента» после реактивации и титрования

Т а б л и ц а 2

Количественная характеристика микроорганизмов через 3 месяца хранения на 6-м варианте с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента»

Таксономическая группа	Количество клеток		Результаты М±m	
	степень разведений 10 ⁸	степень разведений 10 ⁹	10 ⁸	10 ⁹
Бактерии («Тагансорбент») ТС	От 1,4 до 5,6	От 1 до 5,3	5±0,6	3,4±0,7
Бактерии («Алтайсорбент») АС	От 1 до 2,4	От 0,6 до 1,8	4±0,9	3,7±0,8
Дрожжи (ТС)	От 2,2 до 3,6	От 1,2 до 1,6	3±0,4	2,4±0,4
Грибы (ТС)	От 1,4 до 6,6	От 0,8 до 4,8	4,4±0,8	3,5±0,6
Грибы (АС)	От 2,4 до 2,8	От 1,4 до 4,6	4,3±0,7	3,1±0,6

Результаты количественной и качественной оценок эффективности хранения коллекционных микроорганизмов различных таксономических групп контактно-сорбционным методом с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента» через 3 месяца, их культурально-морфологическая характеристика и анализ литературы по данной проблеме позволили нам сделать некоторые обоснования и требования при использовании данного метода.

1. Сущность метода КСО заключается в обезвоживании микроорганизмов при контакте с сорбентом влаги, в результате чего микроорганизмы теряют воду и метаболические процессы резко замедляются.

2. КСО с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента» позволяет консервировать и сохранять различные группы микроорганизмов без потери ими своих основных биологических свойств (морфологических и культуральных, изученных нами на этом этапе).

3. Предпочтительнее использовать в качестве защитной при КСО минимальные среды, поскольку в них процессы метаболизма микроорганизмов идут с пониженными скоростями и поэтому промежутки между пересевами удлиняются.

4. При использовании комплексной среды могут потребоваться более частые пересевы, связанные с ускоренным ростом микроорганизмов или накоплением конечного продукта метаболизма.

5. Для уменьшения высыхания культур необходимо использовать пробирки с завинчивающимися крышками или резиновые пробки (если нет необходимости высушивания).

6. Для уменьшения скорости метаболизма микроорганизмов культуры необходимо хранить в бытовом холодильнике при температуре 5–8 °С (кроме условий хранения при других показателях).

7. Частоту пересевов определяют экспериментальным путем, стараясь проводить их как можно реже во избежание селекции вариантов.

8. Используя эти меры предосторожности, можно сохранять большинство бактерий в течение 3–5 месяцев и более без посева (сроки наблюдения на данном этапе).

9. Реактивацию после консервации проводят введением в пробирку или флакон физиологического раствора с последующим высевом 0,1 мл содержимого на плотную питательную среду (через определенные сроки хранения).

10. КСО не требует специального оборудования, значительных физических и экономических затрат.

Таким образом, контактно-сорбционный метод, не требующий специального оборудования, значительных физических и экономических затрат, позволяет консервировать и длительно сохранять различные группы микроорганизмов без потери ими своих основных биологических свойств.

Из изложенного выше можно сделать следующее заключение:

Были разработаны и испытаны 6 вариантов контактно-сорбционного метода, все они показали эффективность их применения, которое оценивалось с учетом максимального показателя жизнеспособности. В качестве сорбента были взяты отечественные препараты «Тагансорбент» с ионами серебра и «Алтайсорбент» (ТОО «Сорбент», г. Усть-Каменогорск, РК) на первом этапе хранения.

В ходе работы было установлено, что показатель жизнеспособности стабилен при хранении во всех шести вариантах контактно-сорбционного метода. При проведении сравнительного анализа этапов подготовки каждого варианта отобраны для дальнейших исследований 3-й и 6-й варианты.

При испытании различных вариантов контактно-сорбционного метода также были отработаны и оптимизированы следующие положения:

- отработан объем суспензии и защитной среды (250 мкл суспензии микроорганизмов + 250 мкл 10 % молока), при внесении в адсорбент образуется минимум жидкости, при этом меньше времени уходит на сушку при использовании отобранных вариантов;

- количество адсорбента 200 мг является наиболее оптимальным для поглощения 500 мкл жидкости;

- также нами в ходе работы была выбрана наиболее упрощенная схема реактивации после хранения на адсорбентах.

Выводы

1. Заложены 50 штаммов микроорганизмов 5 таксономических групп на различные сроки хранения контактно-сорбционным методом с использованием препаратов «Тагансорбент» и «Алтайсорбент» в качестве носителей.

2. Проведено изучение качественных и количественных показателей 50 коллекционных штаммов промышленных микроорганизмов: бактерий, дрожжей, мицелиальных грибов, бацилл, лактобактерий, заложенных на хранение контактно-сорбционным методом.

3. Проведен сравнительный анализ этапов подготовки каждого варианта с учетом доступности, простоты в использовании и менее затратных вариантов закладки на хранение контактно-сорбционным методом на адсорбентах, и отобраны для дальнейших исследований 3-й и 6-й варианты.

4. КСО с использованием «Тагансорбента» и «Алтайсорбента» позволяет консервировать и сохранять различные группы микроорганизмов без потери ими своих основных биологических свойств (морфологических и культуральных, изученных нами на этом этапе).

5. Предпочтительнее использовать в качестве защитной при КСО минимальные среды, поскольку в них процессы метаболизма микроорганизмов идут с пониженными скоростями и поэтому промежутки между пересевами удлиняются.

6. Для уменьшения высыхания культур необходимо использовать пробирки с завинчивающимися крышками или резиновые пробки (если нет необходимости высушивания).

7. Для уменьшения скорости метаболизма микроорганизмов культуры необходимо хранить их в бытовом холодильнике при температуре 5–8 °С (кроме условий хранения при других показателях).

Список литературы

- 1 Лозина-Лозинский Л.К. Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам // Очерки по криобиологии — Л.: Наука, 1972. — 288 с.
- 2 Maintenance of microorganisms: A manual of laboratory methods / Ed. by B.Kirsop, J.Snell. — London: Acad. Press, 1984. — 207 p.
- 3 Porter J.N. Cultural conditions for antibiotic-producing microorganisms // Methods in enzymology. — N.Y.: Acad. Press, 1975. — Vol. 43: Antibiotics. — P. 3–23.
- 4 Smith D. The preservation and maintenance of living fungi / D.Smith, A.H.S.Onions. Kew (Richmond); Surrey (England): Commonwealth Mycol. Inst. Publ., 1983. — 51 p.
- 5 Бекер М.Е., Рапопорт А.И., Калакуцкий Л.В. Торможение жизнедеятельности клеток. — Рига: Зинатне, 1987. — 240 с.
- 6 Бузолева Л.С. Некультивируемые формы бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* при периодическом культивировании // Бюл. экспериментальной биологии и медицины. — 2000. — Т. 129, № 4. — С. 444–447.

У.Т.Арыкпаева, К.Х.Алмагамбетов, К.А.Қалдарбекова,
Б.Б.Динкаева, А.С.Махатова, А.А.Есқараева, Р.К.Ергебаева

Ұштасу-сорбциялық әдіспен өндірістік микроағзаларды инновациялық технологиямен сақтау болашағы

Мақалада ұштасу-сорбциялық әдісінің 6 нұсқасы зерттелді және олар барлығы қолдануда тиімді, микроорганизмдердің өмір сүру мүмкіндігі жоғары екендігін көрсетті. Сорбенттер ретінде отандық препараттар: күміс ионды «Тагансорбент» және «Алтайсорбент» (АОҚ «Сорбент» ЖШС, Өскемен қ., ҚР) алынды. Сонымен қатар қарапайым, аз шығынды нұсқалар таңдалып алынып, сақтауға жіберілді.

У.Т.Арыкпаева, К.Х.Алмагамбетов, К.А.Қалдарбекова,
Б.Б.Динкаева, А.С.Махатова, А.А.Есқараева, Р.К.Ергебаева

Prospects for innovative storage technology industrial microorganisms contact-sorption method

6 variants of contact-sorption method was developed and tested. The effectiveness of their application, which was estimated considering the maximum rate of viability, has been shown. Sorbents of domestic origin such as Tagansorbent with silver ions and Altaysorbent (Corporation «Sorbent», town of Ust-Kamenogorsk, Republic of Kazakhstan) were used. The most accessible, simple in use and less costly variants of storage of microorganisms using contact-sorption method were selected.

References

- 1 Lozina-Lozinski L.K. *Essays in cryobiology*, Leningrad: Nauka, 1972, 288 p.
- 2 *Maintenance of microorganisms: A manual of laboratory methods*, Ed. by B.Kirsop, J.Snell, London: Acad. Press, 1984, 207 p.
- 3 Porter J.N. *Methods in enzymology*, N.Y.: Acad. Press, 1975, 43: Antibiotics, p. 3–23.
- 4 Smith D. *The preservation and maintenance of living fungi*, Commonwealth Mycol. Inst. Publ., 1983, 51 p.
- 5 Becker M.E., Rapoport A.I., Kalakutsky L.V. *Inhibition of cell activity*, Riga: Zinatne, 1987. 240 p.
- 6 Buzoleva L.S. *Bull. of Experimental Biology and Medicine*, 2000, 129, 4, p. 444–447.

Сведения об авторах

Арыкпаева У.Т. — доктор медицинских наук, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», Астана.

Алмагамбетов К.Х. — доктор медицинских наук, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», Астана.

Калдарбекова К.А. — младший научный сотрудник магистр биологии, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», г. Астана.

Динкаева К.А. — младший научный сотрудник, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», Астана.

Махатова А.С. — младший научный сотрудник, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», Астана.

Ескараева А.А. — инженер, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», Астана.

Ергебаева Р.К. — инженер, РГП «Республиканская коллекция микроорганизмов», Астана.

Information about authors

Arykpaeva U.T. — Doctor of medical sciences, RSE «Republican collection of microorganisms», Astana.

Almagambetov K.Kh. — Doctor of medical sciences, RSE «Republican collection of microorganisms», Astana.

Kaldarbekova K.A. — Junior research worker Master of biology, RSE «Republican collection of microorganisms», Astana.

Dinkaeva B.B. — Junior research worker, RSE «Republican collection of microorganisms», Astana.

Makhatova A.S. — Junior research worker, RSE «Republican collection of microorganisms», Astana.

Eskaraeva A.A. — Engineer, RSE «Republican collection of microorganisms», Astana.

Ergebaeva R.K. — Engineer, RSE «Republican collection of microorganisms», Astana.