

## ... ФІЗИОЛОГІЯ РОСЛИН ...

УДК: 576.8

### Сравнительная эффективность различных методов длительного хранения дрожжей рода *Candida*

С.М.Абдулгамидова

Бакинский государственный университет (Баку, Азербайджан)  
abdulqamidova@rambler.ru

Изучали сравнительную эффективность хранения под вазелиновым маслом, в дистиллированной воде, а также при периодических пересевах 11 штаммов дрожжевых грибов из коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии Бакинского государственного университета. Результаты показали, что наиболее высокий уровень жизнеспособности, бродильной активности и способность сбраживать лактозу у исследованных штаммов сохраняется при длительном (6–12 месяцев) хранении под вазелиновым маслом. Для каждого исследованного штамма установлены оптимальные условия и способ хранения с целью обеспечения поддержания их жизнеспособности на достаточно высоком уровне при длительном хранении.

Ключевые слова: *дрожжи, (Candida), хранение, штаммы.*

#### Введение

Проблема сохранения микроорганизмов, а также грибов в коллекциях чистых культур разных стран, в том числе Азербайджана, приобрела в последнее время большое значение в связи с Международной конвенцией о сохранении биологического разнообразия. Интерес к этим организмам поддерживается постоянно на довольно высоком уровне со стороны специалистов самого широкого профиля от микологов-специалистов до биотехнологов и медицинских микологов.

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 физиолого-биохимических 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. Известны многие способы хранения культур микроорганизмов: при периодических пересевах, в 25%-ном растворе глицерина при  $-20^{\circ}\text{C}$ , под вазелиновым маслом на агаризованной среде и в лиофилизированном состоянии. Ни один из известных способов хранения не является универсальным (Куплетская, Аркадьева, 1997; Стоянова, Аркадьева, 2000; Fernandez-Segovia et al., 2007).

В наших предыдущих работах изучена выживаемость дрожжевых грибов, дана их микробиологическая характеристика и описаны физиолого-биохимические свойства после хранения на твердой питательной среде в течение 3 и 6 месяцев, также под вазелиновым маслом в течение 6 и 12 месяцев (Абдулгамидова, Ганбаров, 2007; Абдулгамидова, 2007).

Задача данной работы состояла в изучении стабильности некоторых важных физиологических свойств: жизнеспособности клеток, бродильной и лактозосбраживающей активности некоторых штаммов дрожжей при различных методах хранения.

#### Материал и методы

Объектами исследований служили 11 штаммов дрожжей, выделенные из простокваш различных районов Азербайджана и хранившиеся в коллекции культур кафедры микробиологии Бакинского государственного университета: *Candida pseudotropicalis* штаммы AK9, AK4, MA88, GA16, KD19 и KH12, *Candida kefir* штаммы DA13 и BD2, *Candida macedoniensis* штамм MI44, *Candida tropicalis* штамм LK30 и *Candida pelliculosa* штамм KT55.

##### Хранение способом периодических пересевов на питательные среды

Культуры хранились в течение 3 и 6 месяцев на агаризованной среде – солодовом сусле ( $7^{\circ}$  Баллинг) при температуре  $4-6^{\circ}\text{C}$ .

##### Хранение под вазелиновым маслом

Микроорганизмы выращивали на соответствующей агаризованной среде – сусло-агар в течение 2 суток. Предварительно стерилизовали медицинское вазелиновое масло в автоклаве 2 раза при 1

атм. 1 ч. Затем его подогревали при 150°C в сушильном шкафу для удаления воды. Выросшие культуры заливали вазелиновым маслом слоем 1,5–2 см и хранили в течение 6 и 12 месяцев при температуре 4–6°C.

#### Хранение в дистиллированной воде

Микроорганизмы смывали с поверхности скошенной питательной среды дистиллированной водой. Взвесь разливали по 3 мл в стерильные флаконы на 5 мл, закрывали резиновыми пробками и хранили 1 год при 4–6°C.

В качестве контрольного варианта брали эти же дрожжевые культуры, хранившиеся на сусло-агаре при температуре 4–6°C в течение 1 месяца.

Для определения жизнеспособности культур использовали простой и быстрый способ определения живых и мертвых клеток (Бабьева, Голубева, 1979). Подсчет общего количества клеток дрожжевых грибов под микроскопом проводили с помощью камеры Горяева с параллельным рассеивом на чашки Петри, содержащие среду сусло-агар. Подсчет выросших колоний проводили через 3 суток выращивания при температуре 28°C. Его проводили по формуле Луста для определения показателя жизнеспособности – ПЖ (Луста, Фихте, 1990):

$$\text{ПЖ} = \frac{x \cdot c \cdot R \cdot S \cdot T}{10 \cdot M}$$

где:

ПЖ – показатель жизнеспособности;

M – среднее арифметическое значение количества клеток в камере Горяева;

x – среднее арифметическое значение количества колоний в чашках Петри;

c – количество капель в 1 мл суспензии;

R – кратность разведений;

S – площадь квадрата счетной камеры Горяева: большой квадрат – 1/400, малый квадрат – 1/2500;

T – толщина слоя суспензии в камере Горяева – 0,1 мм.

Способность дрожжей сбраживать углеводы (лактозу) наблюдали в трубках Дунбара. С этой целью исследуемый сахар в концентрации 2% растворяли в 0,5%-ном растворе дрожжевого экстракта. О сбраживании свидетельствовало наличие газа в закрытом колене трубки (Бабьева, Голубева, 1979). Как показатель бродильной активности дрожжей (способности к накоплению органических кислот) определяли общую титруемую кислотность при росте их в жидкой среде – сусле, источником углерода была глюкоза. Общую титруемую кислотность выражали в градусах Тернера, как количество мл 0,1 N NaOH, необходимое для нейтрализации образовавшейся в процессе роста кислоты (Егоров, 1995).

Все опыты ставили в 4-х повторностях и статистически обрабатывали (Лакин, 1990).

#### **Результаты и обсуждение**

Одним из основных показателей, отражающих способность микроорганизмов к восстановлению, является выживаемость культур.

В табл. 1 представлены результаты изучения выживаемости дрожжевых организмов при хранении тремя методами. В процессе хранения на сусло-агаре в течение 3 месяцев дрожжевые грибы сохраняли жизнеспособность, и у большинства из них степень выживаемости оказалась высокой, по сравнению с контрольной, за исключением *C. pelliculosa* КТ55, который сохранил свою жизнеспособность в исходном состоянии. После 6 месяцев хранения дрожжевые грибы росли плохо, и у всех штаммов степень выживаемости понизилась.

Хранение коллекционных культур в течение 6 месяцев под вазелиновым маслом привело к повышению степени выживаемости у большинства штаммов дрожжей по сравнению с контролем. После 12 месяцев хранения у 2 штаммов (*C. pseudotropicalis* штаммы АК9 и GA16) наблюдается понижение степени выживаемости.

В процессе хранения дрожжевых культур в дистиллированной воде в течение 12 месяцев наблюдается повышение жизнеспособности у 8 штаммов, а степень выживаемости у 3 штаммов (*C. pseudotropicalis* АК9 и GA16, *C. kefir* BD2) понизилась. После 24 месяцев хранения у всех исследуемых культур выживаемость понизилась в большой степени.

Проводя сравнительный анализ жизнеспособности после хранения тремя методами, можно выделить 2 метода хранения, которые способствуют не только сохранению, но и повышению жизнеспособности культур на определенный срок, – хранение под вазелиновым маслом и в дистиллированной воде. Однако последний метод не является практичным, так как способствует быстрой гибели дрожжевых клеток в процессе плазмолиза.

Таблица 1.

Показатель жизнеспособности дрожжей при разных способах длительного хранения в коллекции,  $M \pm m$

Штамм	Контроль	Способы хранения культур в коллекции					
		периодический пересев		под вазелиновым маслом		в дистиллированной воде	
		3 месяца	6 месяцев	6 месяцев	12 месяцев	12 месяцев	24 месяца
<i>Candida kefir</i>							
DA 13	0,18±0,01	0,10±0,05	0,05±0,003	0,53±0,05	0,21±0,02	0,38±0,01	0,05±0,002
BD 2	0,20±0,01	0,47±0,03	0,004±0,001	1,54±0,05	0,39±0,001	0,18±0,01	0,003±0,0001
<i>Candida macedoniensis</i>							
M 144	0,13±0,02	0,59±0,02	0,002±0,001	1,29±0,06	0,50±0,02	0,42±0,02	0,02±0,01
<i>Candida pelliculosa</i>							
KT 55	0,30±0,02	0,30±0,01	0,07±0,001	0,45±0,02	0,51±0,02	0,72±0,03	0,003±0,0001
<i>Candida pseudotropicalis</i>							
AK 9	0,45±0,02	0,45±0,03	0,01±0,001	0,62±0,03	0,21±0,02	0,17±0,02	0,004±0,0001
AK 4	0,20±0,005	0,54±0,04	0,02±0,001	0,69±0,02	0,27±0,01	0,35±0,01	0,003±0,0001
MA 88	0,13±0,002	0,90±0,05	0,013±0,005	1,72±0,05	0,77±0,03	0,37±0,03	0,008±0,0002
GA 16	0,48±0,03	1,16±0,06	0,004±0,002	0,60±0,01	0,38±0,01	0,39±0,01	0,03±0,001
KD 19	0,29±0,01	1,19±0,04	0,002±0,001	2,24±0,04	0,45±0,02	0,40±0,02	0,005±0,0001
KH 12	0,17±0,005	0,22±0,01	0,05±0,002	0,60±0,02	0,41±0,02	0,42±0,01	0,002±0,0001
<i>Candida tropicalis</i>							
LK 30	0,27±0,003	0,34±0,02	0,01±0,0005	0,38±0,01	0,28±0,01	0,45±0,02	0,03±0,001

Из полученных результатов следует, что для сохранения исследуемых культур в жизнеспособном состоянии на более длительные сроки наиболее эффективен метод хранения под вазелиновым маслом. Вместе с тем, некоторые штаммы дрожжей, такие как *C. pseudotropicalis* AK4, GA16 и KH12, *C. kefir* DA13, *C. tropicalis* LK30 и *C. pelliculosa* KT55, можно хранить и в дистиллированной воде.

По способности сбраживать лактозу исследуемые культуры сгруппировали на лактозосбраживающие и лактозоснебраживающие дрожжевые организмы (табл. 2). К первой группе относятся штаммы: *C. pseudotropicalis* AK9, AK4, MA88, GA16, KD19 и KH12, *C. kefir* BD2 и DJ13. Ко второй группе относятся штаммы: *C. macedoniensis* M144, *C. tropicalis* LK30 и *C. pelliculosa* KT55.

Таблица 2.

Сбраживание лактозы дрожжами при разных способах длительного хранения в коллекции \*

Штамм	Контроль	Способы хранения культур в коллекции					
		периодический пересев		под вазелиновым маслом		в дистиллированной воде	
		3 месяца	6 месяцев	6 месяцев	12 месяцев	12 месяцев	24 месяца
<i>Candida kefir</i>							
DA 13	++	+	-	++	+	+	-
BD 2	++	+	-	++	+	+	-
<i>Candida macedoniensis</i>							
M 144	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida pelliculosa</i>							
KT 55	-	-	-	-	-	-	-
<i>Candida pseudotropicalis</i>							
AK 9	++	+	-	++	+	+	-
AK 4	++	+	-	++	+	+	-
MA 88	++	+	+	++	+	+	-
GA 16	++	+	-	++	+	+	-
KD 19	++	+	-	++	+	+	-
KH 12	++	+	-	++	+	+	-
<i>Candida tropicalis</i>							
LK 30	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: «++» – сильная степень сбраживания, «+» – слабая, «-» – сбраживание отсутствует.

При периодических перeseвах через 3 и 6 месяцев на свежую питательную среду лактозосбраживающая активность у исследуемых культур ослабевает и вовсе исчезает, за

исключением *C. pseudotropicalis* штамм MA88. Хранение же под вазелиновым маслом способствует сохранению лактозосбраживающей активности у всех дрожжевых грибов, но в слабой форме.

Хранение в дистиллированной воде приводит к ослаблению лактозосбраживающей способности у всех дрожжевых грибов после 12 месяцев, а после 24 месяцев хранения эта способность у всех исследованных штаммов полностью утрачивается.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что хранение под вазелиновым маслом и в дистиллированной воде способствует сохранению лактозосбраживающей активности у дрожжевых организмов на срок не более 12 месяцев.

Полученные нами результаты исследования дрожжевых грибов, хранившихся тремя методами, совпадают с литературными данными, в которых дается сравнительная характеристика разных способов хранения и установлены оптимальные условия и сроки хранения различных микроорганизмов (Стоянова, Аркадьева 2000; Fernandez-Segovia et al., 2007).

Что же касается бродильной активности исследуемых культур, то известно, что при изменении способа хранения или при длительном культивировании штаммов дрожжевых грибов в коллекции культур в среде накапливается различное количество летучих кислот, что отражается на значениях титруемой кислотности.

Результаты проведенного нами изучения бродильной активности исследованных штаммов приведены в табл. 3. Из данных таблицы видно, что при первом способе хранения показатели титруемой кислотности дрожжевых грибов постепенно уменьшаются по мере увеличения сроков хранения у большинства исследованных штаммов, хотя у двух из них – *C. pseudotropicalis* АК4 и КН19 они изменяются незначительно.

Таблица 3.

**Бродильная активность дрожжей при разных способах длительного хранения в коллекции, градусы Тернера, М±m**

Штамм	Контроль	Способы хранения культур в коллекции					
		периодический пересев		под вазелиновым маслом		в дистиллированной воде	
		3 месяца	6 месяцев	6 месяцев	12 месяцев	12 месяцев	24 месяца
<i>Candida kefir</i>							
DA 13	0,50±0,02	0,22±0,01	0,12±0,03	1,20±0,01	0,80±0,04	0,03±0,001	0,02±0,001
BD 2	1,40±0,04	0,69±0,03	0,22±0,01	2,00±0,03	0,40±0,01	0,02±0,001	0,20±0,001
<i>Candida macedoniensis</i>							
M 144	1,00±0,01	0,29±0,01	0,22±0,02	1,70±0,01	0,30±0,01	0,07±0,001	0,02±0,001
<i>Candida pelliculosa</i>							
KT 55	0,50±0,02	0,37 0,01	0,20±0,01	1,40±0,01	0,60±0,01	0,02±0,002	0,20±0,001
<i>Candida pseudotropicalis</i>							
AK 9	0,70±0,03	0,46±0,03	0,14±0,02	0,90±0,03	0,60±0,03	0,03±0,001	0,02±0,01
AK 4	0,10±0,01	0,35±0,02	0,21±0,01	1,50±0,05	0,05±0,02	0,60±0,03	0,50±0,03
MA 88	0,90±0,05	0,35±0,02	0,22±0,01	1,20±0,05	0,40±0,01	0,10±0,02	0,02±0,001
GA 16	0,60±0,02	0,55±0,03	0,24±0,02	1,00±0,02	0,30±0,01	0,04±0,001	0,20±0,002
KD 19	0,10±0,01	0,82±0,04	0,20±0,01	1,80±0,01	0,32±0,02	0,02±0,002	0,02±0,001
KN 12	0,70±0,03	0,36±0,02	1,60±0,03	0,90±0,03	0,40±0,03	0,04±0,001	0,02±0,001
<i>Candida tropicalis</i>							
LK 30	0,60±0,02	0,55±0,03	0,22±0,01	0,60±0,01	0,10±0,01	0,03±0,002	0,20±0,001

Хранение исследуемых культур под вазелиновым маслом способствует увеличению титруемой кислотности после 6 месяцев. После 12 месяцев значение этого показателя уменьшается у большинства штаммов, за исключением трех – *C. pseudotropicalis* АК4, КН19 и *C. pelliculosa* КТ55. Титруемая кислотность дрожжевых грибов, хранившихся в дистиллированной воде в течение 12 месяцев, резко понизилась по сравнению с контролем, а после 24 месяцев хранения бродильная активность у большинства исследованных штаммов дрожжей фактически полностью утрачивается.

На основании исследований, проведенных на кафедре микробиологии Бакинского государственного университета, было установлено, что для длительного хранения большого числа молочнокислых дрожжевых организмов в коллекции наиболее удобен метод хранения под вазелиновым маслом, что совпадает с литературными данными (Куплетская, Аркадьева, 1997; Стоянова, Аркадьева, 2000; Fernandez-Segovia et al., 2007).

Полученные нами результаты позволяют считать, что среди трех изученных методов хранения промышленно-важных дрожжевых культур существенное преимущество принадлежит методу хранения под вазелиновым маслом. Используя этот метод, можно сохранить дрожжевые культуры в

течение длительных сроков без существенной потери изученных признаков, хотя жизнеспособность и диагностические свойства штаммов подвергаются изменениям.

#### Список литературы

- Абдулгамидова С.М. Хранение коллекционных дрожжевых культур под вазелиновым маслом // Труды Института микробиологии НАН Азербайджана. – Баку, 2007. – Т.5. – С. 41–44.
- Абдулгамидова С.М., Ганбаров Х.Г. Выживаемость дрожжевых культур при хранении в коллекции на среде сусло-агар // Сборник научных трудов Института микробиологии НАН Азербайджана. – Баку, 2007. – Т.4. – С. 34–39.
- Бабьева И.В., Голубева В.И. Методы выделения и идентификации дрожжей. – М., 1979. – С.120.
- Егоров Н.С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. – М.: Изд. МГУ, 1995. – 301с.
- Куплетская М.Б., Аркадьева З.А. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ // Микробиология. – 1997. – Т.66, №2. – С. 283–288.
- Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 300с.
- Луста К.А., Фихте Б.А. Методы определения жизнеспособности микроорганизмов / Ред. В.К.Ерошин. – Пущино: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1990. – С.186.
- Стоянова Л.Г., Аркадьева З.А. Сравнения способов хранения молочнокислых бактерий // Микробиология. – 2000. – Т.69, №1. – С. 98–104.
- Fernández-Segovia I., Escriche I., Fuentes A., Serra J.A. Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods // International Journal of Food Microbiology. – 2007. – Vol.116, Issue 1. – P. 64–72.

#### Порівняльна ефективність різних методів тривалого зберігання дріжджів роду *Candida* С.М.Абдулгамідова

Вивчали порівняльну ефективність зберігання під вазеліновим маслом, у дистильованій воді, а також при періодичному пересіванні 11 штамів дріжджових грибів з колекції культур мікроорганізмів Бакинського державного університету. Результати показали, що найбільш високий рівень життєздатності, бродильної активності та здатність зброджувати лактозу у досліджених штамів зберігається при тривалому зберіганні (6–12 місяців) під вазеліновим маслом. Для кожного досліджуваного штаму визначені оптимальні умови і спосіб зберігання з метою підтримання їх життєздатності на достатньо високому рівні при тривалому зберіганні.

Ключові слова: *дріжджі (Candida), зберігання, штами.*

#### Comparative efficacy of different methods of the genus *Candida* yeast long-term storage S.M.Abdulgamidova

We studied comparative efficacy of 11 yeast strains (Microbe Culture Collection of Microbiology Department of Baku State University) storage under mineral oil, in distilled water and by means of constant passages. Obtained results showed that the investigated strains retained the utmost viability, fermentation activity and ability to ferment lactose under long-term (6–12 months) storage when mineral (vaseline) oil had been applied. Optimal conditions and the storage method with the view of their viability maintenance at the sufficient high rate during long-term storage have been determined for each of investigated strains.

Key words: *yeast (Candida), storage, strains.*

Представлено: О.А.Задорожною  
Рекомендовано до друку: В.В.Жмурком