

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 6, Number 306 (2014), 60 – 64

APPLICATION OF CRYOCONSERVATION FOR STORAGE OF CELLULOLYTIC AND LACTIC ACID BACTERIA

A. K. Dzhobulaeva, A. V. Alimbetova, K. M. Kebekbaeva G. T. Dzhakibaeva

«Institute of microbiology and virology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: lazzat8523ru09@mail.ru; karla57@mail.ru; J.Gulnar60@mql.ru

Key words: strains, viability, activity, bacteria, cryoconservation.

Abstract. The aim of the present work was determination viability and activity of industrial strains of microorganisms after one year of storage in liquid nitrogen (-196°C). Microbiological and statistical methods were in-process used.

Control of viability of cellulolytic and lactic acid bacteria after storage in liquid nitrogen showed the decline of survivability on a1 order (from 10^{10} to 10^9).

As for their cellulolytic activity, then after storage in liquid nitrogen she a bit went down also. Only at the cultures of *Bacillus* sp. 19 and *Bacillus* sp. 90 activity was saved at the same level.

Application of results domain: food industry and agriculture.

Conclusion: Undertaken studies showed the cryoconservation can be successful used for storage of collection strains of cellulolytic and lactic acid bacteria without a loss by them to viability and activity.

УДК 579.23

ПРИМЕНЕНИЕ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ДЛЯ ХРАНЕНИЯ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ И МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

А. К. Джобулаева, А. В. Алимбетова, К. М. Кебекбаева, Г. Т. Джакибаева

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

Ключевые слова: штаммы, жизнеспособность, активность, бактерии, криоконсервация.

Аннотация. Целью настоящей работы было определение жизнеспособности и активности промышленных штаммов микроорганизмов после 1 года хранения в жидким азоте (-196°C). В работе использовались микробиологические методы.

Определение жизнеспособности целлюлолитических и молочнокислых бактерий после хранения в жидким азоте показало снижение выживаемости на 1 порядок (с 10^{10} до 10^9) в сравнении с контролем. Что касается их целлюлолитической активности, то после хранения в жидким азоте она также немного снизилась. Только у культур *Bacillus* sp. 19 и *Bacillus* sp. 90 активность сохранилась на том же уровне.

Область применения результатов: пищевая промышленность и сельское хозяйство.

Выводы: Проведенные исследования показали, что криоконсервация может успешно использоваться для хранения коллекционных штаммов целлюлолитических и молочнокислых бактерий без потери ими жизнеспособности и активности.

Любая практическая область применения микроорганизмов нуждается в стабильных, долгоживущих, максимально специализированных и экологически безопасных культурах этих микроорганизмов.

Традиционные методы поддержания культур микроорганизмов сводятся к их выращиванию на богатых питательных средах с частыми пересевами. При этом имеют место мутационные

изменения и автоселекция, что часто приводит к потере у штаммов важных физиологобиохимических свойств. Длительное хранение культур без потери ценных свойств у продуцентов возможно, если резко затормозить все протекающие в них жизненные процессы, в том числе и генетические перестройки. При этом культура переводится в состояние, близкое к анабиозу [1, 2].

Эффективным способом долгосрочного хранения различных микроорганизмов является криоконсервирование – перевод биологических объектов в состояние глубокого холодового анабиоза (-196°C) с последующим возвратом их к метаболической активности в физиологически оптимальных условиях культивирования [3-6]. Криоконсервацию, или хранение при температуре жидкого азота, начали использовать для консервации микроорганизмов сравнительно недавно [7-9]. На практике используют эмпирические подходы для подбора режимов замораживания конкретных объектов, так как выживаемость и стойкость микроорганизмов при замораживании в среде жидкого азота зависит от ряда факторов. Например: вид клеток и их концентрация в суспензии (чувствительность бактерий к замораживанию и оттаиванию сильно варьирует в зависимости от их принадлежности к тому или иному виду). Немаловажное значение имеют физико-химические свойства, количественное содержание бактерий и ряд других свойств микробной биомассы, подлежащей замораживанию); состав защитной среды для криозамораживания (для сохранения микроорганизмов при замораживании существенным является выбор защитной среды, природы и химического строения присутствующего в ней криопротектора и физико-химических особенностей его взаимодействия с компонентами жидкой и твердой фаз клетки); режим охлаждения (при замораживании происходит образование микрокристаллов льда внутри и снаружи клеток. Характер этих изменений зависит от свойств продукта и криопротектора, но главным образом, от скорости охлаждения). При криоконсервации относительное число жизнеспособных клеток значительно выше, чем при лиофилизации, и жизнеспособность сохраняется при длительном хранении в жидком азоте, поэтому возможное время хранения микроорганизмов неограниченно увеличивается. Эффективность сохранения микроорганизмами жизнеспособности и продуктивных свойств зависит от способов перевода и вывода их из состояния глубокого холодового анабиоза. В этой связи для представителей различных родов, видов и штаммов микроорганизмов, при необходимости, разрабатываются индивидуальные эффективные технологии криоконсервирования, предусматривающие сохранение максимального количества жизнеспособных клеток микроорганизмов без изменения их исходных свойств [10, 11]. Широко используются низкотемпературные банки для хранения микроорганизмов различных таксономических групп.

Целью настоящей работы было определение жизнеспособности и активности промышленных штаммов микроорганизмов после 1 года хранения в жидком азоте (-196°C).

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования служили коллекционные штаммы целлюлолитических бактерий: *Cellulomonas effuse* 60CS, *Cellulomonas biazotea* 150, *Bacillus licheniformis* 98, *Bacillus* sp.90, *Bacillus coagulans* 177, *Bacillus* sp.19 и молочнокислых бактерий: *L.acidophilus* 27W, *L.cellulosus* 20, *L.fermentum* 27, *L.plantarum* 2, *L.casei* 173 a, *L.plantarum* 22, *L.curvatus* 18, *L.salivaris* 8, *L.plantarum* 53H, *L.casei* 139.

Криоконсервацию бактерий проводили путем непосредственного погружения в жидкий азот. В качестве криопротектора использовали 10% раствор глицерина.

Для определения жизнеспособности использовали метод серийных разведений с последующим высевом на агаризованную среду и подсчитывали количество выросших колоний.

Активность целлюлолитических бактерий определяли диффузионным методом. Культуры выращивали на мясо-пептонном агаре в течение трех суток на чашках Петри сплошным газоном, затем вырезали блоки и помещали на чашки со средой Гетчинсона: NaNO_3 – 2,5 г, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 1 г, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 г, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 г, NaCl – 0,1 г, $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г, дрожжевой экстракт – 1 г, агар – 20 г, карбоксиметилцеллюлоза – 2 г, дистilledированная вода – 1 литр. По истечению трех суток чашки окрашивали 0,1% раствором красителя конго-красного и выдерживали 20 минут, затем смывали 8% раствором NaCl . Об активности целлюлолитических бактерий судили по наличию зоны просветления вокруг блоков.

Антагонистическую активность молочнокислых бактерий устанавливали диффузионным методом в отношении тест-культур: *Esherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*.

Статистическую обработку полученных данных проводили по общепринятой методике [12].

Результаты исследования и их обсуждение

Так как одним из основных показателей, отражающих способность микроорганизмов к восстановлению, является выживаемость культур, то было проведено исследование влияния криоконсервации на выживаемость 6 целлюлолитических бактерий. До закладки на хранение культура в жидкий азот была проверена их жизнеспособность и активность.

Микроорганизмы хранили в жидком азоте при температуре – 196°C в течение года. Для оценки степени сохранности микробных культур определяли их жизнеспособность и активность. Результаты опыта представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Жизнеспособность и активность целлюлолитических бактерий до и после хранения в жидком азоте

№	Название культур	Жизнеспособность, КОЕ, мл		Активность (диаметр зон, мм)	
		до закладки на хранение	после закладки на хранение	до закладки на хранение	после закладки на хранение
1	<i>Cellulomonas effuse</i> 60CS	$4,8 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^9$	$26 \pm 0,3$	$25 \pm 0,2$
2	<i>Bacillus licheniformis</i> 98	$9,0 \times 10^{10}$	$0,9 \times 10^9$	$30 \pm 0,5$	$27 \pm 0,4$
3	<i>Bacillus coagulans</i> 177	$5,2 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^9$	$28 \pm 0,4$	$24 \pm 0,2$
4	<i>Cellulomonas biazotea</i> 150	$4,7 \times 10^{10}$	$1,2 \times 10^9$	$30 \pm 0,5$	$27 \pm 0,6$
5	<i>Bacillus</i> sp. 19	$3,2 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^9$	$35 \pm 0,7$	$35 \pm 0,7$
6	<i>Bacillus</i> sp. 90	$2,4 \times 10^{10}$	$2,7 \times 10^9$	$19 \pm 0,7$	$19 \pm 0,7$

Как видно из результатов, в процессе криоконсервации количество жизнеспособных клеток изменилось незначительно, произошло небольшое снижение жизнеспособности. После 1 года хранения количество жизнеспособных клеток у целлюлолитических бактерий уменьшилось на один порядок с 10^{10} до 10^9 . Что касается их целлюлолитической активности, то после хранения в жидком азоте она также немного снизилась. Только у культур *Bacillus* sp. 19 и *Bacillus* sp. 90 активность сохранилась на том же уровне.

Контроль жизнеспособности молочнокислых бактерий после хранения в жидком азоте также показал небольшое снижение выживаемости на 1 порядок. Возможно, сказалось отрицательное действие криоконсервации, которое не удалось избежать. А также был сделан неправильный выбор оптимальных скоростей в режиме замораживания и оттаивания и нарушены репаративные процессы, которые зависят от подобранных криопротекторов и сред, применяемых для замораживания.

Таблица 2 – Жизнеспособность молочнокислых бактерий после хранения в жидком азоте

№	Название культур	Жизнеспособность, КОЕ, мл	
		До закладки на хранение	После закладки на хранение
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27W	$9,8 \times 10^{10}$	$6,8 \times 10^9$
2	<i>Lactobacillus cellobiosus</i> 20	$10,2 \times 10^{10}$	$7,8 \times 10^9$
3	<i>Lactobacillus fermentum</i> 27	$8,2 \times 10^{10}$	$6,3 \times 10^9$
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	$9,2 \times 10^{10}$	$8,0 \times 10^9$
5	<i>Lactobacillus casei</i> 173 a	$9,3 \times 10^{10}$	$6,5 \times 10^9$
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> 22	$8,5 \times 10^{10}$	$7,7 \times 10^9$
7	<i>Lactobacillus curvatus</i> 18g	$9,7 \times 10^{10}$	$7,5 \times 10^9$
8	<i>Lactobacillus salivarius</i> 8d	$9,6 \times 10^{10}$	$7,1 \times 10^9$
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> 53H	$8,2 \times 10^{10}$	$6,4 \times 10^9$
10	<i>Lactobacillus casei</i> 139	$10,1 \times 10^{10}$	$8,5 \times 10^9$

Антибиотическая активность молочнокислых бактерий складывается из действия продуцируемых бактериоцинов, а также кислот, спиртов, перекисей и других метаболитов, накапливаемых в процессе их роста и развития. В таблице 3 представлены результаты изучения спектров антибиотического действия 10 штаммов молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*.

Таблица 3 – Антагонистическая активность молочнокислых бактерий до и после хранения в жидким азоте

№	Название культур	Активность (диаметр зон, мм)					
		E.coli		Bacillus subtilis		Bac.cereus	
		До закладки на хранение	После закладки на хранение	До закладки на хранение	После закладки на хранение	До закладки на хранение	После закладки на хранение
1	<i>L.acidophilus</i> 27W	10±0,1	13±0,7	11±0,2	15±0,3	11±0,1	13±0,2
2	<i>L.cellulosus</i> 20	13±0,5	12±0,2	10±0,6	13±0,3	12±0,2	11±0,2
3	<i>L.fermentum</i> 27	11±0,3	13±0,4	12±0,4	12±0,4	13±0,4	13±0,1
4	<i>L.plantarum</i> 2	12±0,1	13±0,3	13±0,2	14±0,1	11±0,6	13±0,4
5	<i>L.casei</i> 173 a	11±0,5	14±0,6	12±0,1	14±0,2	11±0,5	14±0,7
6	<i>L.plantarum</i> 22	13±0,3	14±0,5	11±0,3	13±0,6	11±0,6	13±0,5
7	<i>L.curvatus</i> 18g	10±0,7	14±0,5	10±0,5	14±0,7	11±0,2	13±0,3
8	<i>L.salivaris</i> 8d	12±0,6	14±0,2	13±0,4	14±0,4	12±0,4	13±0,2
9	<i>L.plantarum</i> 53H	12±0,4	11±0,1	11±0,4	12±0,1	12±0,3	12±0,1
10	<i>L.casei</i> 139	10±0,4	13±0,2	12±0,2	14±0,6	11±0,3	14±0,4

Антагонистическая активность молочнокислых бактерий после хранения в жидким азоте сохранилась. Исследованные штаммы подавляли рост как грамположительных бактерий, таких как *Bacillus subtilis* и *Bacillus cereus*, кроме факультативно-анаэробных коков *Staphylococcus aureus*, так и грамотрицательных бактерий, таких как факультативно-аэробные палочки *E.coli*. Зоны подавления тест-культур до закладки на хранение у всех штаммов молочнокислых бактерий были небольшие и составляли 10–13 мм. При хранении в жидком азоте у некоторых штаммов наблюдалось повышение активности до 14 мм.

Таким образом, проведенные исследования показали, что криоконсервация может успешно использоваться для хранения коллекционных штаммов целлюлолитических и молочнокислых бактерий без потери ими жизнеспособности и активности.

Работа выполнена в рамках проекта: «Разработка оптимальных методов сохранения промышленно-ценных свойств нефтеокисляющих, целлюлолитических и молочнокислых микроорганизмов» в рамках программы Грантового финансирования МОН РК на 2012–2014 гг.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Беккер М.Е., Дамберг Б.Э., Раппопорт А.И. Анализ микроорганизмов. – Рига: Зиннатне, 1981. – С. 253.
- [2] Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур. Консервация генетических ресурсов. Методы. Проблемы. Перспективы. – Пущино, 1991. – С. 1-159.
- [3] Аркадьев З.А. Факторы, влияющие на жизнеспособность и свойства микроорганизмов при различных методах хранения // Научн. доклады высшей школы. Биол. науки. – 1983. – № 4. – С.93-105.
- [4] Рубан Е.Л. Хранение культур микроорганизмов // Прикл. биохимия и микробиология. – 1989. – Т. 25, вып. 3. – С. 291-301.
- [5] Попов В.К., Сытник К.М., Бражников А.М. и др. Криобиология и биотехнология / Под общей ред. А. А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1987. – С. 216.
- [6] Микулинский Ю.Е., Высекашев И.П., Кадникова Н.Г., Ананьина А.Е. и др. Холодовой стресс и биологические системы / Под общей ред. А. А. Цуцаевой. – Киев: Наук. думка, 1991. – С. 176.
- [7] Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Актуальные проблемы криобиологии. – Киев: Наук. думка, 1981. – С. 606.
- [8] Aswood-Smith M.J. Preservation of microorganisms by freezing freeze-drying and dissiccation // In: Low temperature preservation in medicine and biology / Eds. Aswood-Smith M.J., Farrant J. – L.: Pitman Press., 1980. – P. 219-252.
- [9] Heckly R.J. Preservation of microorganisms // Adv. Appl. Microbiol. – 1978. – Vol. 24. – P. 466-471.
- [10] Pasarell I., McGinnis M.R. Viability of fungal cultures maintained at -70 degrees C // J. Clin. Microbiol. – 1992. – Vol. 30, N 4. – P. 1000-1004.

- [11] Sakurada M., Tsuzuki Y., Morgavi D.P., Tomina Y., Onodera R. Simple method for cryopreservation of an anaerobic rumen fungus using ethylene glycol and rumen fluid // FEMS Microbiol. Lett. – 1995. – Vol. 127, N 3. – P.171-174.
- [12] Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – Л.: Гос. Изд-во мед. лит-ры, 1962. – С. 17.

REFERENCES

- [1] Bekker M.E., Damberg B.E., Rappoport A.I. Anabioz mikroorganizmov. Riga: Zinatne, 1981. S. 253.
- [2] Sidyakina T.M. Konservacia mikroorganizmov v kollekciach kultyr. Koncervacia geneticheskikh resursov. Metodi. Problemi. Perspektivi. Pushino, 1991. S. 1-159.
- [3] Arkadieva Z.A. Faktori, vliyaushie na dziznesposobnost i svoistva mikroorganizmov pri razlichnish metodah hranenia. Nauch. dokladi vishei shkoli. Biol. nauki. 1983. N 4. S. 93-105.
- [4] Ruban E.L. Shranenie kultur mikroorganizmov. Prikl. biohimia i mikrobiologija. 1989. T. 25. Vip. 3. S. 291-301.
- [5] Popov V.K., Sitnik K.M., Braznikov A.M. i dr. Kriobiologija i biotekhnologija. Pod obchei red. A. A. Cucaevoi. Kiev: Nauk. dumka, 1987. C. 216.
- [6] Mikulinskui U.E., Visekancev I.P., Kadnikova N.G., Ananina A.E. i dr. Holodovoi stress I biologicheskie sistemi. Pod obchei red. A. A. Cucaevoi. Kiev: Nauk. dumka, 1991. S. 176.
- [7] Pushkar N.S., Belous A.M. Aktualnie problemi kriobiologii. Kiev: Nauk. dumka, 1981. S. 606.
- [8] Aswood-Smith M.J. Preservation of microorganisms by freezing freeze-drying and dissication. In: Low temperature preservation in medicine and biology. Eds. Aswood-Smith M.J., Farrant J. L.: Pitman Press, 1980. P. 219-252.
- [9] Heckly R.J. Preservation of microorganisms. Adv. Appl. Microbiol. 1978. Vol. 24. P. 466-471.
- [10] Pasarell I., McGinnis M.R. Viability of fungal cultures maintained at-70degress C. J. Clin. Microbiol. 1992. Vol. 30, N 4. P. 1000-1004.
- [11] Sakurada M., Tsuzuki Y., Morgavi D.P., Tomina Y., Onodera R. Simple method for cryopreservation of an anaerobic rumen fungus using ethylene glycol and rumen fluid. FEMS Microbiol. Lett. 1995. Vol. 127, N 3. P. 171-174.
- [12] Ashmarin I.P., Vorobiev A.A. Statisticheskie metodi v mikrobiologicheskikh issledovaniyah. L.: Gos. izdatelstvo med. literaturi, 1962. S. 17.

СҮТ ҚЫШҚЫЛДЫ ЖӘНЕ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИКАЛЫҚ БАКТЕРИЯЛАРДЫ САҚТАУ ҮШИН КРИОКОНСЕРВАЦИЯНЫ ҚОЛДАНУ

А. К. Джобулаева, А. В. Алимбетова, К. М. Кебекбаева, Г. Т. Джакибаева

ҚР БжФМ ФК «Микробиология және вирусология институты» РМК, Алматы, Қазақстан

Тірек сөздер: штамдар, тіршілікке қабілеттілік, белсенділік, бактериялар, криоконсервация.

Аннотация. Бұл жұмыстың мақсаты 1 жылғы сұйық азотта (-196⁰C) сақтаудан кейінгі микроорганизмдердің өндірістік штамдарының тіршілікке қабілеттілігінің және белсенділігінің сақталуын анықтау болып табылады. Жұмыста микробиологиялық әдістер қолданылды.

Сұйық азотта сақтаудан кейінгі сүт қышқылды және целлюлолитикалық бактериялардың тіршілікке қабілеттілігін анықтау, олардың бақылаумен салыстырғанда, тіршілікке қабілеттілігінің 1 бірлікке (10^{10} ден 10^9 дейін) төмендегендігін көрсетті. Ал олардың целлюлолитикалық белсенділігіне келетін болсақ, яғни сұйық азотта сақтаудан кейін біраз төмендеген. Тек ғана *Bacillus sp.* 19 және *Bacillus sp.* 90 культурашында белсенділік сол деңгейде сақталынғаны анықталды.

Нәтижелердің қолданылатын салалары: ауылшаруашылығы және тамақ өнеркәсібі.

Корытынды: Жүргізілген зерттеулер, сүт қышқылды және целлюлолитикалық бактериялардың коллекциялық штамдарының тіршілікке қабілеттілігін және белсенділігін жоғалтпай сақтауда криоконсервацияны қолдану қажет екендігін көрсетті.

Поступила 10.11.2014 г.