

УДК 576.8

**МЕТОДЫ ХРАНЕНИЙ ДРОЖЖЕВЫХ КУЛЬТУР В КОЛЛЕКЦИИ  
(ОБЗОР)****Х.Г.ГАНБАРОВ, С.М.АБДУЛГАМИДОВА**  
*Бакинский Государственный Университет*  
*khuda.49@mail.ru*

*В обзоре рассмотрены разные методы хранения дрожжевых культур. В данной работе представлены результаты длительного хранения дрожжей в коллекции культур разных стран с применением различных методов и перспективы создания коллекции микроорганизмов на кафедре микробиологии Бакинского Государственного Университета. Приведены примеры, описанные в доступной литературе, а также представлены собственные результаты по хранению и восстановлению измененных свойств дрожжей рода *Candida*. Сделан вывод о важности сохранения жизнеспособности и поиск путей восстановления физиологического состояния культуры.*

**Ключевые слова:** коллекции культур микроорганизмов, дрожжевые культуры, жизнеспособность

Как известно, начало выделения дрожжей и собирание их в коллекции относится к концу прошлого столетия. Многие изолированные в то время расы находят применение и теперь при получении спирта, изготовлении пива и вина, в производстве молочнокислых продуктов, ферментных препаратов и т.д. Коллекции чистых культур дрожжевых микроорганизмов постоянно пополняются вновь выделенными формами из природных и производственных условий. Таким образом, при длительном поддержании в коллекции чистых культур микроорганизмов и, в частности, дрожжей важно уметь сохранять присуще им свойства. Однако способы хранения микроорганизмов в коллекции далеко еще не совершенны. На это указывают частые случаи изменчивости и вырождения дрожжей, грибов и бактерий при их длительном культивировании в искусственных лабораторных условиях в изолированном виде (14,26). Из вышесказанного очевидно, что изучение условий правильного ведения коллекции живых культур микроорганизмов имеет большое научное и практическое значение.

Из-за различий биологических свойств видов невозможно использовать с равноценными положительными результатами один общий способ хранения для разных культур дрожжей. Большой опыт по хранению культур микроорганизмов в том числе и дрожжей, накоплен сотрудниками крупных национальных коллекций, в которых имеется возможность проверять и оценивать разные методы хранения применительно к широкому набору дрожжевых организмов (3,30). В последние десятилетия получили распространение три метода хранения микроорганизмов культур - это поддержание культур путем их периодических пересевов, под минеральным маслом и лиофильная сушка. Другие, менее широко используемые или недавно разработанные методы – это криогенное хранение, хранение на адсорбентах, хранение в виде спор, хранение в дистиллированной воде или физиологическом растворе, рекомендуется лишь для проверки с обязательным дублированием культур, которые поддерживаются обычными способами (11, 14, 26).

Целью настоящей работы явился анализ методов хранения коллекционных культур.

#### **Метод периодических пересев**

Метод периодического посева являются краткосрочными методами. Сроки пересевов определяют для большинства культур дрожжей скоростью высыхания среды. Она зависит от температуры и влажности помещения, где хранят культуры. В голландской коллекции (CBS – *Syntraalbureau voor Schimmecultures*, Нидерланды), насчитывающей более 6000 штаммов дрожжей, культуры хранят в специально предназначенной для этих целей, постоянно проветриваемой комнате, где температура поддерживается зимой 18<sup>0</sup>С, а летом 20<sup>0</sup> (32). Частота пересевов при этих условиях – каждые 5-7 месяцев или 5 раз в два года. Промежутки между посевами увеличивают за счет более плотного закупоривания пробирок с культурами (вазелиновым маслом, парафином) и снижением температуры хранения. Психрофильные дрожжи выращиваются и хранятся при 3-4<sup>0</sup>С в холодильнике. Это представители родов *Candida* и *Leucosporidium*. При низкой температуре хранятся почти все виды дрожжей, за исключением психрофобных видов (27).

На основании наших исследований было показано, что морфокультуральные свойства дрожжевых грибов рода *Candida* при хранении периодическим посевом при температуре 4-6<sup>0</sup>С подвергаются спонтанным изменениям, в результате возникают новые формы с отличительными признаками. В процессе хранения на сусло-агаре в течение 3 месяцев дрожжевые грибы сохраняли жизнеспособность и у большинства из них степень выживаемости оказалась высокая по сравнению с контрольным, за исключением *S.pelliculosa* КТ55, который сохранил свою жизнеспособность в исходном состоянии. После 6 месяцев хранения

дрожжевые грибы росли плохо и тем самым у всех штаммов степень выживаемости понизился (3,10).

Во многих лабораториях и коллекциях дрожжи хранят на сусло-агаре. Было показано, что на этой среде при длительном хранении происходит изменение физиологических свойств, характерных для вида. В связи с этим для хранения более пригодна среда, включающая в своем составе глюкозу и пептон, которую широко используют в голландской коллекции. В некоторых коллекциях дрожжи хранят в жидких средах. Описывая Английскую национальную коллекцию дрожжевых культур, Керсон отмечает, что поддержание их ведется при 0<sup>0</sup>С на жидкой среде, состоящей из экстрактов солода и дрожжей (8,16).

Известно, что добавка силикагеля в среду при хранении способствуют повышению устойчивости дрожжей к физиологическим факторам. Исследования физиологической активности углеводородоокисляющими дрожжевыми культурами *Candida guilliermondii*, *C.tropicalis* и *C.lypoltica* показали, что силикагель содержащей микроэлементы, как кобальт, железо, ванадий, марганец, цинк в состоянии геля представляет более благоприятную среду для микроорганизмов, чем чистый силикагель. Так, интенсивность дыхания дрожжей после года хранения в силикагеле с повышенным содержанием железа остается на достаточно высоком уровне (18).

#### **Хранение под минеральным маслом**

Опыт многих коллекций свидетельствует об успешных результатах этого способа хранения дрожжевых культур. Для винных дрожжей, в частности, было показано, при хранении под вазелиновым маслом с пересевами даже через 2-4 года они не теряют бродильных свойств и хорошо выживают. В Американской коллекции типовых культур под маслом сохранялось 1244 штамма дрожжей, плесневых грибов, стрептомицетов и бактерий. При этом после 12-18 месяцев хранения выжило 96% культур. Такие же результаты были получены в коллекциях микологической лаборатории Лондонского учебного института гигиены и тропической медицины и в коллекции Всесоюзного научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии в Санкт-Петербурге (6,15). Имеются указания на сохранение живых клеток дрожжей под маслом до 10 лет и более без пересевов. Все представители рода *Cryptococcus* лучше сохраняются под вазелиновым маслом на синтетической среде Ридер (19,22).

Рассматривая показатели жизнеспособности культур после хранения 12 месяцев под маслом, наблюдается повышение выживаемости у 9 штаммов дрожжей рода *Candida* (1). Наиболее сильное увеличение показателя жизнеспособности наблюдается у *Candida pseudotropicalis* KH12 и MA88 - в 2,4 и 5,9 раза. У остальных штаммов *Candida kefir* DA13 и BD2, *C.macedoniensis* MI44, *C.pelliculosa* KT55, *C.pseudotropicalis* AK4 и KD19 увеличение показателя жизнеспособности составлял в 1,2; 2,0; 1,7; 1,7;

1,35 и 1,55 раза, соответственно. У 2 штаммов исследуемых культур наблюдается снижение выживаемости, а именно: *Candida pseudotropicalis* AK9 и GA16 - в 2,1 и 1,3 раза, а у одного штамма *C.tropicalis* LK30 показатель жизнеспособности практически не изменился. У штаммов *Candida pseudotropicalis* наблюдалось снижение выживаемости в интервале 1,5-5,0 раза. Однако, несмотря на резкое снижение выживаемости культур по сравнению с культурами после 6 месяцев хранения, показатели у большинства культур *Candida kefir* штаммы DA13 и BD2, *C.macedoniensis* MI44, *C.pseudotropicalis* AK4, KD19, KH12 и MA88 были очень высокими по сравнению с исходной культурой. Только у одного штамма *Candida pelliculosa* KT55 наблюдалось увеличение жизнеспособности после 6 и 12 месяцев хранения в 1,5 и 1,7 раза, соответственно. Отсюда следует, что хранение дрожжей в течение 6 и 12 месяцев под вазелиновым маслом привело к повышению степени выживаемости у большинства штаммов дрожжей по сравнению с исходным (3).

### Лиофилизация

Лиофилизация относится к долгосрочным методам хранения и применяется во всех крупных коллекциях для консервации многих видов бактерий и грибов. Принцип метода заключается в высушивании клеток из замороженного состояния под вакуумом, минуя жидкую фазу. Техника лиофилизации и хранения лиофилизированных культур сильно варьирует в разных лабораториях (13,28).

Дрожжи, подлежащие лиофилизации, выращивают в оптимальных условиях на средах, не слишком обогащенных питательными веществами. Для этой цели пригодна среда Сабуро или глюкозо-пептонная среда. Дрожжи выращивают и на сусло-агаре. Из 2-5-суточных культур готовят густую суспензию в специальных жидкостях, содержащих защитные вещества (17).

Хорошие результаты получены при использовании в качестве защитной среды раствора содержащего 7,5% инозита, 2% глутамата натрия и 5% декстрина, рН такой среды доводят до 7 с помощью NaOH. Использование 10-20% раствора сахарозы дает хорошую выживаемость сразу после лиофилизации, но при длительном хранении жизнеспособность дрожжей резко снижается из-за высокой остаточной влажности материала. Для дрожжей при лиофилизации обычно применяют охлаждение от  $-30^{\circ}\text{C}$  до  $-70^{\circ}\text{C}$ , однако температура около  $-15^{\circ}\text{C}$  способствующая медленному замораживанию, дает наилучшие результаты (21,31).

Запаянные ампулы с лиофилизированными культурами хранят в темноте при комнатной температуре или в холодильнике с температурой  $4-6^{\circ}\text{C}$ (23).

Итого 19-30-летнего хранения культур дрожжей – представителей 17 родов, всего 557 штаммов – в голландской коллекции позволили установить разную пригодность этого метода хранения для отдельных групп

видов Дрожжи с мелкими клетками и аскоспорами, такие, как *Pichia*, *Hansenula* и *Debaryomyces*, показали хорошую выживаемость, а крупноклеточные слабоспорулирующие или неспорулирующие дрожжи рода *Saccaromyces*, *Kluveromyces*, *Dekkera* и *Brettanomyces* выживали хуже. Плохо выдерживали длительное хранение в лиофилизированном состоянии *Sporobolomyces*, *Rhodotorulla* и *Cryptococcus*. Для дрожжей рода *Candida* из группы *solani-lypolytica* было установлено, что через 3 месяца хранения произошли изменения в окислительном метаболизме, в потребностях в факторах роста и осмотолерантности (14).

Таким образом, и этот широко применяющийся сейчас метод хранения микробных культур не следует рассматривать как универсальный, одинаково пригодный для разных видов дрожжей.

### **Криогенное хранение**

В природе при естественной криоконсервации клетки микроорганизмов часто находятся в иммобилизованном состоянии, что позволяет им сохранять высокий уровень выживаемости и метаболической активности. Выявлено прямая зависимость концентраций криопротекторов на выживаемость культур в неблагоприятных условиях. Устойчивость дрожжей к повреждающим эффектам при замораживании повышается при добавлении защитных веществ: глицерина, сахарозы, инозита, диметилсульфоксида, полиэтиленгликола. Так, при изучении влияния условий хранения иммобилизованных клеток дрожжей, мицелиальных грибов, грамотрицательных и грамположительных бактерий на их выживаемость были использованы криогель поливинилового спирта разной концентрации. Криогель поливинилового спирта (ПВС) давно зарекомендовал себя как уникальный полимерный носитель для иммобилизации клеток различных микроорганизмов. Включение клеток в подобную матрицу гарантирует их выживаемость в процессе замораживания и оттаивания (24).

Наиболее выгодно хранить культуры при сверхнизких температурах в контейнерах. Так, в американской коллекции (АТСС) имеются контейнеры на 14000 и 40000 ампул для длительного хранения культур. Трехлетнее хранение пивных дрожжей в жидком азоте показало хорошую их выживаемость без изменения ценных производственных свойств (31).

### **Хранение на адсорбентах**

В качестве адсорбентов используют почву, песок, каолин, силикагель, вату и фильтровальную бумагу. Этот способ хранения не имеет разработанной стандартной техники.

Высокая выживаемость и физиологическая активность обеспечивается при хранении дрожжей в силикагеле, содержащем различные микроэлементы, что было показано на углеводородокисляющих видах дрожжей рода *Candida* (11,18).

### **Хранение культур в виде спор**

В.В.Абрамовичем был разработан метод получения активно спорующих культур дрожжей для длительного хранения их в состоянии спор. Предварительное размножение таких культур он проводил в анаэробных условиях – в виноградном сусле. В условиях производства при сбраживании виноградного сусла на расах дрожжей, хранившихся в спорах, было получено виноградное вино, полностью отвечающее кондициям (4, 5).

Н.И.Бурьян предложила для винных дрожжей способ хранения без потери их основных производственно ценных свойств (энергии размножения и дыхания, бродильной активности, кислотовыносливости, спиртоустойчивости) путем чередования периодов активного размножения и пребывания в состоянии спор (9,16).

### **Хранение в дистиллированной воде и в физиологическом растворе**

Хранение в дистиллированной воде и в физиологическом растворе являются самыми простыми и доступными методами для небольших лабораторий. Микроорганизмы смывают с поверхности скошенной агаризованной среды дистиллированной водой или 0,85%-ым раствором NaCl. Густые суспензии бактерий разливают по 4 мл в стерильные флаконы на 5 мл, закрывают резиновыми пробками и хранятся при комнатной или при 4-6<sup>0</sup>С (11). Жизнеспособность дрожжей сохраняется в этих условиях до двух лет и более. Основным условием успешного хранения дрожжей в дистиллированной воде является обильный инокулюм. Он оказался непригодным для таких слабоспорующих дрожжей, как *Hanseniaspora*, *Endomycopsis*, *Nematospora* и некоторых *Saccharomyces* (5, 14).

Этот способ хранения проверен на ряде культур рода *Candida* на кафедре микробиологии БГУ с положительным результатом при хранении на 1 год. При этом методе происходило образование спонтанных форм с новыми морфо-культуральными признаками, причем выживаемость при 12 месяцев хранения была высокой, что говорит о высокой жизнеспособности культур и повышении энергии размножения, хотя в отношении физиолого-биохимических особенностей наблюдаемые изменения были в сторону ослабления изученных свойств. Дальнейшее хранение культур до 24 месяцев приводило к потере некоторых биохимических признаков (2,3). Следовательно, данный метод хранения пригоден для хранения дрожжей до 1-го года.

При хранении в дистиллированной воде, в результате низкого осмотического давления гипотонического раствора, вода из окружающего раствора диффундируется внутрь клетки, оболочка которой может лопнуть. Однако дистиллированная вода является подходящим условием для хранения некоторых микроорганизмов в коллекции (7,26).

Таким образом, в настоящее время, как показывает приведенная литература, вопросу хранения дрожжевых организмов в коллекциях уделя-

ется большое внимание, изыскиваются лучшие методы в различных направлениях.

### **Заключение**

Методы хранения культур дрожжей можно разделить на две группы. Первая касается поддержания любых дрожжевых организмов в жизнеспособном состоянии с сохранением их морфологических и физиолого-биохимических свойств. Вторая предусматривает хранение производственных рас дрожжей, уже изученных и имеющих определенное направление в технологическом процессе, в активном состоянии с целью повышения физиологических свойств и улучшения особенностей культур в желаемом направлении.

На основании исследований, проведенных на кафедре микробиологии БГУ, было установлено, что для длительного хранения дрожжевых организмов в коллекции наиболее удобный метод хранения под вазелиновым маслом при низкой температуре. При данном методе хранения можно сохранить дрожжевые культуры на длительные сроки без потери изученных признаков, хотя жизнеспособность и диагностические свойства штаммов подвергаются изменениям. Характеризуя наш метод, мы можем отметить, что он при двух крайних пределах отклонений то тому или иному свойству, занимает среднее положение.

Кафедра постоянно пополняется вновь выделенными и описываемыми видами, которые должны помещаться в коллекции и сохраняться в живом состоянии с применением различных методов. Это делает их доступными для научной общественности. Создаваемый нами фонд культур, будет представлять интерес для различных областей микробиологии и биотехнологии.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Абдулгамидова С.М. Хранение коллекционных дрожжевых культур под вазелиновым маслом // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана. Баку: Элм, 2007, т.5, с. 110-117.
2. Абдулгамидова С.М. Хранение дрожжей рода *Candida* в дистиллированной воде // Вестник Бакинского Университета. Серия естественных наук, 2008, №4, с.71-77.
3. Абдулгамидова С.М. Сравнительная эффективность различных методов длительного хранения дрожжей рода *Candida* // Вестник Харьковского Национального Университета, №828. Серия: Биология, 2008, в.8, с.132-136.
4. Абрамович В.В. О длительном хранении культур винных дрожжей // «Виноделие и виноградарство СССР», 1955, №2, с.47-49.
5. Аркадьева З.А. Методы хранения культур микроорганизмов / Метаболизм микроорганизмов. М.: МГУ, 1986, с.57-64.
6. Аркадьева З.А. Коллекция микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ / Материалы международной конференции «Проблемы экологии и физиологии микроорганизмов», к 100-летию со дня рождения профессора Е.Е.Успенского: М., 2000, с. 33-37.
7. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.:КМК, 2004, 222 с.
8. Бочаров С.Н. Изменчивость дрожжей при длительном пребывании в растворе сахарозы // Труды Института Генетики АН СССР. М.: АН СССР, 1985, №22, с.209-217.

9. Бурьян Н.И. Сравнительное изучение различных методов хранения культур винных дрожжей в музее // Труды Всесоюзного научно-исследовательского института виноделия и виноградарства, 1980, т.9, с.53-81.
10. Ганбаров Х.Г., Абдулгамидова С.М. Выживаемость дрожжевых культур при хранении в коллекции на среде сусло-агар // Труды Института Микробиологии НАН Азербайджана. Баку: Элм, 2007, т.4, с.34-39.
11. Герна Р.А. Хранение микроорганизмов / Методы общей бактериологии. М.: Мир, 1983, т.1, с.526-533.
12. Димитрова М., Хрусаков Д., Динков Н. Качественные показатели хлебопекарских дрожжей из хмеля и изменения в микрофлоре при их хранении // Известия вузов Пищевой технологии, 1999, №4, с.16-17.
13. Кантерова А.В., Образцова Н.В., Астапович Н.И. Влияние условий лиофилизации на жизнеспособность и бродильную активность дрожжей *Kluuyveromyces lactis v.lactis* БИМ У-201 / Материалы международной конференции «Микробиология и биотехнология на рубеже 21 столетия»: Минск, 2000, с. 48-50.
14. Красильников Н.А. Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М: Наука, 1976, 200 с.
15. Кудрявцев В.И., Фатеева М.В., Никитина Т.Н. Хранение коллекционных дрожжевых культур под минеральным маслом // Микробиология, 1982, т.41, в.5, с.903-908.
16. Литвинова Е.В., Милешко Л.Ф. Хранение низовых пивоваренных дрожжей при температуре от 5 до 12<sup>0</sup> С // Труды ВНИИ Пивоваренной промышленности, 1983, в.3, с.73-84.
17. Остроухова З.А. Сохранение свойств винных дрожжей методом лиофильной сушки // Микробиология, 1981, т.30, в.2, с.341-345.
18. Папарина О.В., Патрикеев В.В., Лысенко С.В. Исследование выживаемости и физиологической активности некоторых штаммов дрожжей после длительного хранения в силикагеле // Микробиология, 1985, т.41, в.4, с.164-167.
19. Подгорский В.С., Голович Т.Н., Суденко В.И. Особенности хранения микроорганизмов, депонированных в Институте микробиологии и вирусологии НАН Украины / Материалы международной конференции «Микробиология и биотехнология на рубеже 21 столетия»: Минск, 2000, с.74-75.
20. Пумпянская Л.В. Хранение микроорганизмов под минеральным маслом // Микробиология, 1984, т.33, в.6, с.1065-1070.
21. Раппорт А.И., Беккер М.Е. Влияние сахарозы и лактозы на устойчивость дрожжей *Saccharomyces cervisiae* к обезвоживанию // Микробиология, 1983, т.52, в.5, с.719-772.
22. Фатеева М.В. Определение степени выживаемости дрожжевых организмов после хранения под вазелиновым маслом // Микробиология 1985, т.36, в.2, с.350-354.
23. Фатеева М.В., Никитина Т.Н., Шерман Ф.Б. Выживаемость и диагностические свойства дрожжей после лиофилизации и хранения // Известия АН СССР, серия биологических наук, 1986, №4, с.611-617.
24. Федоров Ф.Ю., Волченко Е.В., Сингирцев Е.Е. и др. Хранение штаммов промышленных микроорганизмов, включенных в полимерные матрицы // Прикладная биохимия и микробиология, 2000, т.36, №1, с.59-67.
25. Школьный А.Г. Выживаемость некоторых видов черных дрожжеподобных грибов при воздействии УФ-лучей // Микробиологический журнал НАН Украины, 2003, т.65, №3, с.60-69.
26. Canovas M., Iborra J. Culture collections and biochemistry // International Microbiology, 2003, v.6, №2, p.105-112.
27. Davenport R.R. An introduction to yeasts and yeast like organisms. In.: Biology and activities of yeasts, Acad. Press, 1998, p. 1-27.
28. Kitamoto Y., Suzuki A., Shimada S., Yamanaka K. A new method for preservation of fungus stock cultures by deep-freezing // Mycoscience, 2002, v.43, p.143-149.



29. Laroche C., Gervais P. Achievement of rapid osmotic dehydration at specific temperatures could maintain high *Saccharomyces cerevisiae* viability // *App. Microbiol. and Biotech.*, 2003, v.60, №6, p.743-747.
30. Monsalud R.G., Magbanua F.O., Parungao M.P. et al. The Philippine national collection of microorganisms (PNCM): Repository of microbial diversity of the country // *J.Ocean Iniv. Qingdao*: 2002, №1, p.101-104.
31. Morgan C.A, Herman N.F, White P.A., Vesey G.I Preservation of microorganisms by drying; A review // *J.of Microbiological Methods*, 2006, v.166, Is.2, p.183-193.
32. Smith D. Culture collections over the world // *International Microbiology*, 2003, v.6, №2, p.95-100.

## **MAYA GÖBƏLƏKLƏRİNİN KOLLEKSİYADA SAXLANMA METODLARI**

**X.Q.QƏNBƏROV, S.M.ƏBDÜLHƏMİDOVA**

### **XÜLASƏ**

Məqalə maya göbələklərinin kolleksiyada saxlanması müxtəlif üsulları nəzərdən keçirilmişdir. Maya göbələklərinin müxtəlif ölkələrdə uzunmüddətli kolleksiyada saxlanması nəticələri və Bakı Dövlət Universitetinin mikrobiologiya kafedrasında yaradılmış kolleksiyasının perspektivləri göstərilmişdir. Verilmiş nümunələr məlum ədəbiyyatda öz əksini tapmışdır və həmçinin *Candida* cinsli maya göbələklərinin saxlanması ilə bağlı nəticələrimiz göstərilmişdir. Kulturaların həyatqabiliyyətinin saxlanması və fizioloji vəziyyətinin bərpa yollarının axtarılarının vacibliyi vurğulanmışdır.

**Açar sözlər:** mikroorqanizmlərin kulturalar kolleksiyası, maya göbələyi kulturaları, həyatqabiliyyəti

## **THE METHOD OF STORAGE OF YEAST CULTURES IN THE COLLECTION**

**Kh.G.GANBAROV, S.M.ABDULHAMIDOVA**

### **SUMMARY**

This review covers the different methods of storing yeast cultures. This paper presents the results of long-term storage of yeast in culture collections in different countries using different methods and perspectives to create a collection of microorganisms at the Department of Microbiology of Baku State University. The paper presents examples described in the available literature, and presents the results of their own results to store and restore the altered properties of the yeast genus *Candida*. There has been drawn a conclusion about the importance of preserving the viability and seeking recovery of the physiological state of the culture.

**Key words:** culture collection of microorganisms, collection of yeasts, vitality

*Поступило в редакцию: 14.06.2013 г.*

*Подписано к печати: 02.07.2013 г.*