

СОХРАНЕНИЕ ГЕНОФОНДА ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ МЕТОДОМ ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Е.В. Матвеева, Всероссийский НИИ фитопатологии

Во ВНИИФ в лаборатории бактериальных болезней растений создана коллекция живых культур микроорганизмов, в которой представлены большинство известных возбудителей бактериозов, распространенных на территории России и некоторых стран СНГ. Для сохранения имеющихся видов в неизменном состоянии необходимо использовать наиболее перспективные методы хранения. Наиболее перспективными методами длительного хранения бактериальных культур в настоящее время являются лиофилизация и криоконсервация.

Цель настоящих исследований — изучение способов сохранения жизнеспособности, фенотипических и патогенных свойств фитопатогенных бактерий методом высу-

шивания из замороженного состояния — лиофилизации. Впервые использованный Альтманом еще в 1890 г., этот метод нашел широкое применение во многих областях биологии [5, 6]*.

Для сохранения жизнеспособности бактериальных клеток в период лиофилизации и последующего хранения большое значение имеют состав защитной среды, остаточная влажность препаратов, температура и атмосфера хранения. Защитная среда, используемая при лиофилизации бактерий, играет важную роль для сохранения жизнеспособности клеток. Различные вещества, включая углеводы, протеины молока, пептон, желатин, мясной экстракт, глицерин и фосфаты, необходимы для

Таблица 1. Список лиофилизированных штаммов фитопатогенных бактерий

Вид	Штамм	Растение-хозяин
<i>Erwinia carotovora</i> subs. <i>carotovora</i>	246, 301, 216	<i>Brassica oleracea</i> L.
<i>Pseudomonas atrofaciens</i>	W-9, W-7	<i>Triticum aestivum</i> L.
<i>P. fuscovaginae</i>	15, 12, 3, 92, 50	<i>Oryza sativa</i> L.
<i>Pseudomonas</i> spp.	R88, R111, Bt2	<i>Triticum aestivum</i> L.
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	22, 26, 27, 2286	<i>Brassica oleracea</i> L.
<i>X. oryzae</i>	D-5, 39, 21, 4, PXO61	<i>Oryza sativa</i> L.
<i>X. malvacearum</i>	10, 16	<i>Gossiporum herbaceum</i> L.
<i>X. phaseoli</i>	41, 42, 51, 521-533	<i>Glycine max</i> L.
<i>X. translucens</i>	W-11, B-3003, B-606	<i>Triticum aestivum</i> L.
	R-1007, W-1008	<i>Hordeum vulgare</i> L. <i>Secale cereale</i> L.

Таблица 2. Выживаемость фитопатогенных бактерий сразу после лиофилизации в зависимости от компонентов защитной среды, %

Вариант	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , 22*	<i>Erwinia carotovora</i> pv. <i>carotovora</i> , 216	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> , 38	Выживаемость, %	
				1 год	2 года
Контроль (без защитной среды)	3,96±0,7	1,7±0,4	2,5±0,4		
I	70,5±3,5	65,4±4,5	70,4±4,2		
II	74,8±4,1	84,7±3,9	82,1±2,7		
III	76,2±3,2	75,9±2,7	75,2±4,1		
IV	70,4±2,8	70,4±1,2	47,1±1,8		
V	37,6±3,8	42,8±3,6	32,8±3,4		
VI	26,7±4,2	31,2±2,9	31,6±3,1		
VII	18,9±2,9	21,8±4,3	21,3±2,9		
VIII	6,8±5,6	11,6±2,7	9,7±2,4		

Таблица 3. Выживаемость различных видов бактерий рода *Xanthomonas* после лиофилизации в ЖС

Вид	Штамм	KOE/мл x 10 ⁹ до лиофилизации	KOE/мл x 10 ⁹ после лиофилизации	Выживаемость, %
<i>X. phaseoli</i>	41	5,4±1,8	3,2±0,4	59,2
	42	4,1±1,1	3,4±0,2	82,9
	494	5,6±1,2	4,2±0,3	75,0
	33	5,7±0,9	4,9±0,7	85,9
	M±m			75,75±5,5
<i>X. malvacearum</i>	10	1,8±0,2	1,6±0,5	88,8
	16	6,2±0,4	6,2±0,9	100
	50	6,8±0,8	5,9±0,7	86,7
	M±m			91,8±1,7
<i>X. translucens</i>	W-11	2,5±0,6	2,5±3,0	100,0
	B-3003	3,3±0,4	2,6±0,3	78,8
	R-1007	6,3±0,7	3,8±0,3	60,3
	M±m			79,7±6,5
<i>X. campestris</i>	22	6,8±0,7	6,4±0,2	94,1
	27	2,9±0,3	3,1±0,3	103,4
	2286	1,3±0,2	1,0±0,1	76,9
	M±m			90,3±4,5

защиты клеток от повреждений. В литературе имеется некоторая информация по лиофилизации различных видов фитопатогенных бактерий [1, 3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13], но в то же время условия длительного хранения сухих культур изучены недостаточно.

Таблица 4. Выживаемость возбудителей бактериозов через год после сушки в зависимости от компонентов защитной среды, %

Вариант	Ожог риса (штамм Д-5)	Бурая гниль (штамм 50)	Базальный бактериоз (штамм П-7)
II	88,8±8,2	69,5±2,4	76,4±1,2
III	79,3±3,4	54,3±3,8	66,7±2,7
VI	10,8±1,9	38,2±2,7	29,1±3,9
V	27,1±4,8	39,8±3,4	38,1±4,1
VII	6,6±0,9	12,8±0,5	23,7±1,2
VIII	4,2±0,7	5,8±0,2	10,9±2,7

Таблица 5. Выживаемость (%) лиофилизованных клеток возбудителя сосудистого бактериоза капусты и ожога риса в зависимости от атмосферы, температуры и продолжительности хранения (защитная среда – вариант II)

Вариант	Температура, °C	<i>Xanthomonas oryzae</i> , штамм Д5		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , штамм 22	
		1 год	2 года	1 год	2 года
Вакуум	20	1,2±0,03	0,005	0,5	—
	-4...-5	68,6±3,5	60,1±2,8	68,3±4,8	40,1±2,8
	-20	79,4±5,6	75,6±3,6	74,4±2,8	72,6±2,6
Азот	20	2,5±0,04	0,0004	0,005	—
	-4...-5	47,5±7,6	39,7±2,9	61,4±2,9	31,7±3,4
	-20	47,2±3,2	42,7±5,4	32,8±4,6	43,4±4,9
Осушенный воздух	20	0,03	0,03	—	—
	-4...-5	26,6±3,2	19,1±4,5	15,1±2,5	19,1±4,5
	-20	32,2±2,1	26,7±3,4	12,7±0,4	6,7±0,9

Таблица 6. Влияние остаточной влажности на выживаемость (%) лиофилизованных клеток при хранении в вакууме при -40°C в течение года

Остаточная влажность, %	Вид, штамм					
	<i>Pseudomonas atrofaciens</i>		<i>Erwinia carotovora</i>		<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	
	W-9	W-7	246	301	22	26
9,3	9,2	11,8	12,8	11,1	13,4	16,5
8,9	8,9	10,2	11,9	13,6	11,6	12,6
7,2	9,4	12,6	12,7	14,5	18,5	15,4
6,5	11,2	14,8	14,6	15,1	21,1	15,6
6,0	15,6	14,3	19,7	14,7	24,2	18,2
5,5	49,5	44,5	37,4	25,6	42,3	36,2
4,9	46,8	42,3	4,5	27,1	47,8	41,8
4,0	54,2	50,7	49,8	52,8	49,3	42,4
3,8	54,7	60,6	45,7	60,8	57,1	40,7
3,1	60,8	72,6	63,4	64,7	69,4	72,6
2,7	70,2	74,5	70,7	64,5	72,2	68,8
1,5	53,3	70,6	73,6	65,0	69,3	66,3
0,7	57,6	72,3	51,2	50,2	72,8	62,4

Главная задача настоящих исследований — изучить влияние различных факторов, влияющих на выживаемость фитопатогенных бактерий в период лиофилизации и дальнейшего длительного хранения.

Список бактерий, использованных в данном исследовании, приведен в табл. 1. Все штаммы выращивали на агаровых косяках при 28°C в течение 48 ч на подходящих для их роста питательных средах: PSA использовали главным образом для роста видов рода *Xanthomonas* и некоторых других видов фитопатогенных бактерий, YDC

— *Clavibacter*, *Rathiobacter* и *Xanthomonas*, КА — *Erwinia*, *Ralstonia* и *Pseudomonas*.

Двухдневную бактериальную культуру смешивали с защитными средами, ставили на 1 ч на качалку для получения однородной массы и доводили концентрацию до 10^9 — 10^{10} КОЕ/мл. С целью подбора оптимальной защитной среды были изучены следующие защитные среды (%):

- I. Желатино-сахарозная среда (ЖС): желатин (1), сахароза (10);
- II. ЖС + тиомочевина (0,5);
- III. ЖС + глутамат натрия (5);
- IV. ЖС + агар (0,1);
- V. Пептон-крахмальная: пептон (5), крахмал (17);
- VI. Декстран-сахарозная: декстран (8), сахароза (7,52);
- VII. Снятое молоко;
- VIII. Мальтоза (10).

Бактериальную массу разливали по 0,2—0,3 мл в ампулы. Материал предварительно замораживали при $-20^\circ\pm 3^\circ\text{C}$ в течение 2 ч. Ампулы помещали в камеру установки (Secfrua или LP3, YOUAN) и высушивали при остаточном давлении $3,2\text{--}10^{-2}$ мВт и температуре конденсора $-53^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$. Конечная температура сушки была $17\text{--}20^\circ\text{C}$. Остаточная влажность препаратов — 1,5—3,0%. После лиофилизации ампулы запаивали под вакуумом, азотом и осущененным воздухом и хранили при разных температурах (комнатная, 5° , $-2\text{--}-4^\circ$ и -20°C). Для определения числа жизнеспособных клеток (КОЕ) ампулы вскрывали и заливали 0,2—0,3 мл регидратанта, подобранныго нами для указанных культур (сахароза — 2%, L-глутаминовая кислота — 0,5%, pH=6,8). Полученную суспензию выдерживали в этой среде в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего готовили разведения общепринятыми методами. Виды рода *Xanthomonas* высевали на следующую среду (г/л): пептон (5), сахароза (10), глутаминовая кислота (2), дрожжевой экстракт (10), азотнокислый кальций (0,5), натрий фосфорнокислый двухзамещенный (2), генциан-виолет (3 мл 0,1%-го водного раствора с pH=6,6—6,8). Виды рода *Pseudomonas* высевали на картофельный агар с генциан-виолетом или на среду Кинга Б. Остаточную влажность препаратов определяли методом Долинова [2]. Статистическую обработку материала проводили по общепринятой методике [10].

Определение числа жизнеспособных клеток изучаемых возбудителей сразу после лиофилизации показало необходимость наличия протективных веществ в суспензионной среде. Процент жизнеспособных клеток в значительной степени зависел от состава защитной среды. Из ряда испытанных нами защитных сред наибольшее число жизнеспособных клеток возбудителей базального и черного бактериозов зерновых, сосудистого бактериоза капусты, мягких гнилей овощных и некроза груш (от 70 до 89%) сохранялось на ЖС или ее модификациях. Высушивание бактериальной массы без защитных сред приводило к гибели 95—99% клеток (табл. 2, 3). В других вариантах, в частности, при замене желатины декстраном или при применении в качестве компонентов защитной среды пептона или крахмала, число выживших клеток уменьшалось вдвое, а при использование молочной среды падало до 30%. Как показали дальнейшие исследования, ЖС была благоприятной также для высушивания и хранения различных патотипов *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *Erwinia carotovora* и *Pseudomonas syringae*. Эта же среда была оптимальной и для последующего длительного хранения лиофилизованных клеток (табл. 4). Напротив, молочная, декстран-сахарозная среды и мальтоза оказались непригодными как для лиофилизации, так и последующего хранения.

При выборе режимов хранения установлено, что выживаемость фитопатогенных бактерий выше при хранении материала под вакуумом, чем в атмосфере азота и осущенного воздуха (табл. 5). Комнатная температура оказалась непригодной для хранения сухого материала. При остальных испытанных температурных режимах хранения выживаемость была тем выше, чем ниже температура хранения.

Опыты по определению динамики числа жизнеспособных клеток в зависимости от времени хранения показали, что наибольший процент гибели клеток наблюдался в первый период хранения, а в дальнейшем скорость отмирания резко замедляется. Клетки лучше выживали при остаточной влажности ниже 4% (табл. 6). Наибольшая выживаемость клеток фитопатогенных бактерий отмечена при обводнении сухих культур в питательном среде (сахароза с глутаматом натрия). ■

Литература

1. Anonymous. 1979. Preservation of plant pathogenic bacteria. Bull. Inst. Trop. Agriculture Kyushu Univ., 3, 61—82.
2. Dolinov, K.E. 1960. Prophylaxis of an infection by alive vaccines. Medgis, 40.
3. Gitaitis, R.D. 1987. Refinement of lyophilization methodology for storage of large numbers of bacterial strains. Plant disease, 71, 7, 615—616.
4. Goodman, R.N. 1975. Lyophilization of phytobacteria pathogens. Proceedings of the first Workshop on phytobacteriology. 3-rd.edited by R.N. Goodman. University of Missouri Press Columbia, 11—12.
5. Heckly, R.J. 1978. Preservation of microorganisms. Advances in applied microbiology, v.24, (edited by Periman D.). Academic press, N.Y., San Francisco, Lond., 1—53.
6. Lapage, S.P. 1973. Preservation of microorganisms. Handbuch of microbiology. Cleveland , Ohia v.1, 713—724.
7. Leben, C. 1974. Survival of plant pathogenic bacteria. Ohio agric resear.dev. cent.spec.circ., 100, 1—21.
8. Lelliot, R.A. 1965. The preservation of plant pathogenic bacteria. J. applied bacteriology. 28, 1, 181—193.
9. Matveeva, E.V., Samokhvalova, G.K., Oditsova, M.A., Kaprelyants, A.S., Kulikov, B.N. 1990. Viability of bacterial pathogens of rice after freeze-drying and storage. J. microbiology, 52, 6, 7—12.
10. Meynell, G.G., Meynell, E. 1967. Theory and Practice in experimental bacteriology. Cambridge at the University Press. 189—285.
11. Moore, L.W., Carlson, H.V. 1975. Liquid nitrogen storage of the phytopathogenic bacteria. Phytopathology, 65, 3, 246—250.
12. Quadling C. 1960. Preservation of *Xanthomonas* by freezing-drying in glycerol broth. Can. J microbiology. 6, 475-477.
13. Sleesman J.P., Leben P. 1978. Preservation phytopathogenic bacteria at -70°C or with silica gel. Plant disease reporter, 10, 910—913.