С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің **Ғылым жаршысы**(пәнаралық) = **Вестник науки** Казахского агротехнического университета им. С. Сейфуллина (междисциплинарный). – 2015. - №2 (85). –С. 12-18

ХРАНЕНИЕ ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩИХ И СЕРООКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ МЕТОДОМ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ЛИОФИЛИЗАЦИИ

Егинчибаева А.Д., Бекенова Н.Е., Ануарбекова С.С.

Аннотация

В статье приводятся результаты исследовании направленных на изыскание оптимальных условий длительного хранения культур микроорганизмов с железоокисляющими и сероокисляющими свойствами, которые участвуют в процессах биовыщелачивания металлов. Основными методами исследования является криоконсервация и лиофилизация с использованием защитных сред на основе пирита. Нами применяются такие защитные компоненты, как желатин, сахароза, глицерин, поливинилпиралидон, аскорбиновая кислота, лошадиная сыворотка. Все защитные среды эффективны. Показатель жизнеспособности составляет 10^{10}, который остается стабильным в процессе хранения. При этом морфо-культуральные характеристики остаются без изменений, контаминации посторонней микрофлорой не происходит. Данные результаты имеют значение для развития коллекционного дела и будут применены на практике в Республиканской коллекции микроорганизмов.

Ключевые слова: железоокисляющие и сероокисляющие микроорганизмы, криоконсервация, лиофилизация, защитные среды, пирит.

Введение

Применение ацидофильных хемолитотрофных железо- и сероокисляющих микроорганизмов в переработке минерального сырья обеспечило успешное развитие биогидрометаллургии. В мировой практике примерами эксплуатации хемолитотрофных ацидофилов являются методы биовыщелачивания меди, железа, цинка, урана и других металлов, десульфуризации угля и нефти, третичного восстановления нефти и биосорбции ионов металлов [1].

Использование микробных ассоциаций и монокультуры микроорганизмов для извлечения ценных металлов из руд применяют в России, Казахстане, Китае, США, ЮАР, Бразилии, Австралии, Перу, Чили и выполняют кучным, дамповым и чановым способами при участии специфичных групп микроорганизмов: *Acidithiobacillus* spp., *Leptospirillum* spp., *Ferroplasma* spp., *Sulfobacillus* spp., *Sulfolobus* spp., *Acidianus* spp. и др [2].

Источниками энергии для этих микроорганизмов служат двухвалентное железо и восстановленные соединения серы,

которые они могут получать непосредственно из выщелачиваемого сырья [3], а продуктами жизнедеятельности, соответственно, – трехвалентное железо и сульфат-ион, являющиеся активными окислителями сульфидных минералов [4].

Микробное выщелачивание сульфидных руд и концентратов давно было признано привлекательной альтернативой традиционным физическим и химическим методам извлечения металлов из руд благодаря его экологичности – сокращению потребления энергии и транспортных затрат, менее пагубному воздействию на окружающую среду [5]. Развитие горнодобывающей отрасли в связи с истощением запасов высокообогащенных руд направлено на перспективу промышленного использования микроорганизмов для своих нужд [6].

Подбору микробного компонента для биогеотехнологических задач уделяется большое внимание [7]. Качественный состав и биологическая активность микроорганизмов обуславливают эффективность процесса. Поэтому необходимым условием успешной работы является правильное поддержание не только жизнеспособность клеток, но и таксономических и производственных свойств [8].

Общего метода одинаково пригодного для хранения многочисленных и разнообразных групп микроорганизмов не существует.

В качестве длительных методов сохранения, при наличии соответствующей аппаратуры и специфических навыков рекомендуются методы, позволяющие содержать культуры длительное время в неизменном генотипическом и фенотипическом состоянии – это лиофилизация и криоконсервация. Эти методы позволяют в течениие долгих лет сохранять жизнеспособность, морфологические и культуральные свойства, а также биохимическую и производственную активность клеток.

Таким образом, цель данной исследовательской работы заключается в подборе оптимальных защитных сред для криоконсервации и лиофилизации микроорганизмов с железоокисляющими и сероокисляющими свойствами.

Материалы и методика исследования

Объект исследования

Объектами исследования были 18 культур микроорганизмов, обладающие железо- и сероокисляющими свойствами, перспективных для использования в биогеотехнологии.

Хранение в лиофилизированном состоянии [9, 10]

Микроорганизмы, подлежащие лиофилизации, выращивают в оптимальных условиях до начала стационарной фазы роста или окончания формирования покоящихся форм на твердой питательной среде, рост должен быть обильным. Затем клетки или соответственно покоящиеся формы суспендируют в защитных средах. В состав защитных сред входят различные вещества, которые предохраняют клетки от повреждений в период замораживания и высушивания: желатина, сахароза, нативные сыворотки и др.

Для успешной лиофилизации плотность в защитной среде должна быть как можно более высокой – 10^9-10^{10} клеток в 1 мл. Полученную суспензию разливают в ампулы или в пенициллиновые флаконы из нейтрального стекла по 1 мл, замораживают при температуре от минус 20 ºС до минус 70 ºС, затем высушивают на аппарате лиофильной сушки. Остаточная влажность лиофилизированных клеток допустима в пределах 1-6 %. Хранение при температуре минус 70 ºС обеспечивает более длительное хранение

Хранение в условиях криоконсервации [9, 10]

Микроорганизмы выращивают в оптимальных условиях до начала стационарной фазы роста или окончания формирования покоящихся форм на твердой питательной среде, рост должен быть обильным. Для защиты от повреждающего действия низких температур клетки предварительно суспендируют в растворах криопротекторов: глицерин, сахароза, поливинилпирролидон и др. на основе бульона элективной для данной группы микроорганизмов.

Суспензию клеток с высокой плотностью разливают в криопробирки. Затем их помещают в холодильник с температурой минус 70 ºС.

Определение количества жизнеспособных клеток методом предельных разведений [10]

Делаем разведения на физиологическом растворе. В первую пробирку вносят 1 мл начальной взвеси – это 1-ое разведение (10^{-1}), титрование проводят до 10^{-10} степени. Посев производят из каждого разведения или из 4-5 последних разведений на жидкую среду 9К. В каждое разведение высевают по 3-5 параллельных пробирок. Вносят культуру из разведений по 1 мл. Далее инкубация – 30°С. Количество клеток в единице объема рассчитывают по таблице Мак-Креди [10].

Результаты и их обсуждение

Объектами исследования являются бактерии, участвующие в процессах биовыщелачивания железа и серы, а именно *Acidithiobacillus ferrooxidans, Acidithiobacillus ferrivorans* и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans.* Общее число штаммов - 18.

Перед закладкой на хранение была проведена предварительная оценка чистоты микробных культур, изучены их культурально-морфологические свойства.

Микроскопия *Acidithiobacillus* показала - грамотрицательные подвижные палочки с закругленными концами, расположены по одному, по два, видны элементы окисленного железа, культуры без сопутствующей микрофлоры. Штаммы *Sulfobacillus* - грамположительные неподвижные палочки с закругленными концами, обзаруют споры, расположены единично, в цепочках, культуры чистые, видны элементы окисленного железа.

Немаловажным является также показатель жизнеспособности клеток, который определяли на жидкой среде Сильвера и Лундгрена 9К следующего состава (г/л): $(NH_4)_2SO_4$ – 2,0; K_2HPO_4 – 1,0; $MgSO_4$ – 0,5; NaCl – 0,2; $FeSO_4 \times 7H_2O$ – 5,0; pH среды доводят до 2,0 с H_2SO_4 методом предельных разведений.

О росте бактерий судили по помутнению среды и появления белого осадка на дне пробирок. Показатель жизнеспособности составлял 10^{10}. Также рост контролировали микроскопией в препарате «раздавленная капля».

Изученные железоокисляющие и сероокисляющие культуры в дальнейшем были заложены на хранение методом криоконсервации и лиофилизации.

Лиофилизация – способ мягкой сушки веществ, при котором высушиваемый препарат замораживается, а потом помещается в вакуумную камеру, где и происходит возгонка растворителя [9, 11].

При длительном хранении большое значение имеет состав защитных сред, режимы, остаточная влажность.

Защитная среда играет основную роль. Она защищает клетки микроорганизмов от повреждений, поддерживает ее жизнеспособность и сохраняет производственную ценность.

Для лиофилизации отрабатывали две защитные среды (на 100 мл): 1 среда – желатин – 50 г, сахароза – 7,5 г, витамин «С» – 7 г; стерилизация при 2 атм - 15 мин; 2 среда - желатин (6 % раствор) - 2,5 мл, сахароза (10 % раствор) - 0,5 мл, лошадиная сыворотка – 2,5 мл. Раствор желатины стерилизуют трижды текучим паром с перерывом 24, раствор сахарозы – 0,5 атм – 30 мин.

Основной компонент пирит стерилизовали 3 дня при 121°С 20 мин в пенициллиновых флакончиках по 3 г в каждом.

Готовые компоненты суспендировали в один пенициллиновый флакончик общим объемом 2 мл.

Общая схема закладки на лиофилизацию железо- и сероокисляющих культур

микроорганизмов представлена в схеме (рисунок 1).

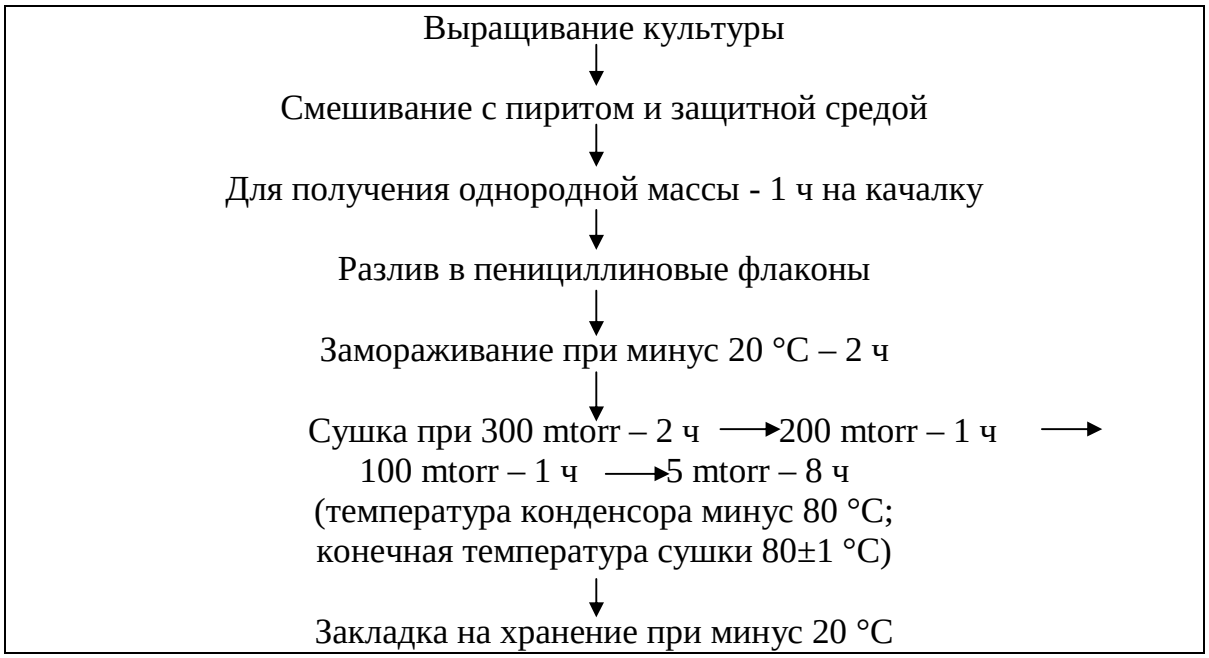

Рисунок 1 – Схема лиофилизации культур микроорганизмов

Культуры выращивали на среде 9К в течение 7-10 суток при 28 °С. Затем соединяли с пиритом из расчета 0,5 г на 1 мл бактериальной взвеси и тщательно перемешивали. После 1 мл культур и 1 мл защитной среды смешивали и вносили в пенициллиновый флакон, замораживали при -20 °С – 2 ч.

Далее проходил сам процесс лиофильного высушивания на аппарате лиофильной сушки BenchTop (Virtis, США) в несколько этапов, что отражено в схеме.

Остаточная влажность лиофилизированных клеток после высушивания составила 4 %, что соответствовало норме. Готовый биоматериал храним при -20 °С. На рисунке 2 показаны лиофильновысушенные во флаконах штаммы железоокисляющих микроорганизмов.

а б

Рисунок 2 - Лиофильновысушенные культуры *A. ferrivorans* на защитной среде № 1 (а) и культуры *A. ferrooxidans* на защитной среде № 2 (б)

Оценка максимального показателя жизнеспособности проводилась на 1 и 3 месяце хранения методом предельных разведений: результаты стабильны, показатель в 10^{10}, при этом образуется осадок белого цвета и происходит окисление железа.

При микроскопии картина сохраняется. Тиобациллы представлены грамотрицательными подвижными палочками с закругленными концами, расположенные по одному, по два, видны элементы окисленного железа, культуры чистые, без сопутствующей микрофлоры.

При микроскопии картина характерна и для сульфобацилл: неподвижные грамположительные палочки с закругленными концами, имеют споры, видны элементы окисленного железа, культуры чистые, без сопутствующей микрофлоры.

Следующим этапом работы был подбор защитных сред для криоконсервации в условиях низких температур.

Криоконсервация – низкотемпературное хранение живых биологических объектов с возможностью восстановления их биологических функций после размораживания [9, 12]. Хранение может осуществляться в низкотемпературных холодильниках (до -80 °С) и в жидком азоте (-196 °С).

Для криоконсервации отрабатывали две защитные среды (на 100 мл): 1 среда - среда, содержащая 60 % питательной среды, 10 % сахарозы, 20 % глицерина, 10 % поливинилпирролидона; стерилизация 0,5 атм - 20 мин. 2 среда - 20 % раствор глицерина и 10 % раствор сахарозы. стерилизация 0,5 атм - 20 мин.

Культуры выращивали на среде 9К в течение 7-10 суток при 28 °С, далее смешивали с пиритом, а затем с защитной средой в соотношении 1:1. Была взята суспензия клеток 0,5 мл и 0,5 мл криосреды с дальнейшим разливом в криопробирки. Замораживание происходило в два этапа: в

морозильной камере при -20 °С, затем при -80 °С. Закладывали на хранение в морозильные камеры при -80 °С.

Оценка показателя жизнеспособности проводилась на 1 и 3 месяце хранения методом предельных разведений: результаты стабильны, показатель в 10^{10}, при этом образуется осадок белого цвета и происходит окисление железа.

При микроскопии картина сохраняется, посторонней микрофлорой контаминации не наблюдается.

Итак, оценка выживаемости бактерий длительными методами хранения показало, что применение данных защитных сред является эффективным. В дальнейшей работе при выборе защитной среды будут сделаны предпосылки на экономическую целесообразность.

Заключение

В результате исследований было выявлено, что штаммы, выращенные с добавлением пирита, сохраняют свою жизнеспособность до 3-х месяцев хранения. Это доказывает эффективность применения данных методов хранения с использованием защитных сред и пирита, который в свою очередь является защитным фактором. Однако для более достоверного результата необходим более длительный промежуток времени для снятия чисел показателя жизнеспособности, что и планируем на 6-м, 9-м и 12-м месяце хранения.

Необходимо, для разъяснения сказать, для чего нами добавляется пирит. Этот компонент способствует сохранению исследуемых нами культур микроорганизмов, являясь естественной средой обитания.

Первоначально нами исследования проводились без добавления пирита. В результате оценки выживаемости микроорганизмов после процесса криоконсервации и лиофилизации сроком хранения от 1 до 3 месяцев показал отрицательный результат, т.е. микробные клетки погибают.

Поэтому нами были отработаны методы криоконсервации и лиофилизации с добавлением в бактериальную взвесь пиритной руды.

Таким образом, при проведении экспериментальных работ нами отработаны методы длительного хранения как лиофилизация и криоконсервация с использованием различных защитных сред для железо- и серокисляющих микроорганизмов. Для устранения гибели клеток необходимо их суспендировать с пиритной рудой, являющейся естественной средой. В процессе оценки показателя жизнеспособности, как основного критерия эффективности методов хранения нами установлено, что данный показатель стабилен.

Список литературы

1 Варданян Н.С. Окисление пирита и халькопирита смешанными культурами сульфобацилл и железо- или сероокисляющих бактерий // Биотехнология. - 2003. - № 6. - С. 64-83.

2 Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф. Литотрофные микроорганизмы окислительных циклов серы и железа // Микробиология. - 2006. - Т. 75, № 5. - С. 625-629.

3 Кузякина Т.И., Хайнасова Т.С., Левенец О.О. Биотехнология извлечения металлов из сульфидных руд // Вестник КРАУНЦ. Науки о земле. - 2008. - № 2. - С. 70-81.

4 Македонова Л.Д., Арутюнов В.И., Кудрякова Т.Л. и др. Подбор защитных сред для лиофильного высушивания бактерий // Тез. Всосоюз. конф. «Вирусы микроорганизмов и растений». – Ташкент ,1986. - С. 203-204.

5 Сулаквелидзе Н.В., Борцов В.Д., Генкин Ю.Б., Старцев И.В. Некоторые аспекты кучного бактериального выщелачивания бедной золотосодержащей руды // Цветные металлы. - 2000. - № 8. - С. 312-329.

6 Тупикина О.В., Рассулов В.А., Кондратьева Т.Ф. Особенности окисления пиритов разными микроорганизмами // Микробиология. - 2009. - Т. 78, № 2 - С. 136-138.

7 Тупикина О.В., Саморукова В.Д., Кондратьева Т.Ф. Особенности роста и окисления природных пиритов представителями ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов // Микробиология. - 2009. - Т. 78, № 2. - С. 200-262.

8 Дубинина Г.А. Изучение экологии железобактерий пресных водоемах // Изв. АН СССР. – Сер. биол. - 1976. - № 4. - С. 322-545.

9 Sören Bellenberg, Robert Barthen, Mariia Boretska, Ruiyong Zhang, Wolfgang Sand, Mario Vera. Manipulation of pyrite colonization and leaching by iron-oxidizing *Acidithiobacillus* species // Appl Microbiol Biotechnol. – 2015. - Vol. 99. – P. 1435–1449. DOI: 10.1007/s00253-014-6180-y

10 Xinping Yang, Shimei Wang, Yujiao Liu, Yuanyuan Zhang. Identification and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* YY2 and its application in the biodesulfurization of coal // Canadian Journal of Microbiology. – 2014. - Vol. 61. – P. 1-7. DOI: 10.1139/cjm-2014-0250

11 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М. и др. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. ВУЗ-ов / Под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Академия. - 2005. – 608 с.

12 Silverman M.P., Lundgren D.G. Studies on the chemoautophic iron bacterium Ferrobacillus ferrooxidans . I. An improved medium and harvesting procedure for securing high cell yields // J. Bacteriol. - 1959. - Vol. 205. - P. 642–647.

Түйін

Мақалада металдардың биосілтісіздендіру процестеріне қатысатын темірді және күкіртті тотықтыратын қасиеті бар микроорганизмдерді

криосақтау және лиофильді кептіру әдістерімен ұзақ уақыт сақтау шарттарының оңтайлы жолдарын табуға бағытталған зерттеулер нәтижелері көрсетілген. Зерттеудің негізгі әдістері пирит негізінде дайындалған қорғау орталарын қолданып криосақтау және лиофильді кептіру болып табылады. Біз желатин, сахароза, глицерин, поливинилпиралидон, аскарбин қышқылы, жылқы сарысуы сияқты қорғау компонентерін қолданамыз. Барлық қорғау орталары эффективті. Сақтау мерзімі ішінде тұрақты болатын өміршеңдік көрсеткіші 10^{10}. Сонымен қатар бөден микрофлорамен ластанбайды, морфо-культуралдық сипаттамасы бір қалыпты болады. Зерттеу нәтижелері коллекцияның жұмысында үлкен рөл атқарады және Республикандық микроорганизмдер коллецкиясының тәжірибелерінде қолданылатын болады.

Түйін сөздер: темірді және күкіртті тотықтыратын қасиеті бар микроорганизмдерді, криосақтау, лиофильді кептіру, қорғау орталары, пирит.

Summary

The article presents the results of a study aimed at finding the optimal conditions long-term storage of cultures of microorganisms with iron-sulfur-oxidizing properties and that are involved in the process of bioleaching of metals. The main methods of research is cryopreservation and lyophilization using protective environments based on pyrite. We apply these protective components such as gelatin, sucrose, glycerol, polivinilpiralidon, ascorbic acid, horse serum. All protective environment effective. Viability index is 10^{10}, which remains stable during storage. At the same morphological and cultural characteristics remain unchanged, foreign microflora contamination does not occur. These results have implications for the development of the collection of the case and will be applied in practice in the Republican collection of microorganisms.

Keywords: iron-sulfur-oxidizing microorganisms and, cryopreservation, lyophilization, protective environment, pyrite.