

---

Научная статья/Research Article

УДК 579.6

DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-54-61

Софья Владимировна Овсянкина<sup>1✉</sup>, Сергей Витальевич Хижняк<sup>2</sup>,  
Полина Александровна Аболенцева<sup>3</sup>, Яна Викторовна Смольникова<sup>4</sup>,  
Елена Николаевна Олейникова<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,4,5</sup>Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

<sup>1</sup>sofi-kras@mail.ru

<sup>2</sup>skhizhnyak@yandex.ru

<sup>3</sup>polina18.ti@gmail.com

<sup>4</sup>ya104@yandex.ru

<sup>5</sup>ovn@kgau.ru

### НОВАЯ ЛИОПРОТЕКТОРНАЯ СРЕДА ДЛЯ ЛИОФИЛИЗАЦИИ НЕСИМБИОТИЧЕСКИХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА БИОУДОБРЕНИЙ

Цель исследования – разработка защитной среды для лиофилизации штамма несимбиотических азотфиксирующих бактерий, выделенного авторами из сельскохозяйственных почв Красноярского края и идентифицированного как *Azotobacter* sp. Штамм инкубировали на модифицированной питательной среде Сабуро при 25 °С в течение 7 сут. После инкубации бактериальные клетки суспендировали в защитных средах и лиофилизировали с использованием лиофилизатора Bio-Rus-4SFD. Использовали три защитные среды: стандартный желатин-сахарозный агар (сахароза 10 %, желатин 1,5, агар 0,01 %), рекомендованный Всероссийской коллекцией микроорганизмов; желатин-сахарозный агар с добавлением 1 % аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта; пептон-сахарозо-глицериновая смесь, разработанная авторами (вода дистиллированная 90 мл, глицерин 10 мл, сахароза 10 г, пептон 3,2 г). В качестве контроля использовали бактериальные клетки, суспендированные в дистиллированной воде без лиопротекторов. Жизнеспособность лиофилизированных клеток оценивали по их способности образовывать микроколонии на агаризованной культуральной среде с помощью фазово-контрастной микроскопии. Жизнеспособность бактериальных клеток после лиофилизации в дистиллированной воде (контроль) составила 8,04 %; после лиофилизации в стандартном желатин-сахарозном агаре – 9,92 %; после лиофилизации в пептон-сахарозо-глицериновой смеси, разработанной авторами, – 12,89 %. Разница между этими защитными средами по жизнеспособности клеток статистически значима на уровне  $P < 0,05$  по критерию хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Жизнеспособных клеток после лиофилизации в желатин-сахарозном агаре с добавлением 1 % аскорбиновой кислоты не обнаружено. Таким образом, разработанная нами защитная среда обеспечивает увеличение доли жизнеспособных клеток при лиофилизации в 1,3 раза в сравнении со стандартным желатин-сахарозным агаром.

**Ключевые слова:** несимбиотические азотфиксирующие бактерии, лиофилизация, защитные среды, биоудобрения

**Для цитирования:** Новая лиопротекторная среда для лиофилизации несимбиотических азотфиксирующих бактерий, перспективных для производства биоудобрений / С.В. Овсянкина [и др.] // Вестник КрасГАУ. 2022. № 12. С. 54–61. DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-54-61.

**Благодарности:** работа выполнена при финансовой поддержке Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в рамках темы «Конструирование защитных сред высушивания и разработка режимов лиофилизации пробиотических и почвенных микроорганизмов».

Sofia Vladimirovna Ovsyankina<sup>1✉</sup>, Sergey Vitalievich Khizhnyak<sup>2</sup>,  
Polina Alexandrovna Abolentseva<sup>3</sup>, Yana Viktorovna Smolnikova<sup>4</sup>, Elena Nikolaevna Oleinikova<sup>5</sup>

<sup>1,2,3,4,5</sup>Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia

<sup>1</sup>sofi-kras@mail.ru

<sup>2</sup>skhizhnyak@yandex.ru

<sup>3</sup>polina18.ti@gmail.com

<sup>4</sup>ya104@yandex.ru

<sup>5</sup>ovn@kgau.ru

## A NEW LIOPROTECTOR MEDIUM FOR LYOPHILIZATION OF NON-SYMBIOTIC NITROGEN-FIXING BACTERIA PROMISING FOR THE BIOFERTILIZERS PRODUCTION

The aim of the study was to develop a protective medium for lyophilization of a strain of non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria isolated by the authors from agricultural soils of the Krasnoyarsk Region and identified as *Azotobacter* sp. The strain was incubated on Sabouraud's modified nutrient medium at 25 °C for 7 days. After incubation, bacterial cells were suspended in protective media and lyophilized using a Bio-Rus-4SFD lyophilizer. Three protective media were used: standard gelatin-sucrose agar (sucrose 10 %, gelatin 1.5, agar 0.01 %), recommended by the All-Russian Collection of Microorganisms; gelatin-sucrose agar with the addition of 1 % ascorbic acid as an antioxidant; peptone-sucrose-glycerol mixture developed by the authors (distilled water 90 ml, glycerol 10 ml, sucrose 10 g, peptone 3.2 g). Bacterial cells suspended in distilled water without lyoprotectors were used as controls. The viability of lyophilized cells was assessed by their ability to form microcolonies on the agar culture medium using phase contrast microscopy. The viability of bacterial cells after lyophilization in distilled water (control) was 8.04%; after lyophilization in standard gelatin-sucrose agar – 9.92 %; after lyophilization in a peptone-sucrose-glycerol mixture developed by the authors – 12.89 %. The difference between these protective media in terms of cell viability is statistically significant at the level of  $P < 0.05$  according to the chi-square test ( $\chi^2$ ). No viable cells were found after lyophilization in gelatin-sucrose agar with the addition of 1% ascorbic acid. Thus, the protective medium developed by us provides an increase in the proportion of viable cells during lyophilization by 1.3 times in comparison with standard gelatin-sucrose agar.

**Keywords:** non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria, lyophilization, protective media, biofertilizers

**For citation:** A new lioprotector medium for lyophilization of non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria promising for the biofertilizers production / S.V. Ovsyankina [et al.] // Bulliten KrasSAU. 2022;(12): 54–61. (In Russ.). DOI: 10.36718/1819-4036-2022-12-54-61.

**Acknowledgments:** the work has been financially supported by the Ministry of Agriculture of the Russian Federation within the framework of the topic "Design of protective drying media and development of lyophilization regimes for probiotic and soil microorganisms."

**Введение.** Одним из важнейших направлений биологизации сельского хозяйства является замена химических удобрений на микробиологические – в первую очередь на биопрепараты на основе азотфиксирующих микроорганизмов [1–3]. При этом при выборе штаммов для производства биопрепаратов предпочтение следует отдавать автохтонным, выделенным из местных почвенных и ризосферных сообществ и, соответственно, эволюционно адаптированных к местным почвенно-климатическим условиям и способным эффективно функционировать в данном сообществе [4].

Ключевой проблемой при практическом использовании штаммов в биотехнологических

процессах, включая производство микробиологических удобрений, является их сохранение в микробиологической коллекции. Сохранение штаммов методом регулярных пересевов на свежую питательную среду, помимо высокой трудоемкости, несет риски утраты штаммом полезных свойств в результате автоселекции, а также контаминации культуры посторонними микроорганизмами. В этой связи наиболее надежным способом длительного сохранения штаммов микроорганизмов в жизнеспособном состоянии является лиофилизация, то есть сублимационное высушивание микробных культур из замороженного состояния [5, 6]. Ключевой и до сих пор нерешенной проблемой лиофилиза-

ции является повреждение микробных клеток на различных стадиях процесса лиофилизации, приводящее к утрате ими жизнеспособности. Для снижения гибели микробных клеток при лиофилизации применяют разнообразные защитные (лиопротективные) среды, состав которых для каждого микроорганизма подбирают эмпирически [7].

В ходе выполнения научно-исследовательской работы по тематическому плану-заданию по заказу Минсельхоза РФ за счет средств федерального бюджета «Разработка комплексного биопрепарата для защиты пшеницы от фузариоза и улучшения обеспеченности пшеницы азотом в условиях Сибири» из почвы местного агроценоза нами был выделен быстрорастущий штамм азотфиксирующих бактерий OSV-2, по совокупности культурально-морфологических свойств идентифицированный как представитель р. *Azotobacter*.

**Цель исследований** – подбор защитной среды для лиофилизации азотфиксирующего штамма OSV-2, обеспечивающей приемлемое с

точки зрения сохранения штамма выживание микробных клеток.

**Задачи:** проверка возможности сохранения жизнеспособности штамма OSV-2 при лиофилизации без использования защитных сред, с использованием стандартных защитных сред; разработка защитной среды, обеспечивающей повышенное выживание клеток в сравнении со стандартными средами.

**Объекты и методы.** Штамм представляет собой аспорогенные граммотрицательные аэробные палочки; при выращивании на жидкой среде в молодой культуре – подвижные. Клетки плеоморфные, от коротких палочковидных до округлых, одиночные, в парах, в тетрадах и в неправильных скоплениях, редко – в коротких цепочках. При старении культуры склонны к образованию слизистой капсулы; клетки под капсулами кокковидные, могут достигать больших размеров; размер палочковидных клеток  $2,6-4,2 \times 2,1-3,5$  мкм; диаметр кокковидных клеток без капсул  $1,8-2,5$  мкм; диаметр кокковидных клеток под капсулами  $2,6-4,0$  мкм (рис. 1).

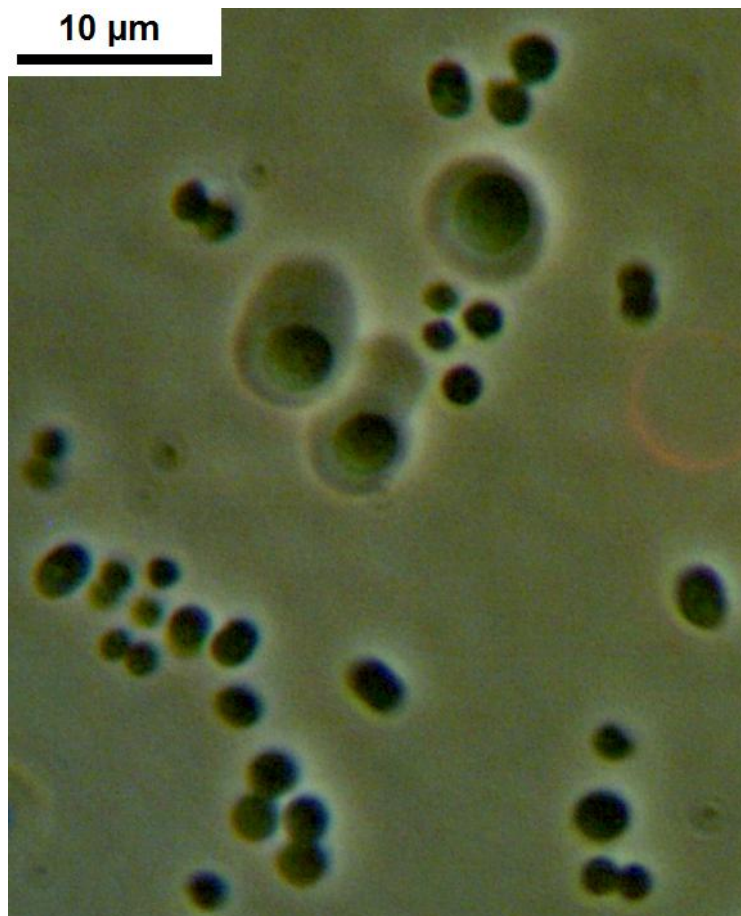


Рис. 1. Клетки штамма OSV-2 (длина масштабной полоски 10 мкм)

Колонии в молодой культуре округлые бесцветные морщинистые, в более старой культуре – бесцветные слизистые.

Штамм хорошо растет на безазотистой среде Эшби с маннитом в качестве источника углерода и с микросолями по Федорову, а также на среде № 2 ГРМ (Сабуро) производства ФБУН ГНЦ ПМБ, разведенной в 2 раза и дополненной агаром до 15–20 г на 1 л среды.

Штамм выращивали в чашках Петри на среде № 2 ГРМ (Сабуро), разведенной в 2 раза и дополненной агаром до 20 г/л при 25 °С в течение 7 сут, после чего суспендировали клетки в одной из защитных сред и лиофилизировали в лиофильной сушилке Bio-Rus-4SFD следующем режиме: стадия замораживания при -36 °С в течение 5 ч; основная сушка при -40 °С в течение 15 ч при давлении 60 Па; вторичная сушка с шагом от 5 до 15 °С при давлении 80 Па в течение 5 ч [8, 9].

В качестве стандартных защитных сред использовали среду Файбича (сахарозо-желатиновый агар) и среду Файбича с 1% аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта [10]. Выбор среды Файбича обусловлен тем, что она широко используется в России в качестве лиопротектора [11] и, в частности, является основной средой для лиофилизации бактерий и дрожжей в крупнейшей

в России по разнообразию поддерживаемых культур Всероссийской коллекции микроорганизмов на базе Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук [12]. В качестве новой защитной среды использовали разработанную авторами на основе анализа литературных данных композицию следующего состава: пептон ферментативный сухой – 3,2 г; сахароза – 10 г; глицерин – 10 мл; вода дистиллированная – 90 мл.

Контролем служили клетки, суспендированные в дистиллированной воде без добавления лиопротекторов.

Определение жизнеспособности выживших клеток проводили прямым методом. Суспензию лиофилизированных клеток наносили на агаризованную питательную среду и инкубировали при температуре 25 °С. После 12 ч инкубирования определяли соотношение выживших и мертвых клеток с помощью фазово-контрастной микроскопии *in situ* с последующим подтверждением способности клеток к формированию микроколоний через 24 и 36 ч инкубирования после посева (рис. 2). Долю выживших клеток определяли как отношение числа микроколоний к сумме погибших клеток и микроколоний на поверхности среды.

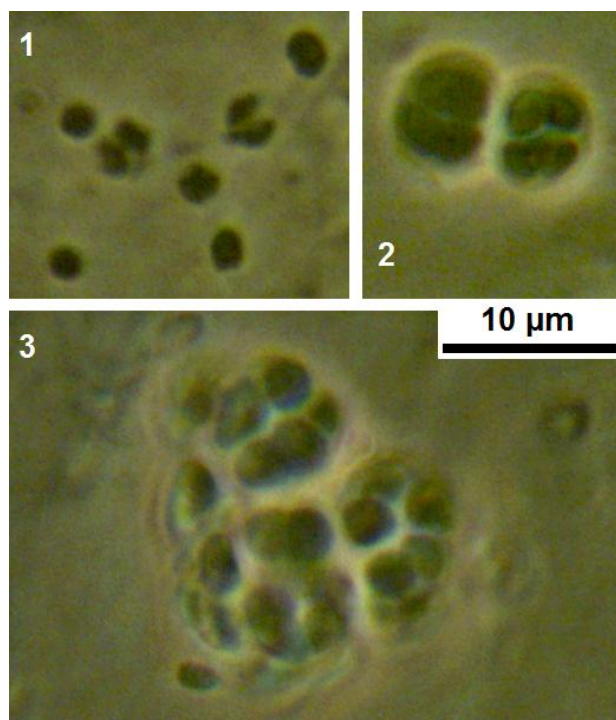


Рис. 2. Погибшие (1), выжившие (2) при лиофилизации клетки и формирование микроколонии (3) выжившими при лиофилизации клетками азотфиксирующего штамма; длина масштабной полоски 10 мкм

**Результаты и их обсуждение.** Максимальное выживание клеток изучаемого штамма (12,89 %) отмечено при использовании разработанной авторами композиции на основе пепто-

на, сахарозы и глицерина. На втором месте по выживаемости – среда Файбича (9,92 %), на третьем – контроль без лиопротекторов (8,04 %) (рис. 3).

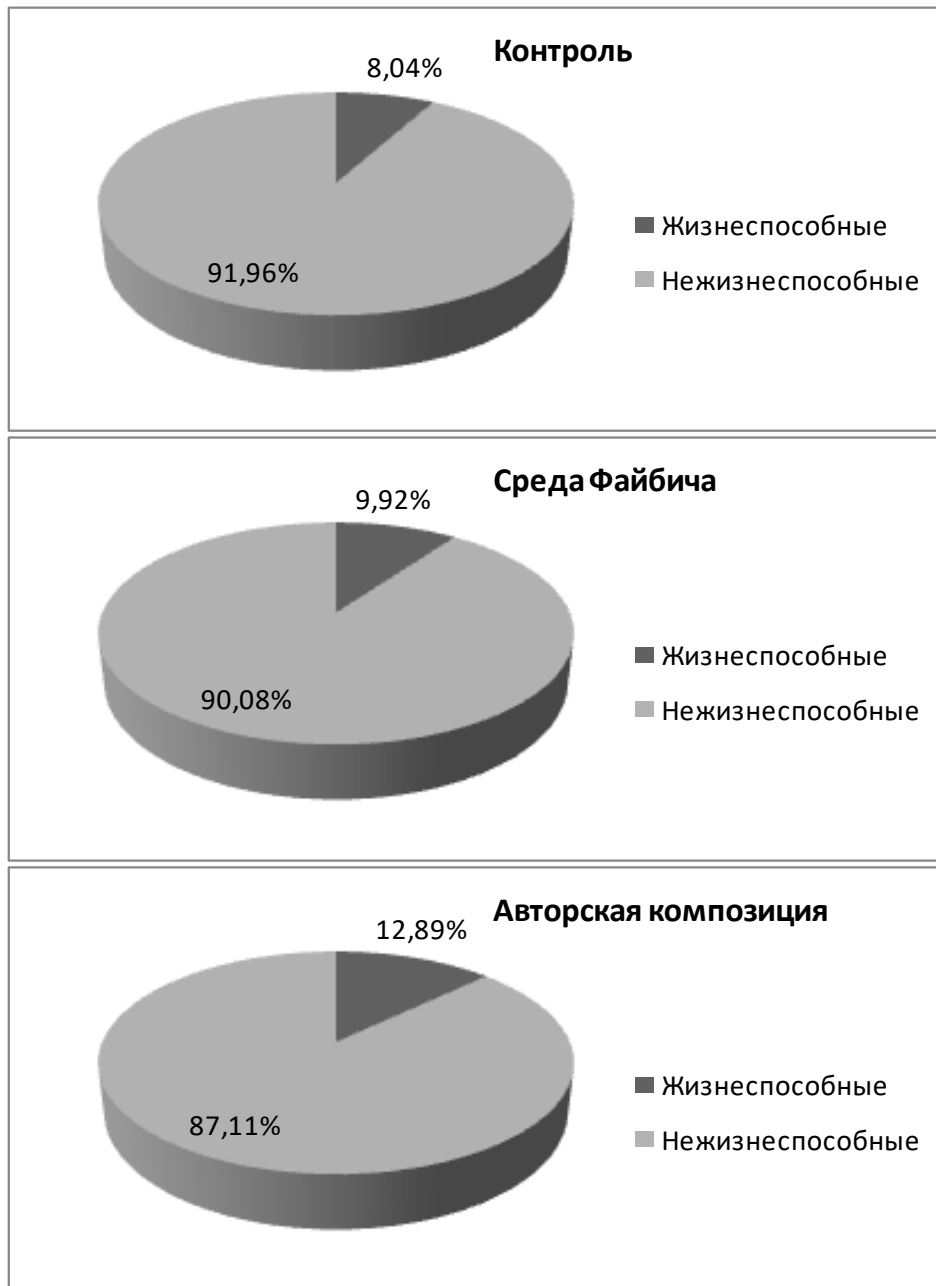


Рис. 3. Выживаемость клеток азотфиксирующего штамма при лиофилизации с использованием защитных сред

Статистическая значимость различий между указанными вариантами по выживаемости клеток, согласно тесту  $\chi^2$ , составляет  $p < 0,05$ .

В противоположность указанным вариантам в варианте с использованием среды Файбича с 1 % аскорбиновой кислотой выживших клеток не обнаружено (рис. 4).

При дальнейшем инкубировании микроколони в вариантах, лиофилизированных без лиопротекторов (контроль), а также при использовании в качестве защитных сред среды Файбича и авторской композиции, нормально развивались; в варианте со средой Файбича с 1% аскорбиновой кислоты рост отсутствовал (рис. 5).

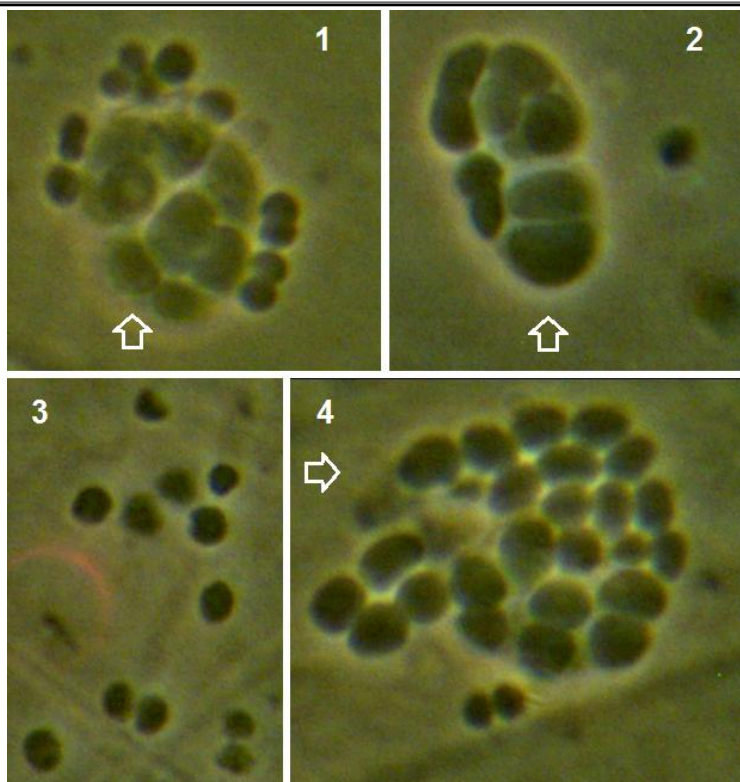


Рис. 4. Характерный вид культуры на питательной среде после лиофилизации с использованием разных защитных сред: 1 – контроль; 2 – среда Файбича; 3 – среда Файбича с аскорбиновой кислотой; 4 – авторская композиция; видны одиночные нежизнеспособные клетки и микроколонии (показаны стрелками)

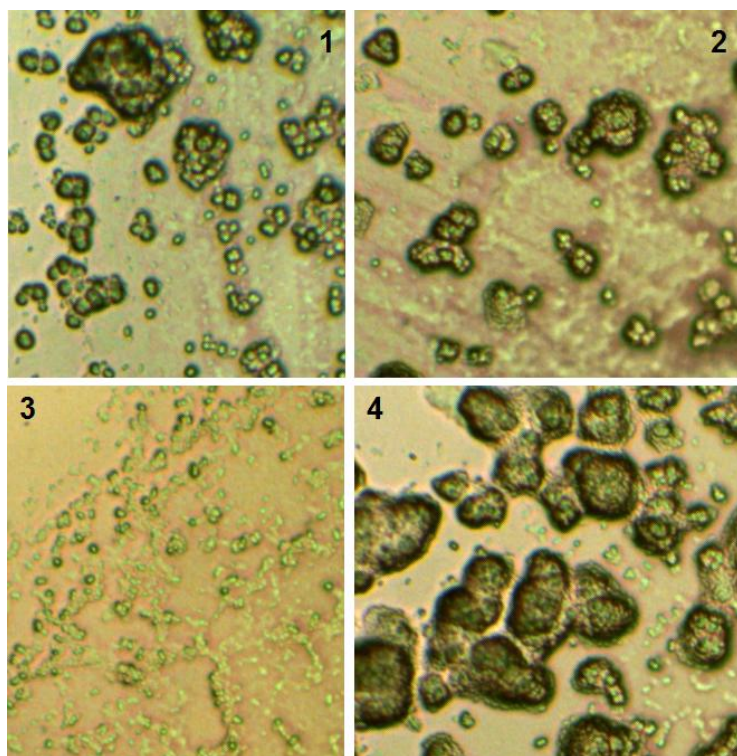


Рис. 5. Характерный вид культуры на питательной среде после лиофилизации с использованием разных защитных сред после 36 ч инкубирования: 1 – контроль, 2 – среда Файбича, 3 – среда Файбича с аскорбиновой кислотой, 4 – авторская композиция

Таким образом, разработанный нами состав защитной среды обеспечивает при лиофилизации повышение выживаемости несимбиотического азотфиксирующего штамма, перспективного для применения в качестве микробиологического удобрения в условиях Сибири, в 1,3 раза в сравнении со стандартной защитной средой Файбича.

Следует отметить, что достигнутая нами выживаемость клеток (12,89 %) при лиофилизации может считаться очень хорошим показателем. Известно, что бактерии, образующие полисахаридную капсулу (к которым относится и использованный в работе штамм *Azotobacter* sp.), плохо переносят лиофилизацию. Так, максимальное число выживших после лиофилизации с использованием желатин-сахарозной, молочно-глюкозной и молочной защитных сред клеток у разных штаммов *Azotobacter chroococcum* варьировало от  $8,0 \times 10^3$  до  $1,2 \times 10^6$  при стартовой численности суспензии  $10^9$ – $10^{10}$  клеток, то есть максимальная выживаемость не превышала 0,1 % [13]. Есть основания полагать, что дальнейшая оптимизация разработанной нами смеси на основе пептона, сахарозы и глицерина позволит дополнительно усилить ее лиопротекторные свойства.

### Заключение

1. Разработанная нами лиопротекторная композиция на основе пептона, сахарозы и глицерина применительно к изучаемому штамму *Azotobacter* sp. по своим защитным свойствам в 1,3 раза превышает рекомендованную Всероссийской коллекцией микроорганизмов среду Файбича.

2. Введение в среду Файбича 1 % аскорбиновой кислоты в качестве антиоксиданта, в соответствии с рекомендациями М.М. Файбича, ведет к полной гибели клеток изучаемого штамма при лиофилизации.

### Список источников

1. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture / A. Soumare [et al.] // *Plants*. 2020. Vol. 9, № 8. DOI: 10.3390/plants9081011.
2. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability / A. Aasfar [et al.] // *Front. Microbiol.* 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628379.
3. Biofertilizer: the future of food security and food safety / A.I. Daniel [et al.] // *Microorgan-*

- isms. 2022. Vol. 10, № 6. P. 1220. DOI: 10.3390/microorganisms10061220.
4. Microbial community and function-based synthetic bioinoculants: a perspective for sustainable agriculture / A. Suman [et al.] // *Front. Microbiol.* 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2021.805498.
5. Adams J. The principles of freeze-drying // *Methods Mol. Biol.* 2007. Vol. 368. P. 15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2\_2.
6. Stacey J.N., Day J. Long-term ex-situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers // *Methods Mol. Biol.* 2007. Vol. 368. P. 1–14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2\_1.
7. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы поврежденной бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016. № 3. С. 5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.
8. Impact of the fermentation parameters pH and temperature on stress resilience of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 / A. Hernandez [et al.] // *AMB Expr.* 2019. Vol. 9. № 66. DOI: 10.1186/s13568-019-0789-2.
9. Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide / H.S. Nasran [et al.] // *Molecules*. 2020. Vol. 25, № 11. DOI: 10.3390/molecules25112618.
10. Файбич М.М. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 1968. № 2. С. 59–66.
11. Охалкина В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Ч. 2. Лиофилизация // *Теоретическая и прикладная экология*. 2009. № 4. С. 21–32.
12. Стандартная операционная процедура по лиофилизации культур ВКМ с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки / сост. С.М. Озерская, Е.О. Пучков, Н.Е. Иванушкина. Пуццоно, 2011.
13. Куплетская М.Б., Непрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения // *Микробиология*. 2011. Т. 80, № 6. С. 842–846.

### References

1. Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture / A. Soumare [et al.] // *Plants*. 2020. Vol. 9, № 8. DOI: 10.3390/plants9081011.
2. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and

- yield stability / A. Aasfar [et al.] // Front. Microbiol. 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.628379.
3. Biofertilizer: the future of food security and food safety / A.I. Daniel [et al.] // Microorganisms. 2022. Vol. 10, № 6. P. 1220. DOI: 10.3390/microorganisms10061220.
  4. Microbial community and function-based synthetic bioinoculants: a perspective for sustainable agriculture / A. Suman [et al.] // Front. Microbiol. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2021.805498.
  5. Adams J. The principles of freeze-drying // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 368. P. 15–38. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2\_2.
  6. Stacey J.N., Day J. Long-term ex-situ conservation of biological resources and the role of biological resource centers // Methods Mol. Biol. 2007. Vol. 368. P. 1–14. DOI: 10.1007/978-1-59745-362-2\_1.
  7. Gracheva I.V., Osin A.V. Механизмы повреждения бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 3. С. 5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.
  8. Impact of the fermentation parameters pH and temperature on stress resilience of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 / A. Hernandez [et al.] // AMB Expr. 2019. Vol. 9. № 66. DOI: 10.1186/s13568-019-0789-2.
  9. Optimization of protective agents for the freeze-drying of *Paenibacillus polymyxa* Kp10 as a potential biofungicide / H.S. Nasran [et al.] // Molecules. 2020. Vol. 25, № 11. DOI: 10.3390/molecules25112618.
  10. Fajbich M.M. Стабилизация вакцинных препаратов в процессе высушивания и хранения // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1968. № 2. С. 59–66.
  11. Охупкина В.Ю. Методы поддержания микробных культур. Ч. 2. Лиофилизация // Теоретическая и прикладная экология. 2009. № 4. С. 21–32.
  12. Стандартная операционная процедура по лиофилизации культур VKM с использованием разных режимов первичной и вторичной сушки / сост. S.M. Ozerskaya, E.O. Puchkov, N.E. Ivanushkina. Puschino, 2011.
  13. Kupletskaya M.B., Netrusov A.I. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения // Микробиология. 2011. Т. 80, № 6. С. 842–846.

Статья принята к публикации 17.10.2022 / The article accepted for publication 17.10.2022.

Информация об авторах:

**Софья Владимировна Овсянкина**<sup>1</sup>, заведующая межкафедральной научно-инновационной лабораторией сельскохозяйственной и экологической биотехнологии ИАЭТ, кандидат биологических наук

**Сергей Витальевич Хижняк**<sup>2</sup>, профессор кафедры экологии и природопользования, доктор биологических наук, доцент

**Полина Александровна Аболенцева**<sup>3</sup>, научный сотрудник лаборатории селекции и оригинального семеноводства

**Яна Викторовна Смольникова**<sup>4</sup>, доцент кафедры технологии консервирования и пищевой биотехнологии, кандидат технических наук

**Елена Николаевна Олейникова**<sup>5</sup>, главный специалист управления науки и инновациями

Information about the authors:

**Sofia Vladimirovna Ovsyankina**<sup>1</sup>, Head of the Interdepartmental Scientific and Innovation Laboratory of Agricultural and Environmental Biotechnology of the IAET, Candidate of Biological Sciences

**Sergey Vitalievich Khizhnyak**<sup>2</sup>, Professor at the Department of Ecology and Nature Management, Doctor of Biological Sciences, Associate Professor

**Polina Alexandrovna Abolentseva**<sup>3</sup>, Researcher, Laboratory of Breeding and Original Seed Production

**Yana Viktorovna Smolnikova**<sup>4</sup>, Associate Professor at the Department of Canning Technology and Food Biotechnology, Candidate of Technical Sciences

**Elena Nikolaevna Oleinikova**<sup>5</sup>, Chief Specialist at Science and Innovation Department