

БИОЛОГИЯ

МРНТИ 34.27.05

**С. С. Ануарбекова, Э. Нагызбеккызы, С. С. Даулбай,
Г. К. Абитаева, Н. Е. Бекенова**

Республиканская коллекция микроорганизмов
г. Астана, Казахстан

ОТРАБОТКА УСЛОВИЙ ЛИОФИЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Аннотация. Благодаря своей способности фиксировать молекулярный азот, тем самым повышая плодородие почвы и стимулирование роста растений, представители рода *Agrobacterium* и *Rhizobium* используются в сельском хозяйстве для получения азотных биоудобрений. Необходимым условием успешной работы с микроорганизмами является правильное подержание их с целью сохранения не только жизнеспособности клеток, но и таксономических и производственных свойств. В статье представлены данные по отработке условий лиофильного хранения культур микроорганизмов, обладающих азотфиксирующими свойствами. Работа выполнялась с применением классических методов микробиологии. Отрабатывались два варианта лиофилизации с использованием трех защитных сред на основе желатины. При всех разновидностях высушивания показатели стабильны, в пределах 10^7 КОЕ/мл. Это свидетельствует об их эффективности. В дальнейшей работе можно делать выбор при применении той или иной защитной среды. Полученные данные будут использованы на практике для длительного хранения азотфиксирующих микроорганизмов методом сублимационной сушки.

Ключевые слова: азотфиксирующие микроорганизмы, лиофильное хранение, микробиология.



Түйіндеме. Молекулалық азотты фиксирлейтін қасиетінің қабілеттілігі арқасында топырақ құнарлығын көтеру және өсімдік өсуін ынталандыруда *Agrobacterium* және *Rhizobium* түрлері ауыл шарушылығында азотты биотыңайтқыш алу үшін қолданылады. Микроорганизмдермен жақсы жұмыс жасауда қажетті шарты оларды сақтау мақсатында тек қана жасуша өміршеңдігін сақтау емес, таксономикалық және өндірістік қасиетін қол-

дау болып табылады. Мақалада азотфиксирлейтін қасиеттеріне ие микроорганизмдер дауылдарын лиофильді сақтау шарттарын жасаудағы мәліметтер көрсетілген. Жұмыс микробиологияның классикалық әдістерін қолдану арқылы орындалды. Желатин негізіндегі үш қорғау ортаны қолданумен лиофилизацияның екі нұсқасы жасалды. Әр түрлі кептірудегі көрсеткіштер 10^7 КОЕ/мл аралығында тұрақты. Бұл олардың эффективті екенін растайды. Әрі қарай жұмыста екі қорғау ортасын қолдануға таңдау жасауға болады. Алынған мәліметтер тәжірибеде сублимациялық кептіру әдісімен азотфиксирлейтін микроорганизмдерді ұзақ уақыт сақтау үшін қолданылатын болады.

Түйінді сөздер: азотты фиксирлейтін микроорганизмдер, лиофильді сақтау, микробиология.



Abstract. Due to its ability to fixation molecular nitrogen, thereby increasing soil fertility and stimulate growth of the plants, genus *Agrobacterium* and *Rhizobium* are used in agriculture to produce nitric biofertilizer. A necessary condition of successful work with microorganisms is properly maintaining them with the aim of preserving not only the viability of the cells, but the taxonomic and industrial properties. The article presents the data on improvement of conditions of lyophilic storage of cultures of microorganisms with nitrogen-fixing properties. The work was carried out with the use of classical methods of Microbiology. Perfected two options lyophilization using three protective environments on the basis of gelatin. The study revealed that in all varieties of drying the viability of a stable, within 10^7 CFU/ml. It testifies to their effectiveness. In further work, you can make a choice with the application of a protective environment. The obtained data will be used in practice for long-term storage of nitrogen-fixing microorganisms by method of freeze drying.

Key words: nitrogen-fixing microorganisms, freeze-storage, microbiology.

Введение. Практическое применение современных биологических знаний, интенсивное развитие биотехнологии открывают возможность решения важнейших проблем здравоохранения, ветеринарии, фармакологии, пищевой промышленности, аграрного сектора, охраны окружающей среды. Благодаря научным достижениям микробиологии, внедрению новых разработок генной инженерии, стало возможным получение высокотехнологичных штаммов микроорганизмов с повышенной продуктивностью [1-6]. Неотъемлемым компонентом фундаментальной базы практически любого биотехнологического проекта являются коллекции культур.

Основные требования к поддержанию культур в коллекции – сохранение их жизнеспособности (ЖСП), аутентичности, чистоты, соответствие научных названий штаммов современной номенклатуре. В ведущих коллекциях мира для поддержания ЖСП микроорганизмов применяются методы, которые можно разделить на 2 группы: поддержание штаммов в метаболически активном состоянии (субкультивирование; хранение под слоем минерального масла) и метаболически неактивном состоянии (лиофилизация и криоконсервация). Обязательным условием является использование как минимум 2-х методов хранения. Данное требование выполняется и в РКМ, где применяются такие методы хранения, как лиофилизация, криоконсервация, субкультивирование на скошенных агаризованных средах и субкультивирование под минеральным маслом.

Одна из сложных задач бактериологии – сохранение микробов в том состоянии, в каком они были выделены. Содержание и пассажи на искусственных питательных средах способствуют изменчивости микроорганизмов и их вырождению. Поэтому в целях сохранения культур микробов исследователи стараются применять методы, которые исключают размножение и снижают процессы обмена. К таким методам относится лиофилизация [7].

Хранение лиофильно высушенных клеток – широко распространенный метод длительного сохранения микроорганизмов. Лиофилизацией называют процесс высушивания под вакуумом замороженных клеток. Лиофильно-высушенные клетки сохраняются во флаконах и в ампулах, запаянных под вакуумом или в струе стерильного газа (чаще всего азота). Применение этого метода позволяет в течение 10-20 лет и более сохранить без заметных изменений ЖСП, морфологические, культуральные, физиологические свойства, а также биохимическую активность клеток и производственную ценность [8].

Таким образом, коллекции культур микроорганизмов гарантируют сохранение ресурсов микробного разнообразия, обеспечивают их патентоохранность и обеспечивают ими потребность образования, науки и производства. Биологические запа-

сы коллекций истощают себя. Для пополнения коллекций культур микроорганизмов перспективными для прикладной и научной деятельности штаммами необходимо проводить работы по получению новых штаммов путем выделения их и селекции, что постоянно проводится.

Для развития народного хозяйства необходимо растениеводство направить на прирост урожая различных культур, защиту их от вредителей и от заболеваний инфекционной природы. В современной системе земледелия приоритет должен отдаваться экологически безопасным природоохранным технологиям возделывания сельскохозяйственных культур. В связи с этим всевозрастающее значение приобретают биопрепараты на основе агрономически полезных микроорганизмов. Наилучшими считаются полифункциональные биопрепараты с длительным сроком сохранности оптимального количества жизнеспособных клеток, экономичные при изготовлении и удобные в использовании. Исходя из этого, важным этапом является подбор и оптимизация питательных сред, субстратов и условий культивирования бактерий [9-17].

Среди процессов, от которых зависит биологическая продуктивность, одной из важнейших является фиксация микроорганизмами азота атмосферы. Проблема биологической азотфиксации относится к числу основных проблем сельскохозяйственной и биологической науки за счет того, что содержание доступного растениям азота в почве обычно невелико. Поэтому повышение урожайности сельскохозяйственных растений связано в первую очередь с улучшением их азотного питания.

Дефицит азота в значительной степени компенсируется биологическим путем, в основном за счет запаса азота, аккумулированного в почве микроорганизмами, в первую очередь азотфиксирующими. Многие сельскохозяйственные объединения с черноземными землями не используют минеральные удобрения и получают удовлетворительные урожаи. По расчетам же, за это время почвы должны были бы потерять весь находящийся в них азот. В том, что этого не происходит, заслу-

га культур микроорганизмов, обладающих азотфиксирующими свойствами. Существуют 2 группы фиксирующих атмосферный азот микроорганизмов. Одна из них находится в симбиозе с высшими растениями, образуя клубеньки на корнях, а именно клубеньковые бактерии. Микроорганизмы другой группы обитают в почве независимо от растений. К ним относятся азотобактер, клубеньки, бейеринкия и другие свободноживущие микроорганизмы. Потенциальные возможности симбиотических азотфиксаторов значительно выше, чем свободноживущих.

Цель работы: отработка условий хранения азотфиксирующих культур микроорганизмов методом лиофилизации для сохранения их свойств.

Методы исследований

Метод лиофилизации

Микроорганизмы выращивали в оптимальных условиях и затем их суспендировали в защитных средах. Полученную суспензию разливали в пенициллиновые флаконы из нейтрального стекла по 1-2 мл, замораживали при низких температурах, затем высушивали на аппарате лиофильной сушки [8, 9].

Оценка показателя жизнеспособности культур микроорганизмов по методу Р. Коха

Определение числа микроорганизмов этим методом [9] включает 3 этапа:

- приготовление разведений;
- посев на плотную среду в чашки Петри;
- подсчет выросших колоний.

Лучшим разведением считается то разведение, где наблюдается рост от 30-50 до 100-150 колоний. Результаты параллельных высевов из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из разведения на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле:

$$M = a \cdot 10^n / V,$$

где M – количество клеток в 1 мл;

a – среднее число колоний при высеве разведения, из которого сделан высев;

V – объем суспензии, взятый для посева, мл;

10^n – коэффициент разведений.

Результаты и их обсуждение. Объектами исследования являются 5 азотфиксирующих культур, представленные родами *Agrobacterium* и *Rhizobium*.

Для лиофилизации использовался аппарат лиофильного высушивания «BenchTop Virtis» (США).

Перед закладкой на хранение методом лиофилизации выполнена оценка максимального показателя ЖСП. Допустимая выживаемость микробных клеток, внедряемых в производство и депонируемых в коллекции, должна соответствовать 10^7 и более для того, чтобы они в дальнейшем не утратили данную активность и не были утеряны сами.

Культуры обладают допустимыми требованиями (не менее 10^{-7}): 10^{-7} - 10^{-10} .

Для сохранения ЖСП бактериальных клеток в период лиофилизации и последующего хранения большое значение имеют состав защитной среды, остаточная влажность препаратов, температура хранения.

Основная роль защитной среды заключается в защите клеток от повреждений, поддержании их максимального показателя выживаемости и сохранении их производственной ценности.

В ходе работы над параметрами лиофильного высушивания нами отработаны два варианта лиофилизации, которые представлены в схеме (рисунок).

II вариант лиофилизации отличается от I варианта этапом замораживания культур: после замораживания при минус 20°C в течение 2-х ч закладывали на замораживание при минус 80°C в течение 2-х суток.

Остаточная влажность препаратов в обоих случаях составляла 3,0–4,0 % (допустима в пределах 1–6 %). После лиофилиза-

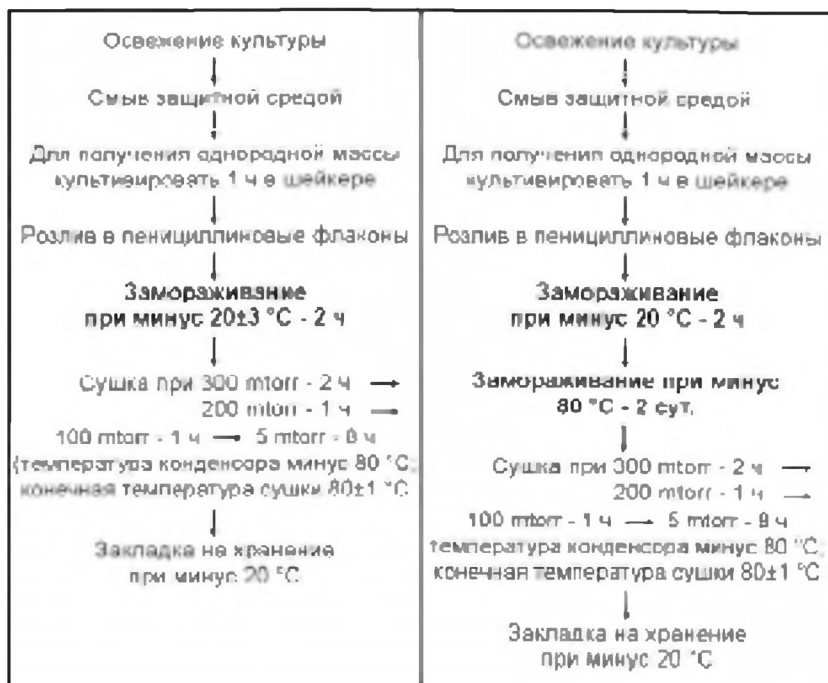


Схема I и II варианта лиофильного высушивания азотфиксирующих микроорганизмов

ции флаконы хранили при температуре минус 20 °С. При этом применяли 3 защитные среды:

- 1-я среда – желатинозно-сахарозная среда Файбича: 1/10;
- 2-я среда – среда с 8 % сахарозы и 4 % тиомочевины;
- 3-я среда – 20 % сахарозы.

Результат выживаемости азотфиксирующих бактерий представлен в таблице.

Оценивали результаты 2-х вариантов лиофилизации с использованием 3-х разновидностей защитной среды. В целом показатели стабильны, наблюдалось некоторое снижение ЖСП в пределах 1-2 порядков, но в пределах допустимой нормы – до 10⁻⁷.

**Выживаемость азотфиксирующих микроорганизмов
при лиофилизации, КОЕ/мл**

| Наименование культуры | I вариант | | | II вариант | | |
|---------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 1 среда | 2 среда | 3 среда | 1 среда | 2 среда | 3 среда |
| <i>A. tumefaciens</i> Z-2 | 10 ^{-8*} | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ |
| | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ |
| | 25×10 ⁻⁸ | 25×10 ⁻⁷ | 75×10 ⁻⁷ | 10×10 ⁻⁷ | 15×10 ⁻⁷ | 5×10 ⁻⁷ |
| | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ |
| <i>A. tumefaciens</i> Z-4 | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ |
| | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ |
| | 10 ⁻⁷ | 10×10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ |
| | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁶ | 10 ⁻⁷ |
| <i>R. pusense</i> Z-5 | 3,75×10 ⁻⁸ | 3,75×10 ⁻⁸ | 3,75×10 ⁻⁸ | 3,75×10 ⁻⁸ | 3,75×10 ⁻⁸ | 3,75×10 ⁻⁸ |
| | 3×10 ⁻⁸ | 3,5×10 ⁻⁸ | 3×10 ⁻⁸ | 5×10 ⁻⁸ | 3×10 ⁻⁸ | 3,75×10 ⁻⁸ |
| | 75×10 ⁻⁷ | 70×10 ⁻⁷ | 1×10 ⁻⁸ | 10×10 ⁻⁷ | 2×10 ⁻⁸ | 68×10 ⁻⁷ |
| | 65×10 ⁻⁷ | 10×10 ⁻⁷ | 75×10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ | 5×10 ⁻⁷ |
| <i>R. pusense</i> Z-8 | 7,5×10 ⁻⁹ | 7,5×10 ⁻⁹ | 7,5×10 ⁻⁹ | 7,5×10 ⁻⁹ | 7,5×10 ⁻⁹ | 7,5×10 ⁻⁹ |
| | 5×10 ⁻⁹ | 5×10 ⁻⁸ | 1,5×10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁹ | 10×10 ⁻⁹ | 7,5×10 ⁻⁹ |
| | 55×10 ⁻⁸ | 5×10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁹ | 5×10 ⁻⁹ | 10×10 ⁻⁸ |
| | 5×10 ⁻⁸ | 5×10 ⁻⁷ | 15×10 ⁻⁸ | 55×10 ⁻⁸ | 10×10 ⁻⁸ | 1×10 ⁻⁸ |
| <i>A. tumefaciens</i> Z-9 | 7,5×10 ⁻¹⁰ | 7,5×10 ⁻¹⁰ | 7,5×10 ⁻¹⁰ | 7,5×10 ⁻¹⁰ | 7,5×10 ⁻¹⁰ | 7,5×10 ⁻¹⁰ |
| | 7,5×10 ⁻¹⁰ | 3×10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻¹⁰ | 7,5×10 ⁻⁹ | 23×10 ⁻¹⁰ |
| | 7×10 ⁻⁹ | 5,5×10 ⁻⁹ | 10 ⁻¹⁰ | 10 ⁻⁹ | 5×10 ⁻⁹ | 4×10 ⁻⁹ |
| | 42×10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁸ | 5×10 ⁻⁸ | 25×10 ⁻⁸ | 55×10 ⁻⁸ | 55×10 ⁻⁸ |

Примечание:

* Столбиком сверху вниз представлены цифры ЖСП: исходные показатели, через 1 мес., 3 мес. и через 6 мес. хранения.

Выводы. Таким образом, опробованы различные условия лиофильного метода хранения к штаммам бактерий рода *Agrobacterium* и *Rhizobium*.

В процессе оценки эффективности лиофилизации установлено, что оба варианта дают положительный результат, но рациональнее использовать I вариант, который короче по времени проведения процедуры на 48 час., что дает более быструю по срокам закладку на хранение азотфиксирующих микроорганизмов методом лиофилизации.

Все три исследуемые нами защитные среды эффективны, т. е. сохраняют культуры в активном состоянии. В дальнейшем при выборе среды для лиофильного высушивания азотфиксирующих микроорганизмов можно выбор сделать на более дешевую среду.

Данные, полученные в ходе работы, вносят вклад в развитие коллекционного дела и будут использованы на практике в Республиканской коллекции микроорганизмов для длительного хранения азотфиксирующих микроорганизмов методом лиофильного высушивания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 *Егорова Т. А., Клунова С. М., Живухина Е. А.* Основы биотехнологии: 3-е изд. – М.: Академия, 2006. – 208 с.
- 2 *Сазыкин Ю. О., Орехов С. Н., Чакалева И. И.* Биотехнология. – М.: Академия, 2006. – 254 с.
- 3 *Шлегель Г. Г.* Общая микробиология: пер. с нем. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
- 4 *Бери Д.* Биология дрожжей. – М.: Мир, 1985. – 95 с.
- 5 *Дудикова Г. Н.* Биотехнологические основы использования лактобацилл для защиты зернопродуктов от бактериальной контаминации: Автореф.. докт. биол. наук. – Алматы, 2002. – 320 с.
- 6 Каталог культур микроорганизмов. – Астана, 2003. – 186 с.
- 7 *Нетрусов А. И., Егорова М. А., Захарчук Л. М.* и др. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. вузов. – М.: Академия, 2005. – 608 с.

8 Руководство к практическим занятиям по микробиологии / под ред. Н. С. Егорова. – М.: Моск. ун-т, 1995. – 220 с.

9 Бирюков В. В., Кантере В. М. Оптимизация периодических процессов микробиологического синтеза. – М.: Наука, 1985. – 296 с.

10 Церковняк Л. С., Курдиш И. К. *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 – перспективный продуцент БАВ для растениеводства // Міжнар. наукова конф. «Мікробні біотехнології»: Тез. доповідей. – Одеса: Астропринт, 2006. – С. 104.

11 Булавенко Л. В., Курдиш И. К. Фосфатазная активность *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Мікробіол. журн. – 2005. – 67, № 4. – С. 21-27.

12 Грязнева Т. Н. Разработка глубинного способа культивирования бацилл – компонентов пробиотика Биод-5 // Биотехнология. – 2004. – № 5. – С. 67-68.

13 Курдиш И. К. Гранулированные микробные препараты для растениеводства: наука и практика. – Киев: КВІЦ, 2001. – 142 с.

14 Полянская Л. М., Ведена О. Т., Лысак Л. В., Звягнецев Д. Т. Стимуляция роста растений культурами *Beijerinckia* и *Clostridium* // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 1. – С. 123-129.

15 Рой А. А., Рева О. Н., Смирнов В. В., Курдиш И. К. Биологические свойства фосфатмобилизирующего штамма *Bacillus subtilis* ИМВ В-7023 // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40, № 5. – С. 551-557.

16 Рой А. А., Залопило О. В., Чернова Л. С., Курдиш И. К. Антагонистическая активность фосфатмобилизирующих бацилл к фитопатогенным грибам и бактериям // Агроэкологический журнал. – 2005. – № 1. – С. 50-55.

17 Церковняк Л. С., Курдиш И. К. Фосфатмобилизирующие бактерии *Bacillus subtilis* – продуценты соединений фенольной природы // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 3. – С. 311-317.