

# ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

---

УДК 576.8:573.6.086.83

*В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев*

## **МЕТОДЫ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ КОЛЛЕКЦИОННЫХ КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ И ТЕНДЕНЦИИ РАЗВИТИЯ**

*Аннотация.* Представлен критический обзор методов хранения микроорганизмов, практикуемых в международных, национальных, региональных, институтских и университетских коллекциях живых культур. Описаны факторы, значимые на этапе подготовки выбранных для консервации микробных культур и влияющие на исход их хранения. Рассмотрены пути совершенствования методов хранения микроорганизмов, которые могут быть полезными в практической работе.

*Ключевые слова:* микроорганизмы, хранение, методы консервации, криопротекторы, замораживание, высушивание, реактивация.

*Abstract.* There is a critical review of microorganism storage procedures that are commonly used by international, national, local, college and university collections of living cultures. Significant factors for preparing selected microbial cultures to be preserved, and for the storage outcome, are described. Approaches allowing the improvement of available storage procedures to become practically valuable are under consideration.

*Keywords:* microorganisms, storage, conservation procedures, cryo-protectant, freezing, lyophilization, reactivation.

### **Введение**

Несмотря на постоянное углубление наших знаний в области генетики, биохимии, физиологии и экологии микроорганизмов, мы все еще далеки от понимания полной картины о процессах, ответственных за обратимый переход клеток микроорганизмов в анабиотическое состояние. Примерно за 60-летнюю историю активного изучения мира микроорганизмов и создания их коллекций накопились достаточно общие, но все еще не вполне четкие, по нашему мнению, представления по управлению процессами консервации и восстановления жизнеспособности каждого конкретного организма. Сопоставляя количество вновь открываемых или создаваемых рекомбинантных микроорганизмов с весьма немногочисленными приемами их хранения, основанными на общебиологических представлениях о строении и физиологии микробных клеток, становится понятным явное отставание знаний в области конкретных подходов. Объем работ по исследованию структурно-функциональных перестроек клеток микроорганизмов под воздействием факторов консервации-реактивации, интерес к которым начал стремительно расти в 60–70 гг. (вероятно, после нахождения живых микробов во льдах Арктики, а также благодаря растиражированной в прессе и в кинематографии возможности продления жизни с помощью замораживания организмов [1–8]), существенно уменьшился уже в конце 80-х гг. прошлого столетия. Накопленного ба-

гажа знаний в этой области могло, на первый взгляд, оказаться достаточно, чтобы вполне удовлетворительно применять его десятилетиями в практической работе.

Так, весьма богатый опыт работы с коллекциями [9–15] свидетельствует о том, что ряд современных методов консервации оказывается относительно эффективным при поддержании лабораторных культур микроорганизмов. Однако эффективная консервация с полным сохранением популяций и геномов представляет собой проблему, особенно если учесть необычайное физиологическое разнообразие микроорганизмов, а также то, что способность сохранять жизнеспособность в определенных условиях оказывается связана не только с родом и видом микроорганизма, но нередко с его расой [16, 17]. Поэтому, как бы ни был ценен эмпирический опыт по поддержанию культур, актуальной остается и попытка анализа природных процессов, в ходе которых многие микроорганизмы успешно сохраняются в природе, несмотря на весьма жесткие там условия, отнюдь не способствующие активной их жизнедеятельности. Механизмы этих процессов в отдельных более хорошо изученных случаях столь эффективны, что обеспечивают сохранение микроорганизмами жизнеспособности и генетической стабильности в течение весьма длительных сроков [18]. В целом практика консервации, развивавшаяся на протяжении многих десятилетий, эмпирически выработала ряд приемов, в различной степени соответствующих тем механизмам погружения клеток в анабиотическое состояние, которые были выявлены (и продолжают выявляться) при изучении образования, свойств и прорастания специализированных покоящихся клеток микроорганизмов.

Однако, как нам представляется, используются не все возможности, равно как и не все их комбинации. Существующая практика консервации ориентируется обычно на задачу создания по возможности немногочисленных и специализированных приемов, позволяющих перевести в анабиотическое состояние вегетативные клетки разнообразных микроорганизмов.

По современным сведениям, более 99 % микроорганизмов, обитающих в окружающей среде, плохо культивируются в искусственных условиях [19–22]. Это так называемые некультивируемые микроорганизмы, исследование которых сопряжено с необходимостью их сохранения, что предполагает соответствующие работы по выбору условий консервации-реактивации.

В связи с указанным работы по выяснению более четких представлений по управлению процессами консервации и восстановления жизнеспособности конкретных микроорганизмов сохраняют актуальность, внося существенный теоретический и практический вклад в проблему сохранения все увеличивающегося биологического разнообразия. Чтобы сравнить эффективность существующих методов консервации, выявить возникающие проблемы, а также обозначить современные тенденции по совершенствованию методов хранения, целесообразно провести анализ методов консервации микроорганизмов, практикуемых в мире.

Поддержание штаммов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов. В данной работе мы приводим краткий обзор литературы по методам хранения микроорганизмов [12, 15, 23–31], опустив

наиболее очевидные для специалистов детали и больше уделив внимания их критической оценке.

### **1 Методы непродолжительного хранения микроорганизмов**

Методы непродолжительного хранения являются одними из самых простых, не требующих дорогостоящего оборудования и в то же время незаменимых в повседневной работе с микроорганизмами.

#### ***Субкультивирование, или метод перевиваемых культур***

Субкультивирование, или периодический пересев на свежие агаризованные среды, относится к старейшим и давно уже ставшим традиционными методам поддержания и сохранения бактериальных культур как в лабораторных, так и промышленных условиях. Интервал между пересевами зависит от микроорганизма, используемой среды, температурных условий хранения.

*Поддерживающая среда.* Предпочтительнее использовать минимальные среды, поскольку в них процессы метаболизма в микроорганизмах идут с пониженными скоростями и поэтому промежутки между пересевами удлиняются. Однако для роста некоторых бактерий требуются комплексные среды. Или же для сохранения их специфических физиологических свойств необходимо присутствие в среде сложных соединений. При использовании комплексной среды могут потребоваться более частые пересевы, связанные с ускоренным ростом бактерий или накоплением конечного продукта метаболизма.

*Температура хранения.* Допускается хранение культур микроорганизмов при комнатной температуре в закрытом контейнере. Для уменьшения высыхания культур используют пробирки с завинчивающимися крышками или резиновые пробки либо обычные ватно-марлевые пробки, которые обертывают парафином и помещают в полиэтиленовый пакет. Чтобы уменьшить скорости метаболизма микроорганизмов, культуры лучше хранить в бытовом холодильнике при температуре 5–8 °С. Используя эти меры предосторожности, можно сохранять большинство бактерий в течение 3–5 месяцев без пересева [23].

*Режим пересевов.* Частоту пересевов определяют экспериментальным путем, стараясь проводить их как можно реже во избежание селекции вариантов. На случай потери культуры желательно сохранять ее дубликаты. После каждого пересева культуру проверяют на чистоту и периодически проводят сокращенную проверку для выявления каких-либо изменений в фенотипических свойствах бактерий. В пересеваемых культурах не следует выделять единичные колонии, поскольку при этом повышается вероятность селекции мутантов.

*Преимущества и недостатки метода.* Метод периодических пересевов прост в исполнении и используется для многих микроорганизмов. Он общедоступен и позволяет легко контролировать чистоту штаммов [23, 25, 29, 31]. Недостатками же метода являются необходимость соблюдения регламентов пересевов, потребность в большом количестве посуды, питательных сред, значительные затраты времени, риск загрязнения культуры, ошибки при обозначении штаммов или наклеивании неправильной этикетки, случаи селекции, риски потерь культур и т.д. [23, 24, 32–34]. Известны случаи изменения биологических свойств микробных культур и даже их гибель [35]. При час-

тых пересевах штаммы-продуценты из-за спонтанной диссоциации нередко могут терять или снижать способность к выработке целевых продуктов.

#### **Хранение под минеральным маслом**

С помощью этого сравнительно простого и дешевого метода удается весьма успешно сохранять месяцами или даже годами многие виды бактерий. Впервые его применил А. Limier в 1914 г. для поддержания возбудителя гонореи [30]. Для этого метода обычно используют стерильное минеральное масло медицинского назначения (например, вазелиновое масло с удельной плотностью 0,865–0,890 г/см<sup>3</sup>).

*Техника проведения.* Масло стерилизуют в сушильном шкафу при температуре 170 °С в течение 1–2 ч, поскольку автоклавирование для этой цели применять не рекомендуется [23–25]. Культуры выращивают в пробирках – на скошенном питательном агаре (косячках), в толще агаризованной среды (столбиках) или в жидкой питательной среде соответствующего состава. В пробирки с выросшими микроорганизмами стерильно наливают слой минерального масла высотой не менее 2 см (косячки должны быть покрыты полностью). Слой масла служит защитой культур от высыхания, одновременно понижая их метаболизм. Покрытые маслом культуры хранят в вертикальном положении в холодильнике. Для проверки сохранности культур периодически определяют их жизнеспособность. Обычно культуры пересевают 1–2 раза в год на свежую среду. Для этого используют инокуляционные иглы или петли. При обжиге иглы (петли) следует позаботиться о том, чтобы брызги масла не попали на окружающие предметы и персонал. Пересеянные культуры снова покрывают стерильным маслом, а исходные материалы хранят до тех пор, пока не станет ясно, что заложенный на хранение штамм не загрязнен и не изменен.

*Недостатки метода.* Этому методу присущи такие же недостатки, как и обычному субкультивированию. Кроме того, всегда велика вероятность загрязнения и потери штамма вследствие использования нестерильного масла.

#### **Хранение в воде и водно-солевых растворах**

Первые эксперименты по хранению в физиологическом растворе и дистиллированной воде были выполнены с некоторыми видами фитопатогенных бактерий и микроскопических грибов, которые оставались живыми до двух лет, но это было не во всех случаях. Сообщалось также об успешном сохранении бактерий рода *Acinetobacter* и дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae*. Считается, что этот метод применим для большинства микроорганизмов, если их требуется сохранить в течение, например, месяца [29, 30, 31]. Микробные клетки при использовании этого метода переходят в покоящееся состояние – гипобиоз [31].

*Техника проведения.* Клетки с плотностью не более 10<sup>9</sup> КОЕ/мл вносят в пробирку с индифферентной жидкостью с физиологическим ионным составом и подходящим рН. Например, оптимальный рН для месячного сохранения *E. Coli* – 8 ед., для *S. cerevisiae* – 5,5 ед. [30]. Пробирки с инокулятом хранят в холодильнике при температуре 4–8 °С.

*Недостатки метода.* По нашим наблюдениям, велика вероятность загрязнения штаммов вследствие благоприятных условий (влажность и температура) для роста грибной флоры во внутреннем объеме пробирки.

### **Хранение высушиванием на твердых носителях**

Большинство бактериальных культур гибнет при высыхании в лабораторных условиях. Однако некоторые культуры, особенно спорообразующие, если были высушены в подходящих для них носителях, сорбирующих влагу, сохраняются годами [18, 29].

В практике хранения микроорганизмов используются самые разнообразные носители – почва, песок, бумага, смолы, желатин, активный уголь, зерна злаков и многие другие [18, 23, 24, 27–37].

*Почва.* Спорообразующие бактерии можно успешно хранить годами в стерильной почве, высушенной на воздухе. Почву стерилизуют автоклавированием по несколько часов в течение двух дней. Инокулят из суспензии спор (по 1 мл) вносят в пробирку со стерильной почвой и оставляют при комнатной температуре до заметного высыхания. Затем пробирки закрывают стерильными резиновыми пробками и хранят в холодильнике.

Аналогично поступают и при использовании в качестве носителей песка, семян злаковых (например, проса). По данным ряда авторов, культуры актиномицетов, находящихся в стерильной почве, сохраняют жизнеспособность в течение 30 и более лет [32–34].

*Бумага.* Сравнительно простым и недорогим способом хранения бактерий является их высушивание на полосках или дисках стерильной фильтровальной бумаги [23, 24, 27, 37]. Этот метод идеален для обеспечения контроля качества культур. В общей пробирке или в пузырьке с закручивающейся крышкой можно хранить много дисков, содержащих одну и ту же культуру. При необходимости диск достают стерильным пинцетом и в стерильных условиях вносят его в соответствующую питательную среду. Техника этого метода заключается в следующем. Стерильную бумагу пропитывают суспензией бактерий, содержащей не менее  $10^8$  клеток/мл, и высушивают на воздухе или под вакуумом. Бактерии лучше выживают при высушивании под вакуумом. Полоски или диски бумаги хранят в запечатанных пробирках в эксикаторах, которые лучше всего поместить в холодильник.

*Желатина.* Многие гетеротрофные бактерии можно хранить в высушенных каплях или дисках желатины [23, 27–34]. Обычно в таком виде бактерии лучше сохраняются при температуре минус 20 °С, чем при субнулевых и тем более чем при комнатной температуре. Желатиновые культуры готовят следующим образом. Культуры выращивают в подходящих для них средах. Осадок клеток, отделенный центрифугированием в стерильных условиях, ресуспендируют в малом количестве жидкой среды, переносят в пробирку с 2–5 мл расплавленной пищевой желатины и инкубируют при температуре 30 °С до плотности 108–1010 клеток/мл. Затем из пробирки отбирают с помощью стерильной пастеровской пипетки или шприца требуемое количество бактериальной суспензии и раскапывают ее на дно стерильной пластмассовой чашки Петри. Чашку Петри помещают в эксикатор, содержащий пятиокись фосфора, и вакуумируют. Высохшие капли желатины переносят в стерильные пробирки с завинчивающимися крышками и хранят в холодильнике. По мере необходимости хранившиеся микроорганизмы реактивируют и далее инокулируют ими пробирки, содержащие соответствующие питательные среды.

### **Хранение замораживанием при температурах ниже точки кристаллизации воды**

*Обычное замораживание.* От хранения в воде и водно-солевых растворах данный метод отличается тем, что емкости с образцами помещают в морозильную камеру холодильника при температуре от минус 10 до минус 20 °С. Такой простой прием замораживания проб в отличие от обычного нахождения микроорганизмов в водной среде позволяет заметно продлить сохранность штаммов и уменьшить вероятность их загрязнений, что бывает удобно при исследовании большого количества изолятов. Некоторые бактерии при таком способе консервации оставались живыми от 6 месяцев до 2 лет хранения [23, 31], но чаще, как показывает наш опыт работы со штаммами лактобактерий, этот срок ограничивается месяцем для палочковидных форм и составляет до полугода для кокковых форм.

*Недостатки метода.* Такой способ хранения не рекомендуется применять для криочувствительных бактерий из-за их повреждений в эвтектических смесях концентрированных растворов электролитов и высокой вероятности генетического обмена между клетками, что может способствовать неконтролируемой селекции культуры [28, 30, 31, 33, 34, 38].

## **2 Методы длительного хранения микроорганизмов**

Длительное хранение клеток без утраты ценных свойств проводится методами, обеспечивающими существенное торможение протекающих у них жизненных процессов. Это достигается путем глубокого замораживания микроорганизмов или их высушивания из замороженного (лиофилизация) либо непосредственно из жидкого состояния (*L*-высушивание) [9, 10, 12, 23, 24, 28–31, 33, 34, 38–40]. Высокий эффект консервации этими методами достигается тем, что клетки, лишаясь свободной воды в условиях субнулевых и(или) криогенных температур, переходят в состояние анабиоза.

### **Консервация замораживанием при низких температурах**

Практически все известные группы бактерий способны длительно храниться в замороженном состоянии при низких (криогенных) температурах (температуры ниже 120 К, т.е. менее минус 153 °С) [29, 31, 33, 34]. Такую температурную область хранения обеспечивают сжиженные газы – воздух (80 К или минус 193 °С); азот (77,4 К или минус 196 °С); неон (27,1 К или минус 246 °С); водород (20,4 К или минус 256 °С); гелий (4,2 К или минус 269 °С) [41]. Исполняя роль хладагентов, они могут относительно долго оставаться в сосудах Дьюара или сделанных по их принципу специальных хранилищах с хорошей теплоизоляцией. Испаряясь под атмосферным давлением, эти газы в сжиженном состоянии достаточно хорошо поддерживают постоянную температуру нормального кипения каждого из них.

Все же наибольшее практическое распространение для криоконсервации (от греч. *krýos* – холод, мороз, лед) из-за доступности и безопасности получил жидкий азот. Поэтому криоконсервация в жидком азоте или его паре является основным для большинства коллекций культур. Этим методом консервируют самые различные биоматериалы – актиномицеты, бактерии, дрожжи, грибы, вирусы растений и животных, культуры клеток и т.д. В ряде музеев многие бактериальные культуры достаточно успешно хранятся при

температурах, которые обеспечивают современные морозильники или кельвинаторы (обычно до минус 86 °С). При этих температурах хранения скорость отмирания может быть в 1000 раз меньше, чем при минус 10 °С [33].

О востребованности метода криоконсервации биоматериалов свидетельствует достаточно хорошо развитая инфраструктура производства и маркетинга криогенного оборудования, включающего программные замораживатели, хранилища и транспортные резервуары, морозильники, а также различные расходные материалы [42].

#### *Криогенное оборудование*

*Замораживатели.* Для криоконсервации микроорганизмов, как правило, не требуется специальных программных замораживателей (BioArchive [43]), как для клеток эукариотов, клеточных линий и органов.

*Хранилища.* Это специализированное оборудование, выпускаемое различными фирмами [44–55], обеспечивает возможности транспортировки и хранения материалов в жидком азоте.

*Морозильники.* Выпускается множество типов низкотемпературных холодильников, которые успешно применяются для хранения клеточных материалов. Это, например, низкотемпературные морозильники типа Vestfrost VT [48], MDF-U6086S SANYO HVU 586 [49, 50], МШ, МЛ [51], быстрозамораживатель NZKP-48/80 Frigera [52] и др. Однако при этом необходимо помнить, что иногда выключается электропитание сети или выходит из строя компрессор. В таких случаях потерю ценных коллекций помогают предотвратить сигналы предупреждения, а также запасные морозильники или электрические генераторы. Современные морозильники обычно оборудованы аварийной сигнальной системой, работающей на аккумуляторе, а некоторые из них и устройствами аварийной подачи паров жидкого азота или углекислого газа (LN<sub>2</sub> или CO<sub>2</sub>).

#### *Используемые материалы*

*Емкости и принадлежности.* Выпускаются различные виды емкостей для хранения бактерий в жидком азоте. Для этих целей используются толстостенные боросиликатные ампулы с готовыми насечками, полипропиленовые пробирки 38×12,5 мм с завинчивающимися крышками и силиконовыми прокладками производства Greiner bio-one [23, 53]. Из-за увеличивающегося количества консервируемых проб возникла необходимость в уменьшении размеров емкостей для хранения. Компанией Cryo Bio System's (CBS™) предложены соломины с хлопковой и гидрофобной пробкой, специально созданные для хранения биологических образцов в жидком азоте и парах азота, а также в низкотемпературных морозильниках [54, 55]. По безопасности они отвечают стандартам ISO 9002 и FDA. CBS™-соломины поставляются в различных вариантах: 0,3; 0,5 и 1,0 мл со штриховым кодом и без него. CBS™-соломины обеспечивают сохранение изначального качества образцов в ходе процедур разморозки-заморозки. Разделяя первоначальный материал на небольшие аликвоты, хранящиеся в соломинах CBS™, можно размораживать только образцы, необходимые для текущей работы. Поэтому весь материал не подвержен повторяющимся циклам разморозки-заморозки. Благодаря тому, что CBS™ оптимизировала пространство для хранения, увеличение количества образцов не требует дополнительного пространства по сравнению с хранением

ем в больших пробирках. Так, в одну гоблету (контейнер) может помещаться до 168 соломин на 0,5 мл, а в одну канистру – до 6 гоблет, что позволяет хранить более чем 120 000 образцов в одном 600-литровом азотном криохранилище, что отражает четырехкратное увеличение вместимости по сравнению с криопробирками, при этом практически не требуется никаких дополнительных затрат. CBS™-соломины сделаны из материала, устойчивого к длительному хранению при низких температурах. В этой же компании можно приобрести оборудование для автоматического заполнения, запайки, наклейки, маркировки и обрезки соломин (CBS™ PACE, CBS™ SYMS).

*Криопротекторы.* При хранении бактерий в жидком азоте применяют криопротекторы двух типов [23, 24]. К первому относятся глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО), которые легко проходят через клеточную мембрану и обеспечивают как внутриклеточную, так и внеклеточную защиту от замораживания. Ко второму виду криопротекторов относятся такие вещества, как сахароза, лактоза, глюкоза, маннит, сорбит, декстран, поливинилпирролидон и полигликоль, которые обеспечивают защитное действие на наружной поверхности клеточной мембраны. Протекторы первого типа, т.е. глицерин и ДМСО, оказались более эффективными и пригодными для широкого круга бактерий. Выбор криопротектора зависит от вида бактерий. При замораживании новых штаммов следует предварительно проверить действие на них криопротектора. Глицерин и ДМСО обычно добавляют в ростовую среду в концентрации 5–10 %. Глицерин стерилизуют автоклавированием 15 мин при давлении  $10^4$  Па. Стерилизацию ДМСО осуществляют фильтрованием, используя пористые свечи «Села» или установку стерилизующей фильтрации. ДМСО собирают порциями по 10–15 мл в стерильные пробирки и хранят в замороженном состоянии при температуре минус 5 °С (ДМСО замерзает при температуре минус 18 °С).

#### *Техника проведения*

*Подготовка культуры.* Клетки выращивают в соответствующей среде. В случае жидких культур клетки отделяют в стерильных условиях центрифугированием и ресуспендируют осадок в стерильной свежей среде, содержащей или 10 % (объем/объем) глицерина (готовят добавлением 20 % глицерина к равному объему стерильной среды), или 5 % (объем/объем) ДМСО (готовят добавлением соответствующего количества 100 % ДМСО к стерильной среде). В случае роста культур на агаре клетки смывают с его поверхности стерильной жидкой средой, содержащей подходящий криопротектор, гомогенизируют, добиваясь плотности по стандарту мутности не менее  $10^8$  клеток/мл, разливают в ампулы по 0,4 мл суспензии.

*Заполнение емкостей.* Консервируемые пробы разливают в стерильные маркированные емкости, устойчивые к криодеструкции (боросиликатные ампулы, криопробирки, криовials, пластиковые соломинки) [53, 54], герметично закрывают или запаивают.

*Замораживание.* Наилучшие результаты по выживанию и восстановлению бактериальных культур были получены в случае медленного охлаждения клеток, например со скоростью 1 °С/мин [23, 24].

Технология медленного охлаждения следующая [23]:

– ампулы с культурой помещают в алюминиевый контейнер, который вставляют в картонную или пластиковую коробку;

– коробку ставят в морозильную камеру автоматического низкотемпературного холодильника и устанавливают определенную скорость охлаждения;  
– замораживают клетки при контролируемой скорости охлаждения 1 °С/мин до минус 30 °С, а затем при значительно большей скорости (15–30 °С/мин) – до минус 150 °С;

– после достижения этой температуры ампулы переносят в сосуд с жидким азотом и хранят в нем при температуре минус 196 °С или над ним в парах азота при температуре минус 150 °С.

С помощью более современного оборудования, каким, например, является автоматизированная система замораживания и хранения BioArchive [43], пробы консервируют следующим образом:

– клеточный материал, подготовленный к хранению, закладывается в специальные пластиковые контейнеры;

– пластиковые контейнеры помещают в программный замораживатель, где начинается процесс охлаждения по специальной программе, которую можно менять по необходимости.

Процесс происходит в заполненной жидким азотом емкости, по периметру и концентрическим окружностям которой радиально расположены стальные ячейки стандартной формы для крепления образцов, количество которых может достигать 3626 штук.

Извлечение, загрузка образцов осуществляются с помощью механической руки, управляемой компьютером.

Каталогизация образцов ведется с использованием системы штрих-кодов.

Если нет ни программируемого холодильника, ни системы BioArchive, медленного охлаждения проб добиваются следующим путем [23]:

– стеклянные или пластмассовые ампулы с культурой в лотке из нержавеющей стали помещают на 1 ч в морозильник при температуре минус 60 °С;

– затем погружают их на 5 мин в баню с жидким азотом. Скорость охлаждения при этом составляет приблизительно 1,5 °С/мин;

– после этого пробы на хранение погружают непосредственно в жидкий азот (температура минус 196 °С) либо подвешивают в его парах (температура минус 150 °С).

*Оттаивание.* Обнаружено, что быстрое нагревание замороженных микроорганизмов приводит к их быстрому восстановлению [28]. Подобные испытания были проведены с замороженными клетками бактерий из Американской коллекции типовых культур [23, 26]. Чтобы оживить замороженные культуры, их быстро оттаивают на водяной бане при температуре 37 °С и слабом встряхивании, пока не растает весь лед. Если ампулы стеклянные, для этого обычно требуется 40–60 с, а если полипропиленовые, – от 60 до 120 с. Сразу же после оттаивания ампулу извлекают из водяной бани и дезинфицируют ее 70 % этанолом. Ампулу вскрывают и в стерильных условиях переносят культуру в свежую среду.

*Недостаток метода.* Считается, что использование жидкого азота для длительного хранения микроорганизмов обходится очень дорого. Однако данные последних лет об успешном хранении в жидком азоте физиологически разнородных бактерий свидетельствуют о том, что его использование рентабельно, несмотря на относительно высокую стоимость (цена жидкого азота в зависимости от покупаемого объема колеблется от 20 до 47 руб.

за литр) [56]. Метод хранения в жидком азоте по-прежнему популярен, и для его осуществления производятся криохранилища, программные замораживатели и различные аксессуары [44–55, 57].

### ***Консервирование высушиванием из замороженного состояния***

Высушивание из замороженного состояния (лиофилизация, сублимационное высушивание, замораживание-высушивание) – широко распространенный способ высушивания биоматериалов из замороженного состояния, при котором вода испаряется в условиях вакуума без оттаивания льда, что позволяет полностью сохранять первичную структуру объекта сушки. При его использовании многие физиологически разнородные виды бактерий и бактериофаги удается сохранять в жизнеспособном состоянии 30 лет и более [12, 18, 23, 24, 28–32, 40]. Для этого высушенные клетки должны быть защищены от действия кислорода, влаги и света. По лиофилизации микробных культур и биопрепаратов имеются многочисленные разработки [58–67].

*Оборудование.* В зависимости от предназначения высушиваемого биоматериала сублимационные установки делят на два больших класса:

– оборудование для сушки биомедицинских, фармацевтических препаратов;

– для сушки пищевых продуктов [61].

В зависимости от способа размещения биопрепаратов при высушивании различают сублимационные установки коллекторного и камерного типа. В коллекторных установках ампулу, флакон, колбу с биопрепаратом (каждый элемент в отдельности) во время сушки связывают с устройством для улавливания водяных паров (конденсатором) индивидуальным трубопроводом. В камерных установках сосуды с препаратами помещают в общую сушильную камеру, где и осуществляется, как правило, весь цикл высушивания препарата. По принципу работы сублимационные установки подразделяются на периодические, поточно-циклические и установки с непрерывным действием.

Крупнейшие производители сублимационного оборудования – Niro Atlas-Stord Denmark A/S (Дания), Leybold (Германия), Stokes, Virtis (США), Edwards (Великобритания), Kyowa Vacuum Engineering (Япония), Shanghai Tofflon Science and Technology Co., Ltd (Китай). В России сублимационные установки производят НПО «Вакууммаш» (Казань), фирмы «Шабетник и Компания», «Биохиммаш» [68, 69].

*Подготовка культур к сушке.* Успех лиофилизации зависит от качества используемых клеток, от того, насколько они жизнеспособны и в каких условиях выросли [30, 58]. Выращивают достаточно большое количество клеток так, чтобы в суспензии содержалось не менее  $10^8$  клеток/мл. Их собирают в период максимальной стабильности и жизнеспособности культуры, т.е. в поздней экспоненциальной или ранней стационарной фазах роста.

*Защитные среды.* Для подготовки клеток к лиофилизации их суспендируют в среде, содержащей растворы защитных сред. Американская коллекция типовых культур достигла успеха в длительном хранении физиологически различных бактерий, применяя в качестве криопротекторов либо 20 % снятое молоко, либо 12 % раствор сахарозы [23, 24]. Готовят 20 % снятое молоко и стерилизуют его порциями (по 5 мл) в течение 20 мин при температуре 116 °С. Следует избегать перегрева, так как при этом может произойти карамелизация молока. В стерильных условиях собирают клетки, вы-

росшие на поверхности агара, смывая их 20 % обезжиренным молоком. Клетки, выращенные в жидкой культуре, отделяют в стерильных условиях центрифугированием, затем суспендируют осадок в стерильном молоке, чтобы получилась суспензия, содержащая по меньшей мере  $10^6$  клеток/мл. Эту же процедуру применяют и в том случае, когда в качестве криопротектора используется сахароза. В качестве криопротекторов также используют декстран (10 %), лошадиную сыворотку, инозит и другие вещества. В каждую ампулу в зависимости от ее объема наливают от 0,1 до 1 мл суспензии клеток, затем закрывают ватной пробкой и подравнивают ее ножницами. После приготовления суспензии ее следует разлить по ампулам как можно быстрее. Интервал между разливом и процессом лиофилизации должен быть сведен до минимума, чтобы избежать осаждения клеток и других изменений в культуре. Вставляют ватные пробки на глубину приблизительно 1,3 см ниже края ампулы и обжигают их верхнюю часть, чтобы убрать лишние волокна ваты.

**Лиофилизация.** Техника лиофилизации включает следующие процессы и стадии:

- замораживание биоматериалов при температурах ниже эвтектических значений (при которых растворы защитных сред полностью замерзают);
- первичное высушивание, когда вся вымороженная в лед свободная влага сублимируется под воздействием движущих сил – вакуума и подводимой тепловой энергии;
- вторичное высушивание (досушивание), когда удаляется связанная влага под воздействием тех же движущих сил, но с более интенсивным подводом тепла [30, 58, 65].

Считается, что из всех групп микроорганизмов переносят лиофилизацию лучше бактериальные формы [28–31, 62]. По устойчивости к сушке подразделяют бактерии на три группы:

- очень стойкие, такие как представители родов *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Salmonella*, *Bacillus* и т.д. Их жизнеспособность после сушки обычно составляет 70–100 %;
- средне резистентные, например представители родов *Brucella*, *Salmonella*, *Serratia*, *Pseudomonas*. Их выживание достигает 70 %;
- чувствительные к высушиванию – некоторые представители родов *Spirochete*, *Methylobacter*, *Methylococcus*.

**Хранение.** Лиофилизованные культуры хранят при температуре ниже 5 °С. С понижением температуры растет и сохраняемость клеток. При комнатной температуре лиофилизованные культуры хранить не рекомендуется.

**Восстановление (реактивация) культур.** Лиофилизованную культуру переводят в суспензию сразу после вскрытия ампул, добавляя в каждую от 0,3–1,0 мл соответствующей стерильной жидкой среды. Суспензию в ампулах хорошо перемешивают и переносят в пробирки с 5 мл жидкой среды. После тщательного перемешивания отбирают 0,2 мл суспензии и наносят на твердую или полужидкую среду того же состава. Необходимо проверять чистоту культуры до лиофилизации и после нее. Для этого суспензию клеток стерильно разводят и делают посев штрихом на твердые среды. Пробирки и чашки со средой инкубируют при оптимальной для бактерий температуре и, как только начинается их рост, делают пересев на свежую среду, чтобы убедиться в чистоте культуры. Рост бактерий, подвергавшихся лиофилизации,

часто начинается после длительной лаг-фазы. Поэтому нельзя делать заключение о гибели культуры, если инкубация была недостаточно длительной.

*Проверка жизнеспособности бактерий.* Чтобы определить, насколько эффективен процесс высушивания бактерий из замороженного состояния, проверяют их жизнеспособность как до, так и после лиофилизации.

### ***Консервирование высушиванием из жидкого состояния***

В отличие от сушки на носителях высушивание из жидкого состояния (*L*-высушивание) представляет собой вакуумную сушку образцов, находящихся в жидкой фазе (*Liquid*). Это один из сложных методов, используемых для долгосрочного сохранения микроорганизмов [39]. Некоторые микроорганизмы, чувствительные к замораживанию или лиофилизации, могут успешно быть сохранены *L*-высушиванием.

*Подготовка клеток для L-высушивания* [39]. Для высушивания используют клеточную суспензию с плотностью не менее  $10^8$  клеток/мл в подходящей защитной среде. В случае жидких культур клетки собирают стерильным центрифугированием (4000 об/мин, 30 мин) с последующим суспендированием осадка при помощи стеклянных шариков в защитной среде.

*Подготовка стабилизатора-носителя.* В ампулы из нейтрального стекла (45×10 мм) наливают по 0,1 мл 20 % (вес/объем) обезжиренного молока, содержащего 10 % (вес/объем) нейтрального активизированного древесного угля и один из эффективных защитных агентов, таких как 5 % инозит, 5 % глутамат, 5 % раффиноза или 10 % мед. Используемый активизированный уголь должен иметь статус для применения в лекарствах, что не исключает использование любого другого активизированного древесного угля сопоставимого качества. Ампулы неплотно закрывают негигроскопической ватой и стерилизуют при температуре 115 °С около 13 мин.

*Заполнение ампул микробной суспензией.* Готовые ампулы (содержащие тонкий диск стабилизатора-носителя) выдерживают несколько минут при температуре 20–25 °С. В каждую ампулу стерильно вносят около 0,025 мл (одна капля с пипетки Пастера) клеточной суспензии, осторожно капая на тонкий диск, чтобы не коснуться стенок ампулы.

*Высушивание.* Заполненные ампулы быстро ставят на металлический поддон, который переносят в металлическую камеру на водяной бане при температуре 20 °С. После 20–30 мин эквilibрации образцов включают вакуумный насос, который отсасывает влагу из сушильной камеры. При этом влага конденсируется на холодной ловушке (приблизительно минус 35 °С). В технологии сушки из жидкого состояния различают две стадии – первичное и вторичное высушивание.

*Достоинства и недостатки метода.* По мнению некоторых авторов, этот способ высушивания имеет несколько преимуществ перед лиофильным высушиванием и успешно использовался для консервации большой коллекции лабильных микроорганизмов в различных музеях [23, 24, 39]. Однако для *L*-высушивания необходимо специализированное оборудование, позволяющее воспроизводить все параметры, значимые для щадящего обезвоживания микробных клеток.

### ***Защитные средства, используемые при консервации***

Чтобы снизить воздействие множества повреждающих факторов в процессе замораживания биологических структур экспериментальным путем,

были подобраны так называемые защитные вещества, или криопротекторы [5, 10, 15, 18, 24, 28–34, 39, 70]. Этот раздел криобиологии возник на основе изучения естественных моделей защиты клеток, пребывающих в состоянии гипо- и анабиоза. Защитные среды должны отвечать следующим критериям:

- сохранять жизнеспособность, морфологические, биохимические, таксономические и генетические свойства микроорганизмов в процессе консервации и хранения;
- быть нетоксичными;
- иметь хорошую растворимость в воде;
- легко соединяясь с водой, выполнять коагитивные функции;
- иметь низкую температуру эвтектики;
- предотвращать гиперконцентрирование солей в суспензии;
- стабилизировать водородные связи в кристаллической решетке и предотвращать формирование больших кристаллов льда;
- хорошо проникать в клетки (только внутриклеточный механизм криопротекции).

Криопротекторы, согласно точке приложения их действия, разделены на две группы:

1. Внутриклеточные криопротекторы – среды, проникающие в клетки.

2. Внеклеточные криопротекторы – среды, соединяющиеся с внеклеточной водой.

Однако в силу огромного разнообразия встречающихся в природе микроорганизмов одним криопротектором в практической работе не обходятся. Поэтому при криоконсервации новых бактериальных штаммов следует предварительно проверить действие на них различных типов криопротекторов и выбрать подходящий как для данного типа микроорганизмов, так и для условий их последующего хранения. Ниже приведено краткое описание наиболее часто используемых защитных веществ.

*Внутриклеточные протектанты.* Основными защитными средами внутриклеточного действия являются глицерин и диметилсульфоксид.

*Глицерин (глицерол, 1, 2, 3 пропантриол, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>).* Некоторые микроорганизмы (например, *S. rouxii*, *E. coli*, *Ps. Putida*) в природной среде или после введения им дополнительного количества глицерина к питательным средам увеличивают свои синтетические процессы перед переходом в анабиоз. Увеличение концентрации глицерина играет важную роль в стабильности микроорганизмов к обезвоживанию, увеличивает устойчивость клеток при снижении активной воды ( $a_w$ ) и обеспечивает выживаемость в процессе замораживания. Глицерин успешно применен к замораживанию различных микроорганизмов (*Serratia marcescens*, *Erwinia aroideae*, *T4 phag*, *Claviceps sp.*, *Acremonium chrysogenum*, *S. cerevisiae*, *C. utilis* и многих других) с высоким процентом выживаемости и сохранением свойств [28–30].

*Диметилсульфоксид (Dimethylsulphoxid, DMSO, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>SO).* Криопротективные свойства этого вещества зависят от концентрации. Большинство мировых коллекций культур микроорганизмов рекомендует 10 % концентрацию [29–31]. Все же оптимальные концентрации ДМСО, как и глицерина, различаются в зависимости от специфики клеточного материала и могут варьировать в диапазоне от 5 до 20 % [24, 29, 30, 34, 38, 39].

*Внеклеточные защитные средства.* Защитные среды внеклеточного действия пригодны для сохранения биологических объектов как при криоконсервации, так и при сублимационном высушивании.

*Поливинилпирролидон (Polyvinylpyrrolidone, PVP, (-C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>NO-)<sub>n</sub>)*. Есть несколько гипотез о механизмах криопротекции PVP. Согласно одной из них защитный эффект связан с его способностью проникать в клетки по механизму пиноцитоза [30, 70]. Другая гипотеза соотносит механизм защиты со способностью связывать молекулы полимера с клеточной мембраной и формированием внешней оболочки вокруг клетки.

*Гидроксиэтилкрахмал (Hydroxyethyl starch, HES)*. Это нетоксичное, биологически инертное защитное средство. Эти свойства делают HES полезным в качестве плазмозаменяющего и защитного средства для некоторых клеток крови [70].

*Декстран*. Это вещество хорошо известно в медицине в качестве заменителя плазмы крови. Декстран также применяется как криопротектант для сохранения микроорганизмов и вирусов [30]. Декстран химически инертен и поэтому может быть использован в смеси с другими криопротекторами в составе многокомпонентных защитных сред [70]. Для криоконсервации и лиофилизации микроорганизмов применяются, например, различные сахара (сахароза, глюкоза, трегалоза), коллоиды (желатин, агар, пептон, молоко и сыворотки), соли (глутамат натрия) и т.д. Так, использование композитных защитных сред, как показывают экспериментальные исследования и практический опыт, обеспечивает более высокую жизнеспособность микробных клеток в процессе консервации и последующего хранения по сравнению с простыми защитными средами. В практической работе более 60 лет используется ставшая хорошо известной специалистам по лиофилизации сахарозо-желатиновая защитная среда (сахароза 10 % + желатин 1 %), которая подходит как для бактерий, так и для актиномицетов [58]. Другие защитные среды, включающие, например, пептон (0,1–10 %), сахарозу (10 %), лактозу (10 %), трегалозу (10 %), обезжиренное молоко (10–20 %), натрия глутамат (5 %), гидролизат казеина и многие другие вещества, успешно применяются для консервации родов *Bacillus*, *Pantoea*, *Serratia*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Streptococcus* и др. [29, 30, 58].

### **3 Факторы, влияющие на эффективность консервации микроорганизмов**

К основным факторам, влияющим на результаты консервации микробных культур перед сохранением, относят метод культивирования (поверхностный или глубинный), температурный режим, состав и pH питательной среды, аэрацию [28–31, 58, 62, 66]. Также большое значение имеют возраст, физиологическое состояние и концентрация клеток культуры [30, 58, 62, 66, 71–73].

*Питательная среда*. Состав питательной среды отражается на резистентности микробных клеток к воздействию экстремальных факторов. Нет единого мнения относительно того, какую среду использовать для размножения объекта консервации – богатую или бедную. Культивирование на богатых питательных средах рекомендуется в некоторых предписаниях по консервации, так как в данном случае процент жизнеспособных клеток выше. Согласно другим авторам, бедные и со временем истощающиеся питательные компоненты среды являются сигналом для реорганизации метаболизма клеток, что ведет к сохранению их энергии [18, 29]. Клетки, вероятно, готовят себя к гипобиозу, от которого далее переходят в анабиотическое состояние более легко [18]. Правильный выбор питательной среды ведут по белку, углеводу и накоплению липида, что может увеличивать резистентность клеток

к лиофилизации. Например, добавка твин-80 и олеиновой кислоты к мясо-пептонному бульону в процессе культивирования *Ps. denitrificans*, *S. marcescens*, *E. aroideae*, *Acinetobacter calcoaceticus* и т.д. повышает выживаемость клеток после хранения [30].

**Кислотность (pH).** На устойчивость клеток при их консервации оказывает влияние величина кислотности среды культивирования. Хорошо известно, что pH среды культивирования влияет на размножение клеток: есть оптимальный диапазон pH для каждой культуры и рост клеток вне оптимальных значений pH замедлен или вообще отсутствует. Наблюдается корреляция между криорезистентностью пивных и пекарских дрожжей *S. cerevisiae* и кислотностью среды культивирования. При pH 4,2 эти дрожжи растут быстрее, но их выживаемость после лиофилизации минимальная [18, 30, 74].

**Метод культивирования.** Размножение микроорганизмов для последующей консервации может проводиться как в питательном бульоне, так и на поверхности агаризованной среды. В литературе нет четких данных относительно преимущества глубинного или поверхностного способа культивирования по критериям устойчивости микробных клеток к замораживанию/высушиванию и хранению.

**Температурный режим.** Оптимальная температура инкубации для данного микроорганизма обозначена в его базе данных (информационный каталог) и изменяется в некоторых пределах. В базе данных многие штаммы имеют одинаковые температурные границы. Температурный режим молочнокислых бактерий 37–52 °С [75]. Виды *S. cerevisiae* обычно размножают в температурном диапазоне 25–28 °С [18]. В исследованных *S. cerevisiae*, когда их температура культивирования снижалась с 30 до 15 °С, наблюдалось увеличение резистентности клеток. Изучая рост *E. coli* в диапазоне температур 13–46 °С, было установлено, что самый низкий процент биохимических изменений в клетках, а также оптимальная жизнеспособность штаммов наблюдается в диапазоне температур 23–37 °С [18, 30].

**Аэрация.** Установлено, что клетки имеют различную устойчивость к консервации в зависимости от условий аэрирования в процессе культивирования. Для дрожжей, например, аэрация среды выполняет следующие функции:

- обеспечивает необходимым для метаболизма кислородом;
- способствует уравниванию параметров роста клеток по всему объему питательной среды;
- удаляет высвобождаемый жизненно важный CO<sub>2</sub>, что ведет к увеличению устойчивости клеток.

Так, представители видов *S. cerevisiae*, выращенные в аэробных условиях, являются значительно более стойкими к гипо- и гипертоническому стрессу. Анаэробное размножение достоверно уменьшает криорезистентность, что объясняется изменением в структурной организации цитоплазматической мембраны и клетки в целом [18, 30]. Согласно другим авторам, одна из основных причин повреждений клеток при криоконсервации и лиофилизации – действие растворенного в среде кислорода, который окисляет важные для клетки строительные компоненты [71, 74, 76].

**Возраст культуры (физиологическое состояние).** При планировании эксперимента выбор возраста культуры имеет большое значение для того, чтобы получить высокую выживаемость микроорганизма после лиофилизации. Считается, что микроорганизмы являются более стойкими к замораживанию

ванию и обезвоживанию в конце логарифмической стадии роста или в начале стационарной фазы [18, 29, 30, 34, 58, 62, 66, 71–73, 77].

**Концентрация клеток.** Есть различные точки зрения о влиянии концентрации клеток в суспензии на сохранение жизнеспособности штаммов. При изучении корреляции между плотностью популяции и выживанием после лиофилизации *Streptococcus cremoris* было установлено, что с увеличением концентрации с  $10^6$  до  $10^9$  клеток/мл процент выживаемости также увеличивается [30, 31]. Это же характерно и для многих бактериальных видов [29, 58, 72]. С другой стороны, увеличивающаяся концентрация приводит к межклеточным контактам, продукции токсических метаболитов и т.д., что уменьшает жизнеспособность [30]. Для большинства коллекций культур рекомендуется использовать исходные концентрации  $10^8$ – $10^{10}$  клеток/мл [9, 10, 12, 24, 28, 29, 33, 38]. С одной стороны высокая начальная концентрация жизнеспособных клеток увеличивает шанс на сохранение клеток даже на низком уровне их выживания после консервации, с другой – лизированные клетки и клеточные компоненты могут действовать как криопротекторы для целых клеток.

**Эквилибрация.** Эквилибрация, или уравнивание, – первая стадия, связанная с подготовкой микроорганизмов, необходимой для стабилизации клеточных структур до консервации. В процессе эквилибрации возможен ряд биохимических изменений в клетках, оказывающих как положительное, так и отрицательное влияние на метаболические процессы. Клетки проходят через стадию передачи (переноса), которая готовит их к экстремальным условиям консервации (осмотический и температурный шок). Под влиянием стресса, сопровождающего процессы консервации, исходные свойства и характеристики клеток могут быть потеряны, а некоторые микроорганизмы могут даже погибнуть. В целом различные группы микроорганизмов имеют различную устойчивость к стрессорным факторам. Спороформирующие культуры очень хорошо сохраняют жизнеспособность почти при всех методах консервации. Это подтверждает факт, что спорообразование – естественная форма консервации, характеризующаяся также минимальным влагосодержанием в споре. Не образующие спор микроорганизмы менее устойчивы к воздействию низких температур и высушиванию. Также известно, что прокариоты устойчивее эукариот, а грамположительные бактерии – грамотрицательных [28–31, 33, 58, 62]. Для отдельных штаммов одного вида существует различная крио- и ксероустойчивость. Например, когда *S. uvarum* и *S. cerevisiae* были выращены в одних условиях до концентрации  $(2-5) \times 10^8$  клеток/мл и защищены 10 % глицерином и 10 % ДМСО, их жизнеспособность после сохранения в жидком азоте изменялась в довольно широких пределах – от 34 до 100 % [30]. После трех лет хранения в жидком азоте некоторые из штаммов сохранялись неизменно, выживаемость других, однако, существенно снижалась. Следовательно, для сохранения исходных свойств каждой группы микроорганизмов в течение длительного срока необходим индивидуальный подход, включающий процесс предварительной подготовки культуры, выбор метода консервации и последующего восстановления клеток.

#### **4 Пути совершенствования методов консервации**

Совершенствование методов хранения идет по путям оптимизации существующих методов, применения комбинированных методов, а также поиска новых подходов к переводу клеток в состояние покоя. Эти разработки от-

крывают новые перспективы консервации биоматериалов как для научных исследований, так и для практического использования.

*Оптимизация существующих методов консервации.* Даже при консервации весьма хорошо исследованных и достаточно устойчивых к экстремальным факторам окружающей среды микроорганизмов могут периодически возникать проблемы полного сохранения их свойств. Например, при изучении свойств тест-штамма возбудителя сибирской язвы после хранения в растворе глицерина в условиях холодильника наблюдалась гетерогенность популяции по морфологии колоний, снижение терморезистентности спор, возрастание величины  $LD_{50}$  для белых мышей [77]. Пассаж через организм животного, так называемая «анимализация», позволял восстановить исходные свойства штамма *Bacillus anthracis*. Основываясь на сравнительном исследовании методов консервации, связанных с изменением агрегатного состояния клеток (лиофилизация) и не связанных с ним, авторы [77], так и не выявив существенных различий в биологических свойствах штаммов *B. anthracis*, все же отдали предпочтение хранению в 30 % водном растворе глицерина (больше, по-видимому, из практической целесообразности).

Для улучшения сохраняемости различных видов микроорганизмов (включая и грибы рода *Candida*) в физиологическом растворе предлагается в него вводить ненабухаемые в воде волокна (например, капрон, полипропилен, лавсан) в количестве 15–25 г/л [78].

Одна из причин гибели микроорганизмов при криоконсервации и замораживании/высушивании связана с формированием ледяных кристаллов, которые разрывают клеточные стенки [33, 71, 79]. Английский ботаник профессор Феликс Франк из Кембриджа разработал и запатентовал новый способ снижения этих потерь. При использовании его так называемого «способа липидной консервации» клеточный материал замораживается не в водном растворе, а в инертном масле, которое может быть абсорбировано клетками и остается жидким при температурах ниже минус 40 °С [80]. Другие подходы включали применение более эффективных протекторов [81].

*Применение комбинированных методов.* С обнаружением новых видов микроорганизмов или совершенствованием техники выделения ранее не культивируемых в лабораториях возникла необходимость и в совершенствовании техники консервации этих микроорганизмов. Одна из таких работ посвящена, например, разработке методов хранения морских макроорганизмов, на которых оставались бы жизнеспособными их собственные бактерии [82]. С использованием глицериновой среды показана возможность длительного хранения культур строго анаэробных микроорганизмов (кlostридий, ацетогенных и сульфатредуцирующих бактерий, а также метаногенных архей) при температуре минус 70 °С [83].

Joubert и Britz [37] разработали простой и недорогой метод хранения бактериальных культур на бумажных дисках. Такая модификация нацелена в направлении ускорения высушивания клеток под вакуумом и многократной доступности содержимого ампул. Техника, описанная в этой статье, имеет несколько преимуществ перед лиофилизацией: ускоряется процесс высушивания, не требуется дорогостоящее оборудование, имеется хорошая возможность контролировать жизнеспособность микроорганизмов в процессе хранения, а также легкая процедура восстановления консерванта. Этот метод был успешно испытан на 27 различных коллекционных культурах: *Aeromonas*

*hydrophila, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus, Achromobacter zosis, Bacillus sphaericus, Bacillus subtilis, Bacillus brevis, Pseudomonas alcaligenes, Arachnia propionica, Acinetobacter calcoaceticus, Propionibacterium acnes, Chromobacterium violaceum, Escherichia coli, Veillonella parvula, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus faecium, Alcatigenes faecalis, Enterobacter cloacae, Propionibacterium jensenii, Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis, Candida geochares, Desulfomonas pigra, Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris.*

Широкий диапазон бактериальных видов: *Enterobacteriaceae* и *Neisseria*, *Streptococcus*, *Branhamella*, *Haemophilus*, *Gemella*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* и *Bacteroides* – успешно сохранялся на протяжении пяти лет методом лиофильного высушивания на специально приготовленных желатиновых дисках [27]. Желатиновые диски готовятся с использованием обезжиренного молока, аскорбиновой кислоты, декстрозы и угля. Желатин служит носителем микроорганизма. Обезжиренное молоко, аскорбиновая кислота и декстроза защищают микроорганизмы в процессе лиофилизации и хранения. Уголь используется в качестве нейтрализатора токсических веществ, образующихся в процессе лиофилизации.

Весьма эффективным для хранения бактерий и грибов оказался разработанный в нашем центре метод контактно-сорбционного обезвоживания [84–86]. С помощью него уже более 8 лет хранятся штаммы микроскопических грибов. В качестве сорбента влаги использовали ионообменную смолу, которую предварительно сушили при температуре 110 °С в течение 12–14 ч до остаточной влажности менее 1 % и затем фасовали по 1 г в ампулы объемом 6 мл. Заполненные ампулы закрывали ватно-марлевыми пробками, стерилизовали при температуре 110 °С в течение 6–8 ч и затем закрывали стерильными резиновыми пробками. Перед началом работ ампулы с сорбентом влаги охлаждали в течение 1–2 ч при температуре минус 20 °С. Затем на поверхность сорбента наносили 0,1 мл суспензии в защитной среде, содержащей 30 % сахарозы, 3 % глутамата натрия, 1 % тиомочевины и 1 % мясного пептона. Ампулы закрывали и встряхивали, после чего запаивали на газовой горелке. Для перераспределения влаги ампулы выдерживали при комнатной температуре в течение трех суток и после закладывали на хранение при температуре 4 °С. Реактивацию после консервации проводили введением в ампулу физиологического раствора, охлажденного до 2–4 °С, с последующим высевом 0,1 мл содержимого на плотную питательную среду.

*Развитие новых подходов по консервации микроорганизмов.* Феномен торможения жизнедеятельности клеток некоторыми учеными рассматривается как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям, открывающий новые возможности для развития эффективных приемов консервации биоматериалов [18, 87, 88]. В этом направлении предложен метод хранения микроорганизмов введением в питательную среду ультранизких доз селенита натрия, что позволяет, по мнению авторов, не только сохранить все их ценные свойства в течение длительного периода времени без посева, но и снизить затраты материалов, рабочей силы и энергии [88]. Актуальной остается проблема по разработке комплексного подхода к консервации микроорганизмов, учитывающего как известные сведения о процессах, выработанных естественным отбором и способствующим

щих сохранению микроорганизмов в природе, так и эмпирические достижения лабораторного хранения. В близком будущем речь может пойти и об искусственном создании культур микроорганизмов, повышенно приспособленных к сохранению жизнедеятельности в неблагоприятных для вегетативного размножения условиях среды. Успешность лабораторных программ консервации, несомненно, может быть повышена, если будут использоваться популяции клеток, реализующие свойственные им процессы так называемой «самоконсервации» либо индуцированные к этому соответствующими экспериментальными воздействиями [18, 89].

### Список литературы

1. **Шмидт, П. Ю.** Анабиоз / П. Ю. Шмидт. – М. ; Л. : Изд-во АН СССР, 1955. – 436 с.
2. **Рэ, Л.** Консервация жизни холодом : пер. с франц. / Л. Рэ. – М., 1962. – 175 с.
3. **Meyer, G. H.** Viable microorganisms in a fifty-year-old yeast preparation in Antarctica / G. H. Meyer, N. B. Morrow, O. Wyss // *Nature*. – 1962. – V. 196. – № 4854. – P. 598.
4. **Смит, О.** Биологическое действие замораживания и переохлаждения : пер. с англ. / О. Смит. – М., 1963. – 430 с.
5. **Лозина-Лозинский, Л. К.** Очерки по криобиологии. Адаптация и устойчивость организмов и клеток к низким и сверхнизким температурам / Л. К. Лозина-Лозинский. – Л. : Наука, 1972. – 288 с.
6. **Cameron, R. E.** Viable microorganisms from ancient Ross Island and Taylor valley drill core / R. E. Cameron, P. A. Morelli // *Antarctic J. U. S.* – 1974. – V. 9. – № 4. – P. 113–116.
7. **Llano, G.** Antarctic conservation: Prospects and retrospects / G. Llano // *Proc. Colloquium on conservation problem in Antarctica*. – Blacksburg, 1971. – P. 72–74.
8. **Абызов, С. С.** Микробиологические исследования ледниковой толщи Центральной Антарктики / С. С. Абызов, И. Е. Бобин, Б. Б. Кудряшов // *Известия АН СССР*. – 1979. – № 6. – С. 828–836. – (Сер. биол.).
9. **Hubalek, Z.** Liquid nitrogen storage of yeast cultures: 1. Survival and literature review of the preservation of fungi at ultralow temperatures / Z. Hubalek, A. Kockova-Krotocvilova // *Antonie van Leeuwenhoek*. – 1978. – V. 44. – № 2. – P. 229–234.
10. **Rinfret, A. P.** Round Table Conference on the Cryogenic Preservation of Cell Cultures / A. P. Rinfret, B. LaSalle. – Washington, 1975. – P. 1–78.
11. *Культивирование коллекционных штаммов водорослей / под ред. Б. В. Громова.* – Л. : Изд-во ЛГУ, 1983. – 150 с.
12. *American type culture collection methods: 1. Laboratory manual on preservation. Freezing and freeze-drying as applied to algae, bacteria, fungi and protozoa.* – Rockville (Maryland) : ATCC. – 1980. – 51 p.
13. **Dawes, E. A.** Endogenous metabolism and the survival of starved prokaryotes / E. A. Dawes // *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* – 1976. – V. 26. – P. 19–59.
14. **Fortney, K. F.** Stabilization of culture productivity / K. F. Fortney, R. W. Thoma // *Dev. Industr. Microbiol.* – 1977. – V. 18. – P. 319–325.
15. *Maintenance of microorganisms. A manual of laboratory methods / ed. by B. Kirsop, J. Snell.* – L. : Acad. Press, 1984. – 207 p.
16. **Porter, J. N.** Cultural conditions for antibiotic-producing microorganisms // *Methods in enzymology*. – N.Y. : Acad. Press, 1975. – V. 43: Antibiotics. – P. 3–23.
17. **Smith, D.** The preservation and maintenance of living fungi / D. Smith, A. H. S. Onions. – Kew (Richmond) ; Surrey (England) : Commonwealth Mycol. Inst. Publ., 1983. – 51 p.

18. Торможение жизнедеятельности клеток / М. Е. Бекер, А. И. Рапопорт, Л. В. Калакуцкий [и др.]. – Рига : Зинатне, 1987. – 240 с.
19. **Streit, W. R.** Metagenomics – the key to the uncultured microbes / W. R. Streit, R. A. Schmitz // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2004. – V. 7. – № 5. – P. 492–498.
20. **Бузолева, Л. С.** Некультивируемые формы бактерий *Yersinia pseudotuberculosis* при периодическом культивировании / Л. С. Бузолева // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2000. – Т. 129. – № 4. – С. 444–447.
21. **Соколенко, А. В.** Некультивируемые формы патогенных бактерий и здоровье человека / А. В. Соколенко, Е. И. Шиманская // *Валеология.* – 2008. – № 2. – С. 10–21.
22. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://lages-lab.ru/article\\_16.htm](http://lages-lab.ru/article_16.htm)
23. **Герна, Р.** Хранение микроорганизмов // *Методы общей бактериологии* : пер. с англ. / Р. Герна ; под ред. Ф. Герхардта [и др.]. – М. : Мир, 1983. – С. 512–534.
24. **Lapage, S. P.** Culture collections and the preservation of bacteria / S. P. Lapage, J. E. Shelton, T. G. Mitchell, A. R. Mackenzie // *Methods in microbiology.* – L. : Academic Press., 1970. – V. 3A. – P. 135–228.
25. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.y10k.ru/books/detail6140.html>
26. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://6ad.ru/?p=34>
27. **Obara, Y.** Preservation and transportation of bacteria by a simple gelatin disk method / Y. Obara, S. Yamai, T. Nikkawa [et al.] // *J Clin Microbiol.* – 1981. – V. 14. – № 1. – P. 61–66.
28. **Malik, K. A.** Bacterial culture collection: Their importance to biotechnology and microbiology / K. A. Malik, D. Claus // *Biotech. and Genetic Engeneering Rev.* – 1987. – V. 5. – P. 137–197.
29. **Сидякина, Т. М.** Консервация микроорганизмов / Т. М. Сидякина. – Пушкино : ОНТИ НЦБИ, 1985. – 63 с.
30. **Uzunova-Doneva, T.** Anabiosis and conservation of microorganisms / T. Uzunova-Doneva, T. Donev // *Journal of culture collections.* – 2004 ; 2005. – V. 4. – P. 17–28.
31. **Donev, T.** Methods for Conservation of Industrial Microorganisms / T. Donev. – Sofia, 2001. – 93 p.
32. **Фатеева, М. В.** Методы хранения коллекционных культур дрожжей / М. В. Фатеева // *Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов.* – М. : Наука, 1967. – С. 55–90.
33. **Heckly, R. J.** Preservation of microorganisms / R. J. Heckly // *Adv. appl. microbiol. Acad.press Inc.* – 1978. – V. 24. – P. 1–53.
34. **Lapage, S. P.** Preservation of microorganisms / S. P. Lapage, K. F. Redway // *Handb. Microbiol. Clevelend. – Ohio (USA), 1973.* – V. 1. – P. 713–724.
35. **Троицкая, Е. Н.** Сравнение методов хранения культур штаммов *Vac. thuringiensis var. galleriae* / Е. Н. Троицкая // *Прикладная биохимия и микробиология.* – 1979. – Т. 15. – № 3. – С. 402–408.
36. **Звягинцев, Д. Г.** Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями / Д. Г. Звягинцев. – М. : Изд-во МГУ, 1973. – 175 с.
37. **Joubert, W. A.** A simple and inexpensive method for the long-term preservation of microbial cultures / W. A. Joubert, T. J. Britz // *Journal of Microbiological Method.* – 1987. – № 7. – P. 73–76.
38. **Calcott, P. H.** Freezing and thawing microbes / P. H. Calcott // *Patterns of progress. Microbiology.* – England : Meadowfield Press Ltd., 1978. – 68 p.
39. **Malik, K. A.** Liquid-drying of microorganisms using a simple apparatus / K. A. Malik // *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* – 1992. – V. 8. – P. 80–82.
40. **Morgan, C. A.** Preservation of micro-organisms by drying: A review / C. A. Morgan, N. Herman, P. A. White, G. Vesey // *Journal of Microbiological Methods.* – 2006. – V. 66. – № 2. – P. 183–193.

41. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://slovari.yandex.ru/dict/bse/article/00052/70300.htm>
42. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cryocatalog.ru/dewars.html>
43. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.elite-genetix.ru/index.php?module=CMpro&func=viewpage&pageid=145>
44. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://nmv.com.ua/index.php?page=shop.product\\_details&product\\_id=762&flypage=](http://nmv.com.ua/index.php?page=shop.product_details&product_id=762&flypage=)
45. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.kolizey.com.ua/index.php?action=catalog&cat=3&subcat=>
46. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.midural.ru/ekexhibition/medtech/crio/default.htm>
47. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.biolab-ltd.ru/index.htm?/Cryo.htm>
48. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.zamogoz.ru/info.php?goodsspr\\_id=1371](http://www.zamogoz.ru/info.php?goodsspr_id=1371)
49. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.medalians.ru/index.php?section=9&cat=9&gru=202&mod=1464>
50. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.alt.ua/lab/catalog/labsection.php?SECTION\\_ID=2055](http://www.alt.ua/lab/catalog/labsection.php?SECTION_ID=2055)
51. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.laborkomplekt.ru/?page=7&sid=7&srid=96#266>
52. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.euimtex.com/catalog\\_order.php](http://www.euimtex.com/catalog_order.php)
53. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.greinerbioone.com/en/start/>
54. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.irvinesci.com/sub.cfm?sec=3&loc=7>
55. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://yandex.ru/yandsearch?text=Сryo+Bio+System %27s&stpar2= %2Fh0 %2Ftm0 %](http://yandex.ru/yandsearch?text=Сryo+Bio+System+%27s&stpar2=%2Fh0+%2Ftm0%2F)
56. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.cryolaboratory.ru/gas/fluid-nitrogen/>
57. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.niikm.ru/products/nitrogen/liquid\\_nitrogen\\_26/](http://www.niikm.ru/products/nitrogen/liquid_nitrogen_26/)
58. **Бланков, Б. И.** Применение лиофилизации в микробиологии / Б. И. Бланков, В. Л. Клебанов. – М. : Медгиз, 1961. – 282 с.
59. **Карпов, А. М.** Сушка продуктов микробиологического синтеза / А. М. Карпов, А. А. Улумиев. – М., 1982. – 216 с.
60. **Давыдкин, Ю. П.** Экспериментальное изучение движущей силы процесса сублимации / Ю. П. Давыдкин, А. Г. Петухов, В. М. Батарагин, В. Д. Похиленко // Биотехнология. – 1985. – № 6. – С. 110–115.
61. **Белоус, А. М.** Научные основы технологии сублимационного консервирования / А. М. Белоус, Ц. Д. Цветков. – Киев : Наукова думка. – 1985. – 208 с.
62. **Тутова, Э. Г.** Консервация микробиологических препаратов и штаммов-продуцентов / Э. Г. Тутова, М. С. Идельчик. – М. : НИИТЭХИМ, 1986. – Вып. 10 (197). – 84 с.
63. **Тутова, Ф. Г.** Сушка продуктов микробиологического производства / Ф. Г. Тутова, П. С. Куц. – М. : Агропромиздат, 1987. – 303 с.
64. **Зурабова, Э. Р.** Консервация культуры *Vac. thuringiensis* лиофильным методом / Э. Р. Зурабова, Т. П. Круглякова, М. К. Дерганюк // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 1988. – № 5. – С. 36–42.
65. **Давыдкин, Ю. П.** О движущей силе процесса сублимации влаги из различных материалов / Ю. П. Давыдкин, В. Д. Похиленко, В. Ю. Давыдкин, И. Ю. Давыдкин // Системы управления и автоматизации технологических процессов – М. : НИИСЭНТИ, 1993. – Вып. 1. – 40 с.
66. **Волков, В. Я.** К вопросу о физиологических и физико-химических механизмах стабильности микроорганизмов к замораживанию и высушиванию // Микробиология. – 1994. – Т. 63. – Вып. 1. – С. 5–16.

67. **Матвеева, Е. В.** Сохранение генофонда фитопатогенных бактерий методом лиофилизации // *Агро21*. – 2007. – № 10–12. – С. 29–31.
68. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: [http://www.pharmtech.ru/liofil\\_main.htm](http://www.pharmtech.ru/liofil_main.htm)
69. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.freezedry.ru/arts153.html>
70. **Белоус, А. М.** Криоконсерванты / А. М. Белоус, М. И. Шраго, Н. С. Пушкарь. – Киев : Наукова думка, 1979. – 198 с.
71. **Пучков, Е. О.** Проблемы криоконсервации бактериальных культур / Е. О. Пучков, И. Г. Говорунов. – Пушкино : ОНТИ НЦБИ, 1983. – 23 с.
72. Криобиология и биотехнология / А. А. Цуцаева, В. Г. Попов, К. М. Сыткин [и др.] ; под общ. ред. А. А. Цуцаевой. – Киев : Наукова думка, 1987. – 216 с.
73. **Похиленко, В. Д.** Анализ взаимосвязей морфологических параметров микроорганизмов с их выживаемостью после высушивания / В. Д. Похиленко, Ю. П. Давыдкин, Г. П. Нестеренко, В. А. Преснов, В. Н. Герасимов // *Научные основы технологии промышленного производства ветеринарных препаратов: тез. докл. V Всероссийской конф. (г. Щелково, 14–17 мая 1996 г.)*. – Щелково, 1996. – С. 227–228.
74. **Беккер, М. Е.** Анабиоз микроорганизмов / М. Е. Беккер, Б. Э. Дамберг, А. И. Рапопорт. – Рига : Зинатне, 1981. – 247 с.
75. **Hammes, W. P.** The genus *Lactobacillus* / W. P. Hammes, R. F. Vogel // *The genera of Lactic Acid Bacteria*. – L. : Blackie Academic Press., 1995. – P. 19–54.
76. **Рапопорт, А. И.** О разрушении рибонуклеиновых кислот в дрожжевых клетках при их обезвоживании / А. И. Рапопорт, М. Е. Беккер // *Микробиология*. – 1986. – Т. 55. – № 5. – С. 855–857.
77. Методы изучения биологических свойств возбудителя сибирской язвы : учебно-методическое пособие / Л. И. Маринин, И. А. Дятлов, А. Н. Мокриевич [и др.]. – М. : ЗАО МП «Гигиена», 2009. – 304 с.
78. **Пат. 2008348 Российская Федерация, С 12 N1/04, 1994.** Способ хранения культур микроорганизмов / Афиногенов Г. Е., Доморад А. А., Шамолина И. И., Краснова М. В. ; опубл. 28.02.94, Бюл. № 4.
79. **Mazur, P.** Theoretical and experimental effects of cooling and warming velocity on the survival of frozen and thawed cells / P. Mazur // *Cryobiology*. – 1966. – V. 2. – P. 181–192.
80. **Noldechen, A.** Lipid technology protects microorganisms / A. Noldechen // *Bioengineering*. – 1986. – № 3. – P. 44–46.
81. **Патент 2045573 Российская Федерация, С 12 N1/04, 1995.** Состав для хранения бактерий / Плотников О. П., Маркова Л. И., Виноградова Н. А., Харченко В. Г., Казаринова Т. Д. ; опубл. 10.10.95, Бюл. № 28.
82. **Siebert, K.** Evaluation of Methods for Storage of Marine Macroorganisms with Optimal Recovery of Bacteria / K. Siebert, M. Busl, I. Asmus [et al.] // *Appl. environment. Microbial.* – 2004. – V. 70. – № 10. – P. 5912–5915.
83. **Брюханов, А. Л.** Длительное хранение строго анаэробных микроорганизмов в глицерине / А. Л. Брюханов, А. И. Нетрусов // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2006. – Т. 42. – № 2. – С. 2000–2003.
84. **Пат. 1831498 СССР, С 12 N 1/04, 1993.** Способ контактной сушки микроорганизмов / Вирясов С. Н., Перелыгин В. В., Биркина Ю. С. ; опубл. 30.07.93, Бюл. № 20.
85. **Пат. 2067114 Российская Федерация, С 12 N 1/20, 1996.** Способ получения сухого пробиотического препарата / Нахабин И. М., Перелыгин В. В., Биркина Ю. С., Старцев А. В. ; опубл. 27.09.96, Бюл. № 27.
86. **Володина, Л. И.** Формирование коллекции штаммов микромицетов, выделенных преимущественно из насекомых в горных лесных экосистемах западного Кавказа / Л. И. Володина, В. В. Юскевич, В. В. Амельченко [и др.] // *Горные экосистемы и их компоненты : труды междунар. конф.* – М., 2007. – Ч. 1. – С. 3–13.

87. **Феофилова, Е. П.** Торможение жизненной активности как универсальный биохимический механизм адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям / Е. П. Феофилова // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – Т. 39. – № 1. – С. 5–24.
88. **Пат. 2185435 Российская Федерация, С 12 N 1/04, 2001.** Способ хранения культур микроорганизмов / Ильин Д. Ю., Блинохватов А. Ф., Ильина Г. В., Иванов А. И. ; опубл. 20.07.02, Бюл. № 20.
89. **Morgan, C. A.** Preservation of micro-organisms by drying; A review / C. A. Morgan, N. Herman, P. A. White, G. Vesey // Journal of Microbiological Methods. – 2006. – V. 66 (2). – P. 183–193.

---

***Похиленко Виктор Данилович***

доктор технических наук, старший научный сотрудник по специальности «микробиология», ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск)

E-mail: Vpokhil003@yandex.ru

***Pokhilenko Viktor Danilovich***

Doctor of engineering sciences, senior staff scientist specializing in “microbiology”, leading researcher at department of biological technologies, State Research Center of applied microbiology and biotechnology (Moscow Region, Serpukhov District, Obolensk township)

***Баранов Андрей Митрофанович***

кандидат биологических наук, заведующий отделом коллекционных культур, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск)

E-mail: ambaranov@yandex.ru

***Baranov Andrey Mitrofanovich***

Candidate of biological sciences, head of department of collection planting, State Research Center of applied microbiology and biotechnology (Moscow Region, Serpukhov District, Obolensk township)

***Детушев Константин Владимирович***

аспирант, Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск)

E-mail: detushev.obolensk@gmail.com

***Detushev Konstantin Vladimirovich***

Post graduate student, State Research Center of applied microbiology and biotechnology (Moscow Region, Serpukhov District, Obolensk township)

---

УДК 576.8:573.6.086.83

**Похиленко, В. Д.**

**Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития** / В. Д. Похиленко, А. М. Баранов, К. В. Детушев // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2009. – № 4 (12). – С. 99–121.