

ВЛИЯНИЕ ЛИОФИЛИЗАЦИИ НА ВАЖНЕЙШИЕ СВОЙСТВА ШТАММОВ *BAC. THURINGIENSIS* VAR. *CAUCASICUS*

А. А. ХАЧАТУРЯН, Р. А. БОБИКЯН, Т. А. МАТИРОСОВА,
 Ж. Н. АВЕГЯН, Э. К. АФРИКЯН

Установлено отсутствие отрицательного влияния лиофилизации на дифференциальные признаки и инсектицидную активность культур серотипа *causicus* после 6-летнего хранения. Оптимальной суспензионной средой является нормальная лошадиная сыворотка с 7,5% сахарозы.

Ключевые слова: лиофилизация, бактериальный препарат, консервация микробов.

Лиофилизация широко используется для хранения культур микроорганизмов, а также для консервации различных биопрепаратов. Экспериментальные исследования многих авторов наглядно показывают преимущества этого способа сохранения микроорганизмов [4, 12, 13]. На возможность стабилизации основных свойств актиномицетов с помощью лиофилизации указывает Кузнецов [7].

Ряд авторов [1, 3, 5, 9] наблюдали отсутствие отрицательного влияния лиофилизации на жизнеспособность клеток и нормальную репродукцию споро- и токсинообразования у некоторых штаммов *Bac. thuringiensis*. В нашу задачу входило изучение влияния лиофилизации на сохранение основных таксономических признаков штаммов серотипа *causicus* и их вирулентность при использовании различных суспензионных сред.

Материал и методика. В работе испытывались производственные культуры *Bac. thuringiensis* var. *causicus*, применяемые для выработки препарата БИП (штаммы—ИНМИА 805, 811, 837), а также менее типичные штаммы того же серотипа—ИНМИА 924 и 950.

Лиофильная сушка культур проводилась в камере ТГ-15 (ГДР) при следующем режиме: температура замораживания минус 40° в течение 18 ч, температура высушивания плюс 35—40°. Сублимация проводилась в течение 5 ч при вакууме 10⁻² мм ртутного столба.

Культуры бактерий выращивались на мясо-лентном агаре (МПА) с добавлением 1% дрожжевого автолизата и после полного высыпания спор (обычно на 3—5 суток), суспензировались в различных защитных средах, включающих сыворотки, углеводы и физиологический раствор в разных соотношениях. Состав использованных суспензионных сред представлен в табл. 1. Титр суспензий равнялся приблизительно 1 млрд. спор в 1 мл. Ампулы с лиофилизированным материалом хранились при комнатной температуре.

Как видно из представленных в таблице данных (табл. 1), в работе применялись по несколько культур одного штамма, которые содержались до этого в различных

Суспензионные среды для лиофилизации и сроки хранения штаммов caucasicus

Суспензионные среды	№№ штаммов	Сроки хранения	Условное обозначение варианта
Молочная сыворотка	811	6 лет	811—1
Молочная сыворотка + 10% сахарозы	811	6 лет	811—2
Лошадиная сыворотка +7,5% сахарозы	811	6 лет	811—3
Mist. desiccans	811	6 лет	811—4
Физиологический раствор	811	6 лет	811—5
Физиологический раствор +10% глицерина	811	6 лет	811—6
Физиологический раствор +7,5% сахарозы	811	6 мес.	811—7
Физиологический раствор +7,5% сахарозы	805	6 мес.	805
Физиологический раствор +7,5% сахарозы	837	6 мес.	837
Физиологический раствор +7,5% сахарозы	924	3 мес.	924
Лошадиная сыворотка	950	3 мес.	950

Примечание: номера штаммов здесь и в последующих таблицах даны по коллекции Института микробиологии АН АрмССР.

условиях и отличались друг от друга интенсивностью образования энтомощидных кристаллов. Эти опыты проводились с целью установления более достоверных результатов на фоне вариабельности одного штамма.

Репродукция лиофилизированных бактерий проводилась внесением в ампулу стерильной водопроводной воды или физиологического раствора в количестве, равном первоначальному объему суспензии, и высевом ее на МПА с дрожжевым автолизатом в чашки Петри—для выяснения выживаемости культур после лиофилизации, и на косяки в пробирках—для изучения морфологических и физиолого-биохимических признаков штаммов. Использование растворов для регидратации среды, свободной от питательных веществ, но богатой хлоридами, ряд исследователей предлагает для снижения числа гибнущих при реактивации лиофилизированных микроорганизмов [2, 4, 14].

У лиофилизированных культур в разные сроки хранения нами изучались ключевые признаки методами, предложенными Де Баржак и Бонфуа [10, 11]. Проводилось изучение и других признаков по тестам, описанным в различных источниках, а также рекомендуемым подкомитетом бацилл Международного комитета по систематике бактерий. Подробные ссылки на использованные методики приведены в работе Надировой с соавторами [8].

Сохранение инсектицидных свойств культур определялось по интенсивности образования ромбовидных кристаллов и по гибели гусениц непарного шелкопряда. Гусеницы заражались путем скармливания корма, смоченного суспензией исследуемой культуры до и после лиофилизации ее в различных концентрациях (100, 10, 1%). Испытание проводилось на 15 гусеницах для каждой концентрации. Титр исходной суспензии, соответствующий 100%, составлял 4 млрд. спор/мл.

Результаты и обсуждение. Изучение штаммов серотипа caucasicus, содержащихся в течение продолжительного времени в лиофильно высушенном состоянии при комнатной температуре с использованием различных суспензионных сред, показало отсутствие каких-либо морфологических и культуральных отклонений по сравнению с теми же признаками у музейных штаммов.

Выживаемость испытанных штаммов, достигающая 80—90% непосредственно после лиофилизации, постепенно снижается и к 6 годам хранения доходит до 28—38% (табл. 2). Однако результаты исследований показывают сохранение штаммами высокой активности размножения и ферментативных свойств. В то же время необходимо отметить, что выявленные изменения в проценте выживаемости спор указывают на их биологическую неоднородность в одной и той же популяции. Этот факт имеет важное значение, включая производственное, и требует особого изучения.

Таблица 2
Выживаемость штаммов *caucasicus* при длительном хранении в лиофилизированном состоянии

№ штаммов	Суспензионные среды	Сроки хранения	Титр, спор млн на 1 мл	Выживаемость, % к исходному
811	Молочная сыворотка	6 лет	432	43,2
811	Молочная сыворотка+10% сахарозы	6 лет	320	38
811	Лошадиная сыворотка+7,5% сахарозы	6 лет	450	45
811	<i>Mist. desiccans</i>	6 лет	280	28
811	Физиологический раствор	6 лет	370	37
811	Физиологический раствор+10% глицерина	6 лет	380	38
811	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	6 мес.	560	56
805	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	6 мес.	456	45,6
837	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	6 мес.	560	56
924	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	3 мес.	760	76
950	Лошадиная сыворотка	3 мес.	680	68

Как показывают данные табл. 2, наилучшей из испытанных суспензионных сред следует считать лошадиную сыворотку с 7,5% сахарозы, обеспечивающую сравнительно высокий процент репродукции жизнеспособных клеток при длительном хранении лиофилизированных культур серотипа *caucasicus*.

Важнейшим признаком токсичности энтомопатогенных бактерий является токсинообразующая способность (по образованию кристаллов) штаммов *Bac. thuringiensis*. Поэтому прежде всего была изучена стабильность этого признака при лиофилизации с использованием разных суспензионных сред в разные сроки хранения при комнатной температуре. Как видно из данных табл. 3, штамм 811 через 6 лет полностью сохранил способность к образованию спор и в значительной мере—токсинообразанию. Данные показывают, что оптимальной суспензионной средой является лошадиная сыворотка с 7,5% сахарозы, *Mist. desiccans* и физиологический раствор. Хотя последние и позволяют получить высокий процент токсинов, но кристаллы образуются в основном мелкие. Минимальный процент токсинообразования наблюдается при

Сохранение споро- и кристаллообразующей способности штаммов *caucasicus* после лиофилизации

№ штаммов	Суспензионные среды	Срок хранения	Репродукция токсинов, % к исходному
811	Молочная сыворотка	6 лет	40—50
811	Молочная сыворотка+10% сахарозы	6 лет	60—70
811	Лошадина сыворотка+7,5% сахарозы	6 лет	70—80
811	Mist. desiccans	6 лет	90 (мелкие)
811	Физиологический раствор	6 лет	90
811	Физиологический раствор+10% глицерина	6 лет	60—70
811	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	6 мес.	80—90 (мелкие)
805	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	6 мес.	60—70
837	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	6 мес.	60—70
924	Физиологический раствор+7,5% сахарозы	3 мес.	60—70
950	Лошадина сыворотка	3 мес.	единичные

лиофильном высушивании штамма на молочной сыворотке. Штамму 950, лиофилизированный на лошадиной сыворотке без добавления сахарозы, уже через 3 месяца хранения теряет свою токсинообразующую способность. Очевидно, для этого штамма необходимо продолжить поиски более пригодной суспензионной среды, либо изменить режим лиофилизации. Сравнительно высокий процент токсинов редуцируется при использовании в качестве суспензионной среды физиологического раствора с 7,5% сахарозы. Однако непродолжительное время хранения не позволяет сделать определенных выводов относительно этой защитной среды. Тем не менее надо подчеркнуть, что консервация испытанных штаммов методом лиофилизации в целом позволяет на достаточно высоком уровне сохранять кристаллообразующие свойства данного серотипа. Это особенно важно, если учесть, что при пересевах на обычные питательные среды культуры серотипа *caucasicus* довольно быстро снижают эти свойства, а образование мелких кристалловидных токсинов является характерной особенностью данной разновидности.

В табл. 4 сведены результаты изучения основных признаков штаммов серотипа *caucasicus*. Вне зависимости от суспензионной среды и от сроков хранения лиофильно высушенных культур большинство дифференциальных признаков проявило постоянство: как и до лиофилизации, изученные штаммы обладали протеолитической активностью, гидролизуют крахмал, давали положительную лецитино-вителлиновую реакцию (ЛВР), образовывали ацетилметилкарбинол (АМК) и (кроме штамма 950)—розовый пигмент, но не синтезировали уреазу и не продуцировали кислоту из сахарозы, маннозы и салицина. Исключение составила способность штаммов выделять кислоту при росте на целлобио-

Репродукция дифференциальных признаков у штаммов серотипа *causaticus* после лиофилизации

Признаки Штаммы, варианты	АМК	ЛВР	Протеолиз	Уреазы	Пигмент	Ферментация				
						сахарозы	малтозы	целлобиозы	салицила	эскулина
До лиофилизации										
805, 811, 837, 924	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+++
950	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+
После лиофилизации										
805, 837, 924, 811-1, 811-2, 811-3, 811-4, 811-6, 811-7	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+++
811-5	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+
950	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+

зе. Это свойство все опытные штаммы после лиофилизации утратили. Что же касается стабильных признаков *Bac. thuringiensis*, представленных в табл. 5, все они репродуцировались без каких-либо отклонений от нормы.

Таблица 5
Репродукция стабильных признаков после лиофилизации штаммов серотипа *causaticus*

Признаки Штаммы, варианты	Каталаза	Инвертаза	Редуктаза	Денитрификация	Пленка
До лиофилизации					
805, 811, 837, 924, 950	+	-	-	+	-
После лиофилизации					
805, 837, 924, 950, 811-1, 811-2, 811-3, 811-4, 811-5, 811-6, 811-7	+	-	-	+	-

Аналогичная картина наблюдается и при изучении других дополнительных признаков (табл. 6). Однако, как и при усвоении целлобиозы, отмечается потеря способности усвоения пропионата натрия, эту активность сохраняет штамм 811 при сушке на *Mist. desiccans* и физиологическом растворе с 7,5% сахарозы. Однако штаммы 837 и 924 при лиофилизации на физиологическом растворе с сахарозой теряют это свойство. Подобные различия в усвоении источников углерода сходны с изменениями, отмеченными Надировой и Земляковым [8] у бактерий, длительно сохраняемых под вазелиновым маслом.

Репродукция дополнительных признаков после лиофилизации
у штаммов серотипа caucasicus

Штаммы, варианты	Признаки											
	7% NaCl	pH 5,7	50°C	Цитрат Na	Пропионат Na	ДГА	Разложение казеина	Тирозиназа	Дезфен	ЛДК	ОДК	АДГ
До лиофилизации												
805, 811, 837, 924	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
950	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
После лиофилизации												
805, 811-4, 811-7	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
837, 925, 950, 811-1, 811-2, 811-3, 811-5, 811-6	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-

Условные сокращения: ДГА—дигидроксиацетон; ЛДК—лизинидекарбоксилаза; ОДК—орнитинидекарбоксилаза; АДГ—аргининдигидролаза; дезфен—дезаминаза фенилаланина.

В табл. 7 представлены данные о гибели непарного шелкопряда при скармливании им различных концентраций суспензии штамма 811 после лиофилизации. Отмечается лишь незначительное снижение энтомоцидной активности по сравнению с нелиофилизированным штаммом, что можно отнести за счет возможной вариабельности в условиях опыта.

Таблица 7
Стабильность энтомоцидного действия штамма caucasicus после лиофилизации
(средние трех повторностей)

Штаммы	Концентрация суспензий		
	Гибель гусениц, %		
	100	10	1
811 (до лиофилизации)	88,9	55	26
811-7 (после лиофилизации)	84,6	48,3	22

Результаты исследований позволяют заключить, что лиофильная сушка является надежным способом сохранения жизнеспособности и других важнейших признаков штаммов *Bac. thuringiensis* var. *caucasicus* в течение продолжительного времени. Этот метод можно рекомендовать и для консервации и хранения производственных культур бактерий этой разновидности в промышленной выработке инсектицидного препарата БИП.

ԼԻՓՈՖԻԼԻԶԱՑԻԱՅԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ BACILLUS
THURINGIENSIS VAR. CAUCASICUS
ԿՈՒԼՏՈՒՐԱՆԵՐԻ ԿԱՐԵՎՈՐ ԱՌԱՆՁՆԱՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ՎՐԱ

Ա. Ա. ԿԱԶԱՏՅԱՆ, Թ. Հ. ԲՈՒԲԿՅԱՆ, Տ. Ա. ՄԱՐՏԻՐՈՍՈՎԱ,
Ճ. Հ. ԱՎԵՏՅԱՆ, Է. Գ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ

Վեց տարվա ուսումնասիրությունների արդյունքների հիման վրա հաստատված է, որ լիոֆիլիզացիան հանդիսանում է *Bacillus thuringiensis* var. *causicus* շտամների կենսունակության և բնորոշ հատկությունների պահպանման էֆեկտիվ եղանակ: Որպես ստադենդիոն միջավայր առավել արդյունավետ է ձիու շիճուկի օգտագործումը 7,5% սախարոզի հետ:

INFLUENCE OF LYOPHILIZATION ON IMPORTANT PROPERTIES
OF BACILLUS THURINGIENSIS VAR. CAUCASICUS STRAINS

A. A. KHACHATURIAN, R. H. BOBIKIAN, T. A. MARTIROSOVA,
J. H. AVETIAN, E. G. AFRIKIAN

Data obtained for 6 years observations have shown that lyophilization of *Bac. thuringiensis* var. *causicus* strains is an efficient method for maintenance of the viability, characteristic features as well as the ability to produce entomocide crystals. The most efficient among media tested was horse serum with 7,5 per cent of sucrose.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
2. Бланков Б. И., Клебанов Д. Л. Применение лиофилизации в микробиологии. М., 1961.
3. Бобикян Р. А., Чил-Акопян Л. А., Чилингирян К. О., Киракосян И. А., Адимян А. Б., Исмаилова А. Ю., Африкян Э. К. Сб.: Вопросы микробиологии. Микробные метаболиты, вып. 5 (XV), 191, Ереван, 1972.
4. Данилова М. В., Надирова И. М., Кудрявцев В. И. Сб.: Методы хранения колллекционных культур микроорганизмов, 119, 1967.
5. Исакова Н. П., Строева И. А. Тр. ВИЗР, 31, 371, 1968.
6. Крохина В. Н. Прикладная биохимия и микробиология, 10, 5, 753, 1974.
7. Кузнецов В. Д. Автореф. докт. дисс., М., 1975.
8. Надирова И. М., Земляков В. Л. Микробиология, 39, 6, 1106, 1970.
9. Троицкая Е. Н. Прикладная биохимия и микробиология, 15, 3, 402, 1979.
10. Barjac H. de, Bonnefol A. Entomophaga, 7, 5, 1962.
11. Barjac H. de, Bonnefol A. Entomophaga, 18, 1, 5, 1973.
12. Lapage S. P., Shelton J. E., Mitchell T. G., Mackenzie A. R. In: Methods in Microbiology, 3A, 135, Acad Press, London, 1970.
13. Lapage S. P. In: Proceedings of the first intersectoral congress of IAMS. 5, Microbial products. Freezing and freeze-drying, Japan, 632, 1975.
14. Yamasato K., Okuno D. In: Proceedings of the first intersectoral congress of IAMS, 5, Microbial products. Freezing and freeze-drying, 641, Japan, 1975.