

Опыт многолетнего хранения промышленных микроорганизмов и высших грибов в жидком азоте

А.Е. АНАНЬИНА, А.А. ЦУЦАЕВА, Л.М. БАЛЫБЕРДИНА, Л.В. СТЕПАНИЮК, Л.Г. ЧЕРНЫШЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Широкое использование микроорганизмов – продуцентов биологически активных веществ в различных отраслях промышленности, медицине и сельском хозяйстве сделало необходимым расширение работ по разработке способов получения новых штаммов и их хранения.

Развитие биотехнологии и биоинженерии сделало возможным получение микроорганизмов с более высокой продуктивной активностью. Однако такие микроорганизмы в процессе хранения могут подвергаться спонтанным мутациям, приводящим к потере продуктивной активности, что явилось основанием для проведения исследований по разработке эффективных способов долгосрочного хранения. В настоящее время приоритетным для хранения различных промышленных микроорганизмов является криоконсервирование, т.е. способ их перевода в состояние глубокого холодового анабиоза с последующим возвратом в нормотермию.

На основании вышеизложенного целью работы было изучение свойств промышленных микроорганизмов после криоконсервирования и хранения в жидком азоте (-196°C) в течение длительного периода.

Объекты исследования: продуцент антибиотика тилозина (*Streptomyces fradiae* – 4 штамма), молочнокислые стрептококки (*Streptococcus cremoris*, *Streptococcus lactis*), *Bacillus thuringiensis subsp. galleriae*, бифидобактерии (*Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3), хлебопекарные дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae* – 3 штамма), сине-зеленая микроводоросль (*Spirulina platensis*), бактериофаги (Т4 и jX174), высшие грибы (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus calistratus*).

Известно, что технологический процесс криоконсервирования многоэтапен и зависит от ряда таких факторов, как исходное состояние микроорганизмов (стадия роста культуры и плотность популяции микробных клеток в суспензии), среда консервирования, условия охлаждения-отогрева и хранения.

На основе проведенных экспериментальных исследований разработаны оптимальные программы криоконсервирования промышленных микро-

организмов. Наибольшая криоустойчивость отмечалась у споровых культур стрептомицетов, *Bacillus thuringiensis*, молочнокислых стрептококков, *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3. Для этих микроорганизмов оптимальной была скорость охлаждения $300-400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. Замораживание *Spirulina platensis* проводилось со скоростью охлаждения $400^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ с применением криопротектора диметилсульфоксида. Для вегетативных культур стрептомицетов, хлебопекарных дрожжей, бактериофагов и мицелия высших грибов оптимальными являются медленные и средние скорости охлаждения. Установлено, что различная криоустойчивость характерна не только для разных родов, видов, но и разных штаммов микроорганизмов. Так, после криоконсервирования трех рас дрожжей по оптимальным программам значительное снижение жизнеспособности отмечалось только у расы Томская-7, четыре штамма споровой культуры *Streptomyces fradiae* обладали различной криочувствительностью.

После криоконсервирования и хранения в жидком азоте изучались морфофункциональные свойства и жизнеспособность исследуемых микробных культур.

Установлено, что после хранения в течение 1 года *Spirulina platensis* была жизнеспособной, но наблюдалась задержка накопления биомассы. При хранении *Bifidobacterium bifidum* ЛВА-3 в течение 5 лет жизнеспособность составляла 88-90% и кислотообразование достоверно не изменялось. При хранении бактериофагов в течение 15 лет титр сохранялся на уровне 84-86%, скорость адсорбции фагов на клетках и антигенные свойства достоверно не изменялись. Показано, что при хранении в течение 20 лет жизнеспособность молочнокислых стрептококков составляла 97-98%, протеолитическая активность и кислотообразование достоверно не изменялись. Хранение *Bacillus thuringiensis* в течение 20 лет обеспечивало 85-90% жизнеспособных клеток без достоверного изменения инсектицидных свойств. После 20-летнего хранения *Streptomyces fradiae* антибиотическая активность споровой культуры достоверно не изменялась, а количество жизнеспособных клеток составляло 85-99%, выживаемость вегетативной культуры сохранялась на уровне 60-90%. Установлено, что после хранения в течение 1-13 лет зерновой мицелий высших грибов

Адрес для корреспонденции: Ананьина А.Е., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-26, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

оставался жизнеспособным, но наблюдалась задержка скорости его роста.

Несмотря на разработанные оптимальные индивидуальные программы криоконсервирования у микроорганизмов могут возникать нелетальные повреждения, которые выражаются в удлинении латентного периода роста у молочнокислых стрептококков, *Bacillus thuringensis*, спироулины, бактериофагов и мицелия высших грибов. При замораживании стрептомицетов может увеличиваться количество жизнеспособных единиц как следствие фрагментации гиф, дающих дополнительные центры роста макроколоний. Нелетальные повреждения проявляются также в ингибиции процессов синтеза ДНК, РНК и белка. При переводе микробных клеток в состояние нормотермии нелетальные повреждения репарируются при культивировании микроорганизмов (в первом пассаже). В некоторых случаях после криоконсервирования отмечалась резкая стимуляция продукции антибиотика у споровой культуры *Streptomyces fradiae*.

Установлено, что в процессе хранения микроорганизмов в жидком азоте в течение длительного периода времени у микробных культур дополнительных изменений морфофункциональных свойств, кроме возникающих сразу после замораживания-отогрева, не обнаруживалось.

Представленные результаты исследований показывают, что криоконсервирование промышленных штаммов микроорганизмов и высших грибов по индивидуальным оптимальным программам и хранение в жидком азоте при -196°C обеспечивали высокую сохранность исходных свойств и продуктивной активности в течение многих лет.