

Výsledky uchovávaní mikroorganizmov lyofilizáciou

663.1

Ing. JÁN FUSKA, DrSc., Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Katedra biochemickej technológie,
812 37 Bratislava

Kľúčové slová: lyofilizácia mikroorganizmov, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Coprinus*, aktinomycéty, baktérie

ÚVOD

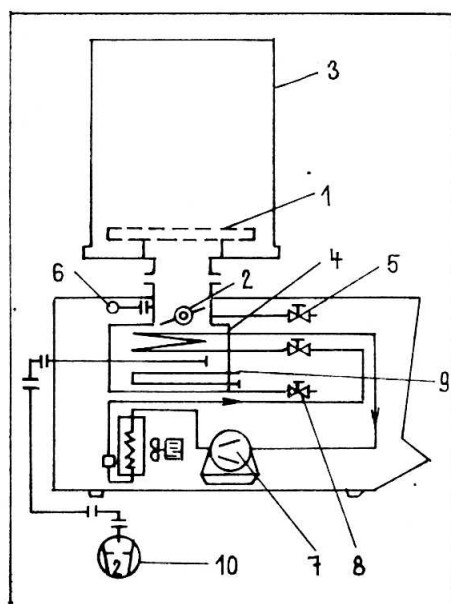
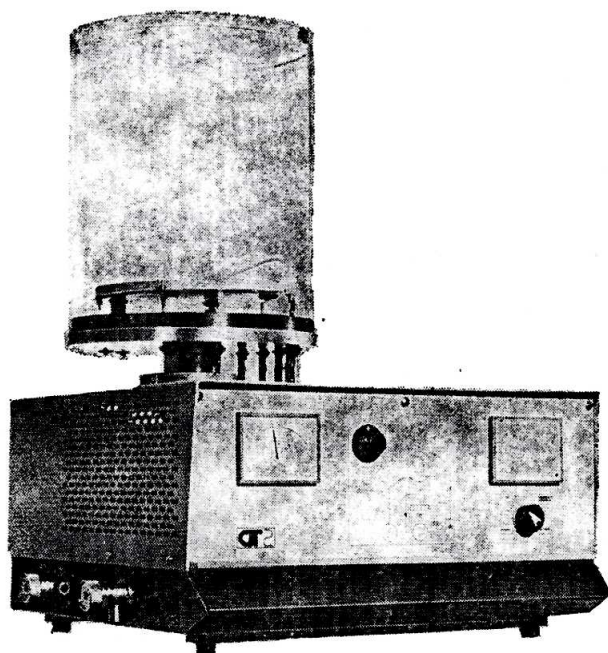
Na uchovávanie mikroorganizmov sa používajú viaceré metódy: pasážovanie na agarových pôdach, prekrytie kultúry parafinovým olejom, spóry uložené v zmesi piesku a hlíny, lyofilizácia alebo uchovávanie v tekutom dusíku. Najuniverzálnejšia je posledná metóda, vyžaduje však špeciálne nádoby a zariadenia a neustále dopĺňovanie dusíka. V zbierkach sa dlhodobe používajú rôzne formy lyofilizácie. V našom laboratóriu sme upravili lyofilizačnú metódu a vypracovaným postupom sme zakonzervovali rôzne mikroorganizmy. Po dlhšej dobe uchovávaní sme kultúry vyočkovali na pevné agarové médiá, overili sme ich prežívanie a u viacerých tiež ich schopnosť produkovať určité metabolity.

MATERIÁL A METÓDY

Kultúry uchovávané našim postupom sú uvedené v tabuľke 1. Vzhľadom na rôznosť zloženia kultivačných médií uvádzame len ich názov a práce, v ktorých sú ich zloženia a tiež detailné postupy kultivácie. Keďže nami uchovávané kultúry boli použité aj na prípravu ich metabolitov, uvádzame

aj analytické metódy ich stanovenia, tj. práce, kde sú uvedené detailné postupy. U niektorých kultúr sme sledovali iba ich prežívanie. Postupy na prípravu konzerv jednotlivých skupín mikroorganizmov sú uvedené na obrázku 1. Na lyofilizáciu sme použili prístroj Leybold-Heraeus GT2 (SRN), ktorý je uvedený na obraze 1. Suspenziu spór alebo im podobných útvarov sme pripravili spláchnutím povrchu agarovej kultúry 5% roztokom maltózy, koncentráciu spór sme volili podľa účelu prípravy konzerv. Suspenziu spór sme rozplnili po 1 až 5 ml do tenkostenných ampúl, používaných na prípravu injekčných roztokov. Objem suspenzie tvoril 1/5 objemu ampule. Ampule so spórovou suspenziou, prekryté sterilnou gásou, sme vložili do mraziacej zmesi, ktorá pozostávala z acetónu (etanolu) a pevného CO₂, v niektorých postupoch sme použili i tekutého dusíka. Vlastná sublimácia vodnej fázy sa realizovala v uvedenom už zariadení. Po ukončení sublimácie sa do hrdla ampule vložila sterilná vata a ampule sa bez evakuácie zatavili.

Pri oživovaní kultúry sme povrch ampule otreli etanolom, koniec ampule urezali a pridali sterilnú vodu. Pripravená spórová suspenzia sa preniesla na šikmé agarové médiá alebo priamo do tekutej inokulačnej pôdy.



Obr. 1. Zariadenie použité na lyofilizáciu Leybold-Heraeus CT 2

1 — polička na produkt, 2 — uzatváracia klapka, 3 — sušiacia komora, 4 — kondenzátor, 5 — zavzdušňovací ventil, 6 — meranie vákua, 7 — mraziaca jednotka, 8 — kondenzát, 9 — odmrazovač, 10 — vákuová pumpa

VÝSLEDKY A DISKUSIA

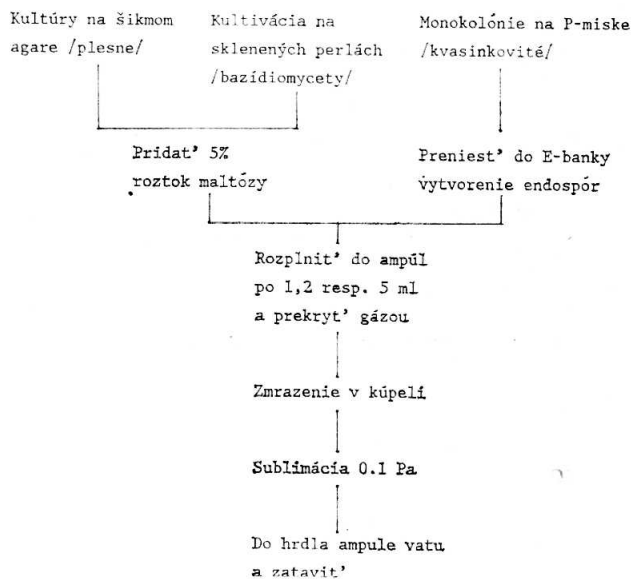
Postup, ktorý sme používali, je vhodný na uchovávanie mikroorganizmov vytvárajúcich spóry alebo im podobné funkčné útvary. Metóda je relatívne jednoduchá, málo pracná a možno ju využiť v laboratóriách, kde sa pracuje s väčším počtom kultúr a hlavne tam, kde sa mikroorganizmy využívajú na biosyntézu metabolitov, pri skríningových metódach a metódach používaných na stanovenie biologicky účinných látok. Postupom uvedeným na obr. 2 pripravili sme konzervy rôznych mikroorganizmov, z nich 13 je uvedených v tabuľke 1 a 2.

Schopnosť prežívania spór jednotlivých kultúr sme kontrolovali bezprostredne po lyofilizácii, aby sme zistili úmrtnosť spór, resp. poškodenie kultúr v priebehu samotnej lyofilizácie. Počet prežívajúcich spór po lyofilizácii bol v rámci rozptylu biologickej metódy. U *Eremothecium ashbyi* a *Gibberella fujikuroi* sme kontrolovali prežívanie spór po 30, 90, 180 a 360 dňoch, potom po 2 rokoch a konečne po 18, resp. 20 rokoch. U ostatných kultúr sme ich prežívanie kontrolovali po 1 a 2 rokoch, dlhšie intervaly sú uvedené v tabuľke 2. Ani u jednej kultúry sme v priebehu 2 rokov nemali problémy s jej oživením, pri čom si kultúry v tomto intervale uchovali svoje produkčné schopnosti.

Vypracovanie postupu bolo zamerané na jeho využitie v technologických laboratóriách, kde sa s tými istými kultúrami pracuje systematicky, ale ich pasážovanie nepriaznivo vplyva na biosyntézu ich metabolitov. Keďže obsah ampule je počtom spór ekvivalentný počtu spór potrebných na očkovanie inokulačných médií (príprava vegetatívneho inokula), je možné preniesť spórovú suspenziu priamo do tekutého média. Doba nárastu vegetatívnej formy mikroorganizmu sa predĺži o 24, max. 48 hodín. Výhoda takto pripravených konzerv je i v tom, že sa vylúči vplyv pasážovania kultúry a tým sa zúži aj rozptyl v produkcii metabolitov. Tento poznatok bol u *E. ashbyi*, *G. fujikuroi*, *Penicillium chrysogenum* a *Penicillium cyaneum* potvrdený i v poloprevádzkových pokusoch.

Popísaný postup je aktuálny aj v laboratóriách, kde sa používajú rôzne kmene i v nepravidelných intervaloch pre testovanie biologicky aktívnych látok (farmácia, potravinárstvo, poľnohospodárstvo). Pripravené konzervy zaručujú po dobu 2 rokov štandardné spórové inokulum a tým tiež väčšiu presnosť vo výsledkoch. Navyše nie je potrebné kultúry bezprostredne pred ich použitím pasážovať na agarových médiach.

Pri správnom postupe sa vylúčia i kontaminácie kultúr inými mikroorganizmami. U producentov metabolitov zaručuje postup i stabilitu procesov.



Obr. 2. Príprava konzerv

Tabuľka 1. Média a kultivačné postupy mikroorganizmov, analytické stanovenie metabolitov

Mikroorganizmus	Médium a postup kultivácie	Analytická metóda
Gibberella fuikuroi U-2	Sladinový agar [1, 2]	PC [3]
Mycélium steriliu X-80	Czapek-Doxov agar [7]	—
Aspergillus sclerotiorum A-42	Sabouraudovo médium [1, 4]	TLC [4]
Aspergillus niger X-172	Sabouraudovo médium [1, 5]	TLC [5]
Coprinus sp. C-20	Czapek-Doxov agar [7]	gravimetria [6]
Penicillium vermiculatum CCM F-276	Czapek-Doxov agar [7]	TLC [7], HPLC [8], TLC [5]
Cunninghamella elegans NRRL 1393	Sabouraudovo médium [1, 9]	TLC [9]
Eremothecium ashbyi	Gorodkovej pôda [10, 11]	polarografia [12]
Streptomyces griseus UI 13976	Bennetovo médium [1]	—
Penicillium stipitatum Thom	Czapek-Doxov agar [7, 13]	TLC [13], polarografia [14]
Arthrobacter simplex ATCC 6946	Nutrient agar [1, 15]	TLC [9]
Aureobasidium pullulans de Bary	Sladinový agar [1, 16]	TLC [16]
Cladosporium sphaerospermum No. 22	Sladinový agar [1, 17]	—

TLC — tenkovrstevná chromatografia, HPLC — vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, PC — papierová chromatografia

Tabuľka 2. Mikroorganizmy uchovávané popísanou metódou

Uchovávaný mikroorganizmus	Využitie kmeňa	Doba oživenia
G. fuikuroi U-2	Produkcia giberelínov a bikaverínu	20 rokov
M. steriliu X-80	Degradácia lignínu	18 rokov
A. sclerotiorum A-42	Transformácia bikaverínu	8 rokov
A. niger X-172	Transformácia kardiolglykozidov	8 rokov
Coprinus sp. C-20	Degradácia celulózy	8 rokov
P. vermiculatum CCM F-276	Produkcia vermikulínu, vermistatínu, transformácia kardiolglykozidov	7 rokov
C. elegans NRRL 1393	Transformácia withaferínu A	7 rokov
E. ashbyi	Produkcia riboflavínu	6 rokov
S. griseus UI 13976	Transformácia vinkaalkaloidov	6 rokov
P. stipitatum Thom	Produkcia cytostipínu a tropolónov	6 rokov
A. simplex ATCC 6946	Transformácia morfinanov	2 roky
A. pullulans de Bary	Transformácia withaferínu A	2 roky
C. sphaerospermum No. 22	Drevosfarbujúci kmeň	2 roky

Uvedeným postupom možno na pracovisku uchovávať relatívne veľké množstvo mikroorganizmov s minimálnou pracnosťou. Raz za 1 až 2 roky pripraví sa väčšie množstvo konzerv z toho istého materiálu a možno ich potom uchovať pri bežnej laboratórnej teplote. Postup zvyšuje i ekonomiku práce v biologických laboratóriách.

[14] PROKSA, B. - FUSKA, J.: Chem. zvesti, **28**, 1974, s. 789.

[15] FUSKA, J. et al.: Folia microbiol., **30**, 1985, s. 427.

[16] FUSKA, J. et al.: Acta Biotechnol., **8**, 1988, s. 291.

[17] FUSKA, J. - FUSKOVÁ, A. - ŠTURDÍKOVÁ, M.: Holzforschung, **43**, 1989, s. 83.

Lektoroval Ing. F. Machek, CSc.

Literatúra

- [1] The American Type Culture Collection. Catalogue of strains I. 13th Edition, Rockville, 1978.
- [2] FUSKA, J. et al.: Folia microbiol., **6**, 1961, s. 18.
- [3] PODOJIL, M. - ŠEVČÍK, V.: Folia microbiol., **5**, 1960, s. 192.
- [4] FUSKA, J. et al.: Bull. Food Res., Bratislava. Special issue 1986, s. 65.
- [5] FUSKA, J. et al.: Appl. Microbiol. Biotechnol., **28**, 1987, s. 313.
- [6] PAVLÍKOVÁ, E. et al.: Folia microbiol., **27**, 1982, s. 126.
- [7] FUSKA, J. - NEMEC, P. - KUHR, I.: J. Antibiotics, **25**, 1972, s. 208.
- [8] FUSKA, J. - PROKSA, B.: Pharmazie, **38**, 1983, s. 634.
- [9] FUSKA, J.: Steroids, **40**, 1982, s. 157.
- [10] KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A.: Praktikum technické mikrobiologie, SNTL Praha 1954, s. 64.
- [11] KNOBLOCH, E.: Fyzikálně chemické metody stanovení vitamínů, ČSAV Praha 1956, s. 178.
- [12] FUSKA, J. - ŠULO, Š.: Chem. zvesti, **19**, 1965, s. 120.
- [13] FUSKA, J. et al.: J. Antibiotics, **27**, 1974, s. 123.

Fuska, J.: Výsledky uchovávaní mikroorganizmů lyofilizací. Kvas. prům., **37**, 1991, č. 5, s. 134—137.

Bol vypracovaný a overený zjednodušený spôsob uchovávaní mikroorganizmů lyofilizáciou. Uchovávané kmene boli po dvoch rokoch oživené a schopné produkovať požadované metabolity v pôvodných množstvách. Spôsob uchovávaní možno využiť pri príprave štandardného inokula pre testovacie metódy vo farmaceutickom, potravinárskom i drevárskom výskume ale aj na prípravu vegetatívneho inokula pre procesy biosyntézy metabolitov.

Фуска, Я.: Результаты хранения микроорганизмов путем лиофилизации. Квас. прум. **37**, 1991, № 5, стр. 134—137.

Был разработан и исследован упрощенный способ хранения микроорганизмов путем лиофилизации. Хранящиеся штаммы по истечении двух лет были активные и способны производить требуемые метаболиты в прежних количествах. Способ хранения можно использовать при изготовлении стандартных материалов инокуляции и для методов-тестов в фармацевтической, пищевой и деревообрабатывающей промышленности, и также и для вегетативного материала для инокуляции в процессах биосинтеза метаболитов.

Fuska, J.: The Results of Preservation of Microorganisms by Lyophilization. Kvas. prům., 37, 1991, No. 5, pp. 134—137.

A simplified procedure for preservation of microorganisms by lyophilization was elaborated and put to the tests. The preserved strains were revived after two years and they were able to produce the required metabolites in the original concentrations. This procedure of preservation can be used for preparation of standardized sporal inoculum for the test-methods in pharmaceutical, food and wood research, for the screening methods as well as for direct preparation of vegetative inoculum for processes of biosynthesis of metabolites.

Fuska, J.: Ergebnisse mit der Aufbewahrung von Mikroorganismen mittels Lyophilisation. Kvas. prům. 37, 1991, Nr. 5, S. 134—137.

Es wurde ein vereinfachtes Verfahren zur Aufbewahrung der Mikroorganismen mittels Lyophilisation ausgearbeitet und erprobt. Die aufbewahrten Stämme wurden nach zwei Jahren belebt und bezeugten die Fähigkeit, die erforderlichen Metabolite in den ursprünglichen Mengen zu produzieren. Die Aufbewahrungsmethode kann bei der Aufbereitung des Standard-Inoculums für die Testierungsmethoden in der Forschung für die pharmazeutische, Lebensmittel- und Holzverarbeitende Industrie, aber auch für die Aufbereitung des vegetativen Inoculums für die Prozesse der Metabolite-Biosynthese angewandt werden.