

УДК 579.821

Т. Н. Кривицкая, ст. науч. сотр., **В. А. Иваница**, д-р биол. наук, проф.
Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра микробиологии и вирусологии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина

ХРАНЕНИЕ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ *CYTOPHAGA HUTCHINSONII* С НАЛИЧИЕМ ФИТОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ

Приведены результаты десятилетнего хранения коллекционных штаммов целлюлозолитических бактерий, обладающих способностью стимулировать ростовые процессы сельскохозяйственных растений. Изучено влияние лиофилизации и иммобилизации на носителях целлюлозолитических бактерий на жизнеспособность и фитостимулирующую активность. Показана перспективность долгосрочного хранения целлюлозоитических бактерий *Cytophaga hutchinsonii* с наличием фитостимулирующей активности на носителях органической (торф, уголь) и минеральной (тальк) природы. После лиофилизации культуры сохраняют фитостимулирующую активность, несмотря на потерю титра.

Ключевые слова: бактерии, коллекция, хранение, лиофилизация, иммобилизация, носители.

Проблема консервации культур бактерий, в частности, для повышения продуктивности сельскохозяйственных растений остается актуальной. В настоящее время надежным и широко распространенным способом длительного хранения бактериальных культур является лиофилизация. Имеется обширная литература, свидетельствующая о хорошей сохранности при этом способе культур микроорганизмов различных таксономических групп [1-3].

Скользящие целлюлозолитические бактерии рода *Cytophaga* представляют собой группу микроорганизмов, характерной особенностью которых, кроме скользящего движения клеток, является еще и выраженная приуроченность к целлюлозосодержащему субстрату, используемому в качестве единственного источника углерода и энергии.

При разработке способов хранения этой группы бактерий были апробованы такие традиционные способы хранения как хранение на плотных средах под вазелиновым маслом, на полосках фильтровальной бумаги, в дистиллированной воде. Эти методы показали полную непригодность даже при краткосрочном хранении.

Задача исследования — оценка двух способов хранения бактерий *Cytophaga hutchinsonii* (лиофилизация и иммобилизация на носителях) по показателям жизнеспособности клеток и сохранности фитостимулирующей активности с целью выявления оптимального.

Материалы и методы

В работе использовали пять штаммов скользящих целлюлозолитических бактерий *Cytophaga hutchinsonii*, находящихся на хранении в коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии ОНУ и отличающихся между собой по скорости роста: штаммы Т-1, Т-11, Т6-9 — быстрорастущие, а штаммы А6-3, Д4-1 — медленно растущие. В 1995 году эти штаммы были заложены на хранение двумя способами: лиофилизацией и иммобилизацией на дисперсных носителях органической (торф, активированный уголь) и минеральной (тальк) природы.

Предварительно штаммы выращивались на среде Гетчинсона и Клейтона с источником целлюлозы. Для проведения лиофилизации готовили исходные суспензии с содержанием клеток — $n \cdot 10^9$ в 1 мл и разливали в стерильные ампулы. В качестве защитной среды использовали сахарозо-желатиновый агар (СЖА). Иммобилизацию клеток осуществляли нанесением приготовленных исходных суспензий изучаемых культур бактерий на измельченные (размер частиц $< 0,25$ мм) стерильные носители. После контакта и “мягкого” высушивания в термостате при оптимальной температуре выращивания для этой группы бактерий 28–30 °С, иммобилизованные клетки исследуемых культур помещали в стерильные флаконы.

Оценку сохранности культур после лиофилизации и иммобилизации проводили через сутки, месяц, затем через каждые полгода. В работе приводятся данные полученные через сутки, шесть месяцев, год, три года, пять лет и десять лет (табл. 1, 2).

Регидратацию клеток исследуемых культур проводили добавлением к вскрытым ампулам (в случае лиофилизации) и вскрытым флаконам (в случае иммобилизации) стерильного физиологического раствора. Количество жизнеспособных клеток каждого штамма до и после лиофилизации и иммобилизации определяли последовательным титрованием 10-кратных разведений из трех ампул и трех флаконов высевам на среду Гетчинсона и Клейтона с источником целлюлозы в 5-кратной повторности. Численность выживших клеток пересчитывали как среднее всех повторностей в 1 мл для лиофилизированных клеток каждого штамма, а для иммобилизованных клеток пересчет средних значений относился к 1 г носителя.

Сохранность фитостимулирующей активности контролировалась при инокуляции изучаемыми штаммами (после девяти лет хранения двумя способами) семян сельскохозяйственных растений: пшеница сорта “Федоровка”, кукуруза сорта “ОДМА-310”, огурец сорта “Конкурент” (от семян до семидневных проростков); при этом титр клеток был на уровне $n \cdot 10^7$, а в качестве контроля использовались семена тех же растений без инокуляции. Полученные результаты обрабатывали статистически по общепринятым критериям [4].

Результаты и их обсуждение

Результаты изучения жизнеспособности исследуемых штаммов целлюлозолитических бактерий после лиофилизации представлены в табл. 1. Из полученных данных следует, что уже через сутки после лиофилизации наблюдается достоверное ($p < 0,05$) снижение жизнеспособности клеток изучаемых культур на один порядок для быстрорастущих штаммов Т6-9, Т-1 и Т-11 и на два порядка для медленно растущих штаммов А6-3 и Д4-1. При дальнейшем хранении уровень выживаемости штаммов после лиофилизации также закономерно снижался, однако после года хранения темпы этого снижения несколько замедлились, особенно для штамма Т6-9.

Таблица 1
Динамика жизнеспособности бактерий *Cytophaga hutchinsonii* в процессе длительного хранения в лиофилизированном состоянии

| Штаммы <i>Cytophaga hutchinsonii</i> | Численность жизнеспособных клеток (КОЕ в 1 мл суспензии) | | | | | | |
|---|--|-----------------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | До лио- филизации | Сроки хранения после лиофилизации | | | | | |
| | | Сутки | 6 мес. | 1 год | 3 года | 5 лет | 10 лет |
| Т6-9 | $9,8 \cdot 10^9$ | $6,4 \cdot 10^8$ | $6,8 \cdot 10^7$ | $7,0 \cdot 10^6$ | $5,8 \cdot 10^5$ | $6,9 \cdot 10^5$ | $7,1 \cdot 10^4$ |
| Т-11 | $7,6 \cdot 10^9$ | $5,6 \cdot 10^8$ | $5,1 \cdot 10^7$ | $6,2 \cdot 10^6$ | $7,6 \cdot 10^5$ | $5,3 \cdot 10^4$ | $6,2 \cdot 10^3$ |
| Т-1 | $8,3 \cdot 10^9$ | $5,3 \cdot 10^8$ | $6,1 \cdot 10^7$ | $4,8 \cdot 10^6$ | $5,2 \cdot 10^5$ | $4,8 \cdot 10^4$ | $5,8 \cdot 10^3$ |
| А6-3 | $6,9 \cdot 10^9$ | $4,8 \cdot 10^7$ | $5,8 \cdot 10^6$ | $4,5 \cdot 10^5$ | $3,9 \cdot 10^4$ | $3,7 \cdot 10^3$ | $5,1 \cdot 10^2$ |
| Д4-1 | $7,4 \cdot 10^9$ | $4,1 \cdot 10^7$ | $5,5 \cdot 10^6$ | $3,8 \cdot 10^5$ | $4,1 \cdot 10^4$ | $5,6 \cdot 10^3$ | $4,9 \cdot 10^2$ |

Жизнеспособность штаммов А6-3 и Д4-1 была самой низкой и в конце девятилетнего срока наблюдения уровень численности выживших клеток составил 10^2 кл/мл. Из полученных данных также следует, что лиофилизация может обеспечить надежную сохранность жизнеспособности целлюлозолитических бактерий с титром клеток на уровне 10^5 – 10^6 лишь на срок не более одного года.

В настоящее время установлено, что иммобилизация микроорганизмов на различных твердых поверхностях сокращает лаг-фазу, повышает скорость роста и выхода биомассы, увеличивает жизнеспособность клеток, причем, диапазон использования иммобилизованных клеток бактерий постоянно расширяется как для получения биологически активных веществ, в частности экзоферментов, так и для хранения бактерий с практически полезными свойствами [5, 6].

Исходя из этого, было апробовано и использовано несколько дисперсных носителей для хранения культур изучаемой группы бактерий. В работе представлены данные, характеризующие жизнеспособность изучаемых культур бактерий иммобилизованных на трех носителях (табл. 2). Как следует из данных табл. 2, все использованные субстраты позволили длительно сохранить жизнеспособность клеток исследуемых бактерий. После девяти лет хранения титр бактериальных культур оставался на более высоком уровне ($n \cdot 10^4$ — $n \cdot 10^6$), чем при лиофилизации ($n \cdot 10^2$ — $n \cdot 10^4$).

Таблица 2
**Жизнеспособность клеток бактерий *Cytophaga hutchinsonii* в процессе
 длительного хранения после иммобилизации**

| Штаммы <i>Cytophaga hutchinsonii</i> | Носитель | Численность жизнеспособных клеток (КОЕ) в 1 г носителя | | | | | |
|---|------------|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | Сроки хранения после иммобилизации | | | | | |
| | | Сутки | 6 мес. | 1 год | 3 года | 5 лет | 10 лет |
| Т6-9 | Акт. уголь | $5,4 \cdot 10^8$ | $7,9 \cdot 10^7$ | $8,7 \cdot 10^7$ | $6,7 \cdot 10^7$ | $5,8 \cdot 10^7$ | $4,6 \cdot 10^6$ |
| | Тальк | $4,8 \cdot 10^8$ | $8,2 \cdot 10^7$ | $7,6 \cdot 10^7$ | $5,5 \cdot 10^7$ | $4,2 \cdot 10^7$ | $3,4 \cdot 10^6$ |
| | Торф | $6,8 \cdot 10^8$ | $7,4 \cdot 10^7$ | $6,8 \cdot 10^7$ | $5,8 \cdot 10^7$ | $4,6 \cdot 10^7$ | $3,5 \cdot 10^6$ |
| Т-11 | Акт. уголь | $7,3 \cdot 10^8$ | $6,8 \cdot 10^7$ | $6,9 \cdot 10^7$ | $6,2 \cdot 10^7$ | $4,7 \cdot 10^7$ | $4,1 \cdot 10^6$ |
| | Тальк | $5,1 \cdot 10^8$ | $7,1 \cdot 10^7$ | $5,3 \cdot 10^7$ | $4,9 \cdot 10^7$ | $5,1 \cdot 10^7$ | $3,2 \cdot 10^6$ |
| | Торф | $4,6 \cdot 10^8$ | $8,3 \cdot 10^7$ | $7,5 \cdot 10^7$ | $7,2 \cdot 10^7$ | $6,0 \cdot 10^7$ | $3,8 \cdot 10^6$ |
| Т-1 | Акт. уголь | $6,1 \cdot 10^8$ | $6,4 \cdot 10^7$ | $7,1 \cdot 10^7$ | $6,3 \cdot 10^7$ | $5,5 \cdot 10^7$ | $3,6 \cdot 10^6$ |
| | Тальк | $7,2 \cdot 10^8$ | $5,7 \cdot 10^7$ | $4,9 \cdot 10^7$ | $5,2 \cdot 10^7$ | $5,8 \cdot 10^7$ | $3,1 \cdot 10^6$ |
| | Торф | $7,5 \cdot 10^8$ | $7,8 \cdot 10^7$ | $6,3 \cdot 10^7$ | $7,1 \cdot 10^7$ | $6,7 \cdot 10^7$ | $4,5 \cdot 10^6$ |
| А6-3 | Акт. уголь | $4,9 \cdot 10^7$ | $5,6 \cdot 10^6$ | $6,2 \cdot 10^5$ | $5,2 \cdot 10^5$ | $4,1 \cdot 10^5$ | $2,6 \cdot 10^4$ |
| | Тальк | $4,2 \cdot 10^7$ | $6,1 \cdot 10^6$ | $5,4 \cdot 10^5$ | $5,0 \cdot 10^5$ | $3,8 \cdot 10^5$ | $1,9 \cdot 10^4$ |
| | Торф | $5,0 \cdot 10^7$ | $7,8 \cdot 10^6$ | $6,8 \cdot 10^5$ | $4,8 \cdot 10^5$ | $2,9 \cdot 10^5$ | $2,1 \cdot 10^4$ |
| Д4-1 | Акт. уголь | $4,9 \cdot 10^7$ | $5,9 \cdot 10^6$ | $4,9 \cdot 10^5$ | $3,9 \cdot 10^5$ | $3,0 \cdot 10^4$ | $1,6 \cdot 10^4$ |
| | Тальк | $5,1 \cdot 10^7$ | $6,2 \cdot 10^6$ | $6,0 \cdot 10^5$ | $5,3 \cdot 10^5$ | $3,6 \cdot 10^4$ | $2,8 \cdot 10^4$ |
| | Торф | $5,6 \cdot 10^7$ | $7,0 \cdot 10^6$ | $5,8 \cdot 10^5$ | $5,6 \cdot 10^5$ | $4,7 \cdot 10^4$ | $1,7 \cdot 10^4$ |

По-видимому, этому способствовали не только “мягкие” условия сушки после иммобилизации и, в связи с этим отсутствие стресса, но очевидно имел значение и тот факт, что нахождение бактерий изучаемой группы в иммобилизованном состоянии на дисперсных носителях органической (уголь, торф) и минеральной (тальк) природы в большей степени отвечает естественным условиям среды обитания.

Сохранность культур микроорганизмов в коллекции предполагает не только стабильность жизнеспособности клеток бактерий, но и сохранность характерных свойств. Для исследуемых штаммов целлюлозолитических бактерий таким свойством является наличие стимулирующего действия ростовых процессов для сельскохозяйственных растений. Ранее в лабораторных, вегетационных, полевых опытах была показана эффективность инокуляции бактериями рода *Cytophaga* семян многих сельскохозяйственных растений [7,8].

Результаты оценки сохранности фитостимулирующего действия для изучаемых культур *Cytophaga hutchinsonii* представлены в табл. 3.

Из полученных данных следует, что изучаемые культуры в процессе длительного хранения достоверно ($p < 0,05$) не утратили способность стимулировать ростовые процессы растений, оцениваемые по приведенным показателям.

Сравнение сохранности фитостимулирующей активности при двух способах хранения показывает некоторые преимущества при хранении культур в иммобилизованном состоянии, однако эти различия были незначительны и статистически не доказаны.

Таблица 3

Сохранение фитостимулирующей активности штаммов *Cytophaga hutchinsonii* после лиофилизации (1) и иммобилизации на активированном угле (2)

| Показатели ростовой активности | Контроль | Вари- ант хра- нения | Инокулируемые штаммы | | | | |
|--------------------------------------|-----------|-------------------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | | Т6-9 | Т-11 | Т-1 | А6-3 | Д4-1 |
| Пшеница сорта «Федоровка» | | | | | | | |
| Энергия пророста- ния, % | 69,4±1,5 | 1 | 73,9±1,6 | 74,2±1,2 | 73,1±1,6 | 72,3±1,70 | 71,3±1,6 |
| | | 2 | 75,8±1,5 | 74,9±1,8 | 73,8±2,1 | 72,9±1,50 | 71,8±1,6 |
| Высота проростка, см | 3,22±0,44 | 1 | 5,03±0,29 | 4,88±0,54 | 4,93±0,41 | 4,78±0,51 | 4,51±0,52 |
| | | 2 | 5,07±0,31 | 4,96±0,53 | 4,87±0,58 | 4,73±0,51 | 4,65±0,53 |
| Длина корня, см | 3,55±0,36 | 1 | 6,32±0,54 | 5,92±0,61 | 6,04±0,59 | 5,25±0,60 | 5,68±0,62 |
| | | 2 | 6,58±0,32 | 5,98±0,61 | 5,64±0,53 | 5,74±0,60 | 5,35±0,61 |
| Масса 1 проростка, г | 0,13±0,01 | 1 | 0,17±0,02 | 0,17±0,01 | 0,17±0,01 | 0,18±0,02 | 0,17±0,02 |
| | | 2 | 0,17±0,02 | 0,18±0,02 | 0,18±0,02 | 0,18±0,02 | 0,19±0,02 |
| Кукуруза сорта «ОДМА» | | | | | | | |
| Энергия пророста- ния, % | 68,5±1,4 | 1 | 82,1±1,9 | 81,4±1,9 | 83,2±1,7 | 72,4±1,6 | 74,3±1,7 |
| | | 2 | 84,3±1,8 | 85,6±1,8 | 83,4±1,7 | 74,5±1,6 | 72,9±1,7 |
| Высота проростка, см | 2,1±0,18 | 1 | 2,37±0,2 | 2,36±0,18 | 2,25±0,17 | 2,18±0,24 | 2,21±0,32 |
| | | 2 | 2,63±0,31 | 2,60±0,30 | 2,51±0,31 | 2,41±0,30 | 2,38±0,19 |
| Длина корня, см | 4,36±0,43 | 1 | 7,16±0,59 | 7,24±0,64 | 6,95±0,62 | 6,85±0,71 | 6,72±0,70 |
| | | 2 | 7,38±0,61 | 7,45±0,60 | 6,96±0,71 | 6,86±0,70 | 6,91±0,71 |
| Масса 1 проростка, г | 0,65±0,07 | 1 | 0,71±0,07 | 0,71±0,07 | 0,71±0,07 | 0,78±0,08 | 0,58±0,60 |
| | | 2 | 0,78±0,08 | 0,77±0,08 | 0,76±0,08 | 0,69±0,73 | 0,65±0,07 |
| Огурец сорта «Конкурент» | | | | | | | |
| Энергия пророста- ния, % | 71,4±1,5 | 1 | 78,5±1,8 | 79,8±1,8 | 77,3±1,6 | 75,4±1,7 | 76,3±1,5 |
| | | 2 | 80,4±1,4 | 82,1±1,7 | 79,6±2,1 | 72,6±1,9 | 73,8±2,1 |
| Высота проростка, см | 4,13±0,35 | 1 | 5,69±0,60 | 5,71±0,51 | 5,64±0,49 | 5,42±0,48 | 5,27±0,48 |
| | | 2 | 5,88±0,49 | 5,78±0,54 | 5,72±0,53 | 5,54±0,61 | 5,35±0,63 |
| Длина корня, см | 4,20±0,38 | 1 | 5,72±0,51 | 5,92±0,61 | 5,85±0,62 | 5,64±0,60 | 5,41±0,55 |
| | | 2 | 5,95±0,48 | 5,74±0,51 | 5,97±0,57 | 5,48±0,51 | 5,62±0,03 |
| Масса 1 проростка, г | 0,15±0,02 | 1 | 0,20±0,02 | 0,20±0,02 | 0,22±0,03 | 0,21±0,02 | 0,19±0,02 |
| | | 2 | 0,21±0,03 | 0,20±0,02 | 0,22±0,02 | 0,21±0,02 | 0,19±0,02 |

Таким образом, проведенные исследования показали, что целлюлозоли- тические бактерии *Cytophaga hutchinsonii* в лиофилизированном состоя- нии сохраняют жизнеспособность при хранении на уровне 10^5 - 10^6 кл/мл не более одного года. Иммобилизация культур клеток изучаемых штаммов бактерий на твердофазных носителях обеспечивает сохранность жизнеспо- собности клеток после девяти лет хранения на уровне 10^4 — 10^6 кл/г носи- теля, не требует после хранения дополнительных пересевов культур для приведения их в физиологически активное состояние, а также применения специального оборудования, что делает этот способ хранения удобным и

весьма перспективним. Не наблюдается корреляции между способом хранения бактерий *Cytophaga hutchinsonii* и поддержанием фитостимулирующей активности: независимо от способа хранения, фитостимулирующая активность штаммов в отношении сельскохозяйственных растений была сохранной.

Литература

1. Куплетская М. Б., Аркадьева З. А. О хранении лиофилизированных культур сапрофитных микроорганизмов // Микробиология. — 1980. — Т. XLIX, Вып. 4. — С. 621- 623.
2. Кондратенко В. М., Колтукова Л. В. Вибір умов одержання ліофілізованих зразків штамів дріжджів та лептоспир // Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології. — 2000. — № 7, Вып. 4. — С. 621- 623.
3. Сидякина Т. М. Консервация микроорганизмов // Сер. Консервация генетических ресурсов. — Пущино: ОНТИ НИЦБИ АН СССР, 1988. — 59 с.
4. Доспехов В. А. Методика полевого опыта. — М.: Колос, 1979. — 186 с.
5. Луста К. А., Горкина Н. Б. Имобилизация мицелиальных грибов, продуцирующих полисахариды, в криополиамидном геле // Прикл.биохимия и микробиология. — 1990. — Т. 26, № 4. — С. 705 — 708.
6. Сагдиева М. Г., Куканова С. И. Хранение золоторстворяющих бактерий на твердых субстратах // Микробиология. — 1992. — Т. 61, Вып. 4. — С. 705 — 708.
7. Кривицька Т. Н., Паузер Е. Б. Микроорганизмы ризосферы некоторых сельскохозяйственных культур при инокуляции штаммом *Cytophaga hutchinsonii* Т6-9 // Вісник аграрної науки південного регіону. — 2000. — № 1. — С. 71 — 77.
8. Кривицька Т. Н., Бурыкина С. И., Клименко А. Н. Вплив бактерій роду *Cytophaga* на мікробіологічні процеси у ризосфері озимої пшениці, кукурудзи та соняшника // Збірник наукових праць Уманського державного аграрного університету. — 2003. — С. 211 — 217.

Т. Н. Кривицька, В. О. Іваниця

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра мікробіології і вірусології,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна

ЗБЕРІГАННЯ КОЛЕКЦІЙНИХ ШТАМІВ *CYTOPHAGA HUTCHINSONII* З НАЯВНІСТЮ ФІТОСТІМУЛЮЮЧІЙ АКТИВНОСТІ

Резюме

Дана оцінка життєздатності та фітостимулюючої активності п'яти штамів *Cytophaga hutchinsonii* при зберіганні їх у ліофілізованом та імобілізованом стані на твердофазних носіях.

Ключові слова: бактерії, колекція, зберігання, ліофілізація, імобілізація, носії.

T. N. Krivitskaya, V. A. Ivanitsa

Odessa National Mechnikov University,
Department of microbiologic and virology,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine

THE STORAGE OF *CYTOPHAGA HUTCHINSONII* COLLECTION STRAINS WITH PHYTOSTIMULATIVE ACTIVITY

Summary

The evaluation of viability and phytostimulant activity of five *Cytophaga hutchinsonii* strains is given at a storage them in lyophilized and immobilized state on solid-phase carriers.

Key words: bacteria, collection, the storage, liophilization, immobilization, carriers.