

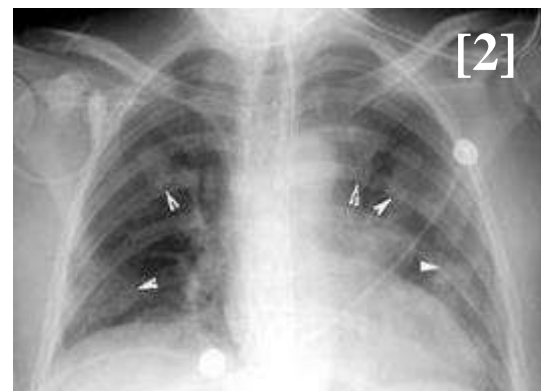
Методы хранения тропических микроскопических грибов

Научный руководитель
вед.н.с., д.б.н. Александрова А.В.
Выполнила студентка IV курса
Сайнчук А.Д.

Москва, 2019

Актуальность работы

- Микروмицеты играют важную роль в биосфере, науке, медицине, промышленности
- Коллекции культур являются источником объектов и информации для научной работы, фармакологии, пищевой промышленности и прочих отраслей деятельности
- Аналогичные исследования на макромицетах показали, что для хранения тропические виды требуют особого подхода (Croan et al., 1999)
- Исследование направлено на выявление наиболее оптимальных для хранения вариаций методов



Цель:

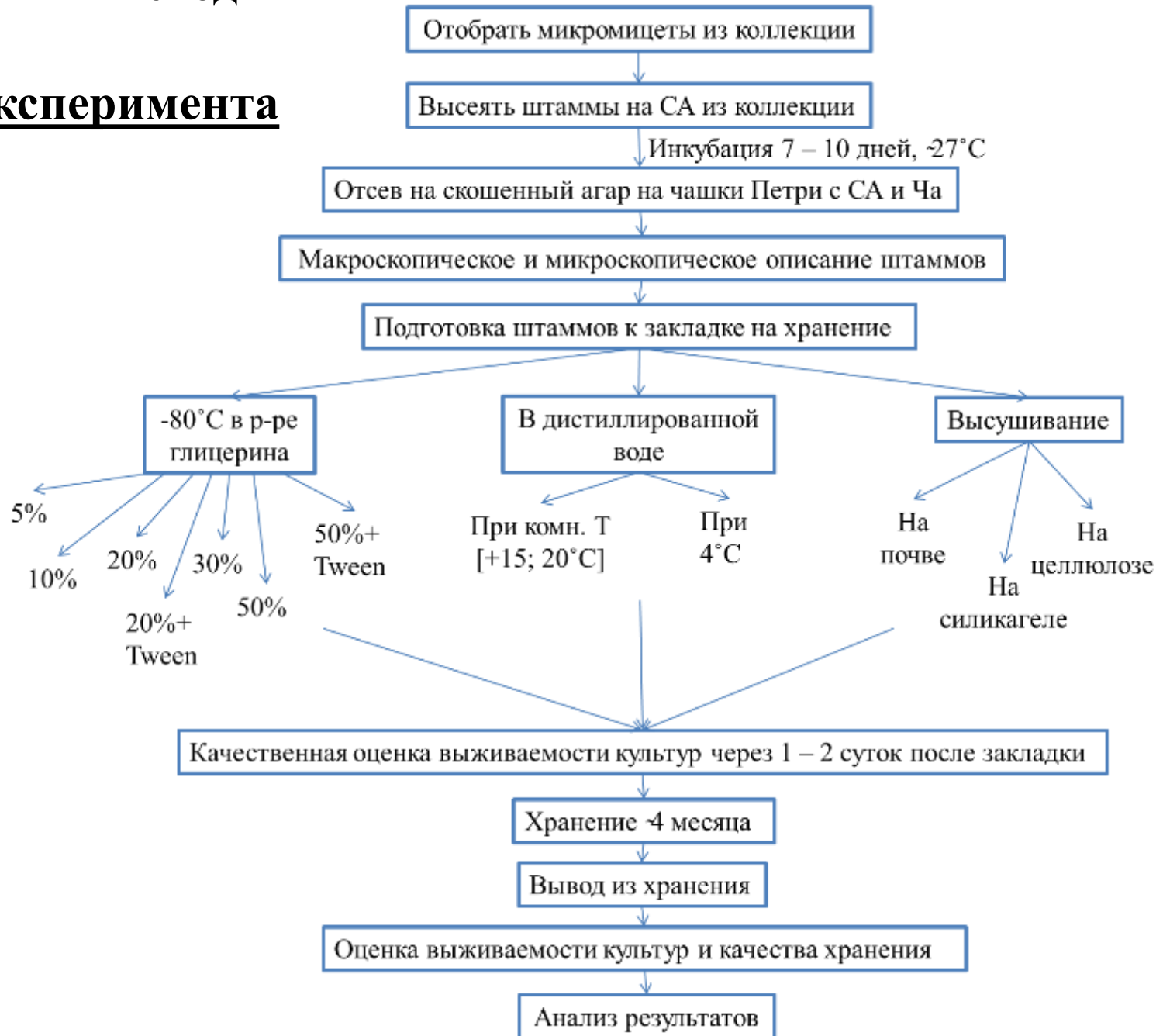
Исследование наиболее оптимальных вариаций различных методов хранения культур микромицетов, выделенных из тропических регионов.

Задачи:

- Создать рабочую коллекцию штаммов
- Описать культуральные и микроморфологические признаки объектов до помещения их на хранение (чтобы иметь возможность отследить культуральные и микроморфологические изменения после длительного периода хранения);
- Поместить культуры на хранение методом:
 - заморозки (-80°C) в 5%, 10%, 20%, 30% и 50% растворе глицерина и 2 вариации 20% и 50% с добавлением Tween 20
 - в дистиллированной воде при комнатной температуре [$+15^{\circ}$; $+20^{\circ}\text{C}$] и при 4°C ;
 - высушивания на стерильной почве, силикагеле, целлюлозе
- Проанализировать полученные данные
- Оценить качество длительного хранения культур из кафедральной коллекции, хранящихся в высушенном состоянии на целлюлозе и на скошенном агаре и методом лиофилизации

Материалы и методы

Дизайн эксперимента

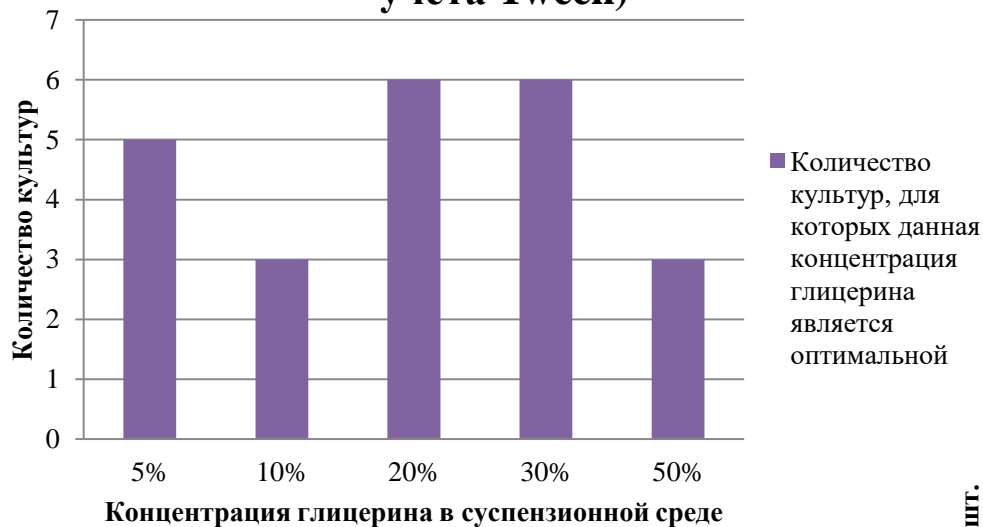


Результаты и обсуждение

Метод хранения при -80°C



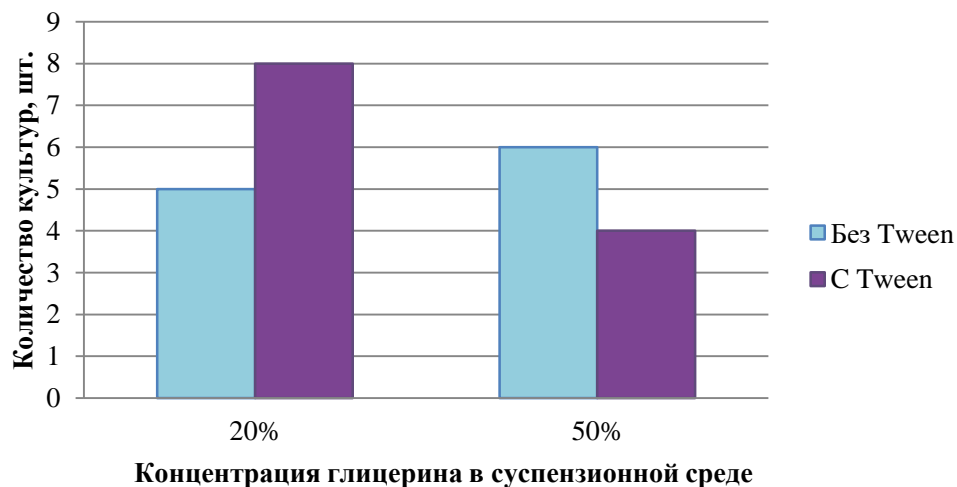
Оптимальная концентрация глицерина в суспензионной среде для хранения (без учета Tween)



Добавление Tween в суспензионную среду с 20%-ым содержанием глицерина положительно повлияло на выживаемость конидий культур.

По соотношению количества КОЕ культур, выведенных из хранения, к исходному (до закладки на хранение) 20% и 30%-ый растворы глицерина оказались наиболее оптимальными.

Влияние Tween на хранение микромицетов



Хранение в дистиллированной воде

Таб.1 Оценка в баллах качества хранения культур в воде при разных температурах (сумма дает итоговую оценку, позволяющую сравнивать вариации метода и виды между собой)

	+4°	[15°; 20°]	Сумма
<i>Cochliobolus geniculatus</i> (У)	2	1	3
<i>Cephalotrichum heliciforme</i>	3	2	5
<i>Cochliobolus geniculatus</i> (Т)	3	2	5
<i>Spegazzinia flabellata</i>	2	3	5
<i>Yunnania carbonaria</i>	3	3	6
<i>Cordana terrestris</i>	3	3	6
<i>Brevistachys subsimplex</i>	0	0	0
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	3	3	6
<i>Xenoacremonium</i> sp.	3	3	6
<i>Geosmithia langdonii</i>	2	3	5
<i>Leptographium lundbergii</i>	3	3	6
Сумма (итоговая оценка)	27	26	

Обозначения:

3 – чистая культура

2 – незначительная задержка начала роста культуры

1 – слабый рост, видоизмененная культура

0 – культура не дала роста

- После выведения из хранения культура *Brevistachys subsimplex* не дала роста;
- Лучше всего сохранились *Yunnania carbonaria*, *Cordana terrestris*, *Ceratocystis paradoxa*, *Xenoacremonium* sp. и *Leptographium lundbergii*.

Статистическая обработка (критерий Уилкоксона):

$$T(125) > T_{\alpha; 11; 11} = 96$$

Хранение в высушенном состоянии на разных носителях

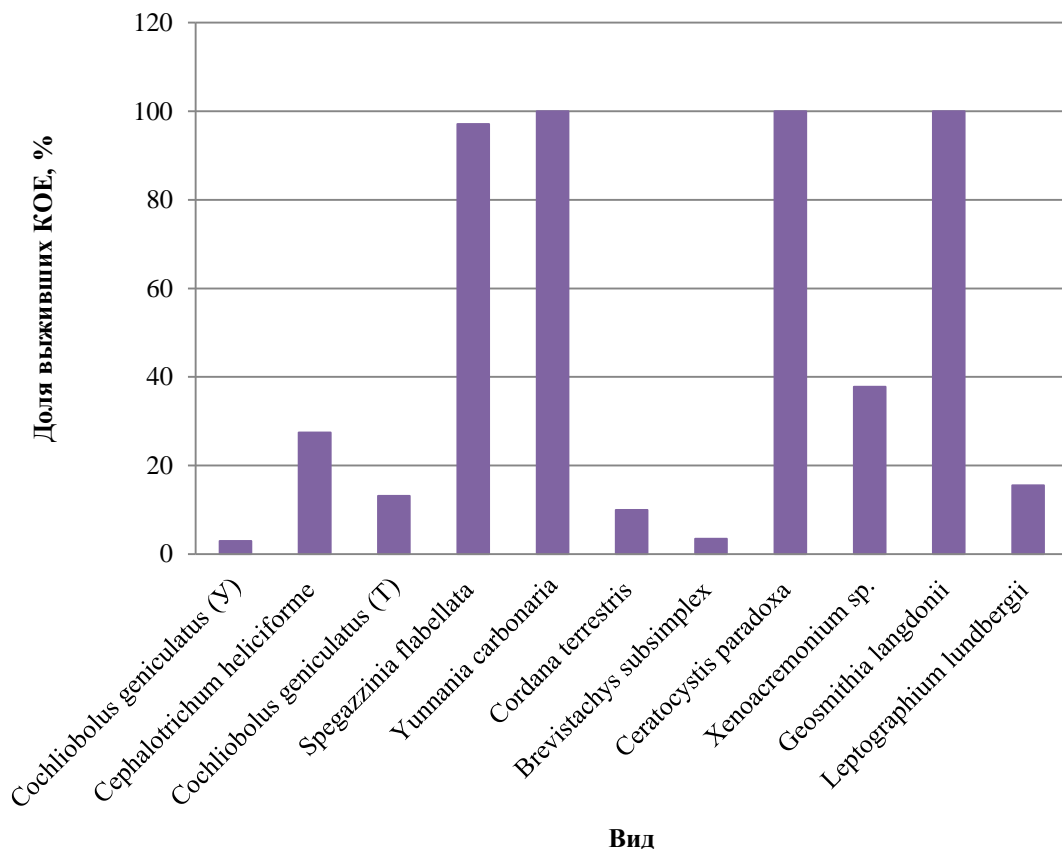
Таб.2 Оценка в баллах качества хранения культур в высушенном состоянии на разных субстратах (сумма дает итоговую оценку, позволяющую сравнивать вариации метода и виды между собой)

	Силикагель	Почва	Целлюлоза	Сумма
<i>Cochliobolus geniculatus</i> (У)	2	3	3	8
<i>Cephalotrichum heliciforme</i>	3	2	2	7
<i>Cochliobolus geniculatus</i> (Т)	3	3	3	9
<i>Spegazzinia flabellata</i>	3	3	3	9
<i>Yunnania carbonaria</i>	3	3	2	8
<i>Cordana terrestris</i>	2	3	2	7
<i>Brevistachys subsimplex</i>	2	3	1	6
<i>Ceratocystis paradoxa</i>	3	3	3	9
<i>Xenoacremonium</i> sp.	3	3	3	9
<i>Geosmithia langdonii</i>	3	3	2	8
<i>Leptographium lundbergii</i>	3	3	1	7
Сумма (итоговая оценка)	30	32	25	

- Минимальную сумму баллов за хранение набрала культура *Brevistachys subsimplex*
- Максимальную – *Spegazzinia flabellata*, *Cochliobolus geniculatus* (Т), *Xenoacremonium* sp. и *Ceratocystis paradoxa*

Хранение в высушенном состоянии на силикагеле

Доля выживших КОЕ после периода хранения на силикагеле



- По результатам вывода из хранения на силикагеле выживаемость 4-х культур оказалась близка к 100%
- Низкая выживаемость была отмечена для *Cochliobolus geniculatus* (Y) и *Brevistachys subsimplex*

Статистическая обработка (критерий Уилкоксона):

– силикагель и почва

$$T(126) > T_{0,05; 11; 11} = 96$$

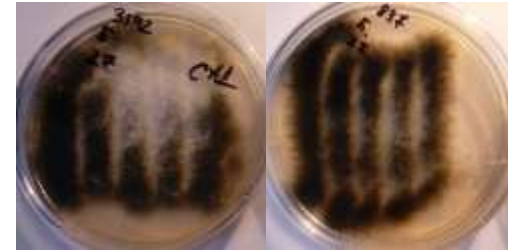
– силикагель и целлюлоза

$$T(107) > T_{0,05; 11; 11} = 96$$

– почва и целлюлоза

$$T(98) > T_{0,05; 11; 11} = 96$$

Сравнение хранения культур одного вида из умеренной (У) и тропической (Т) климатических зон



КЛИМАТИЧЕСКИХ ЗОН

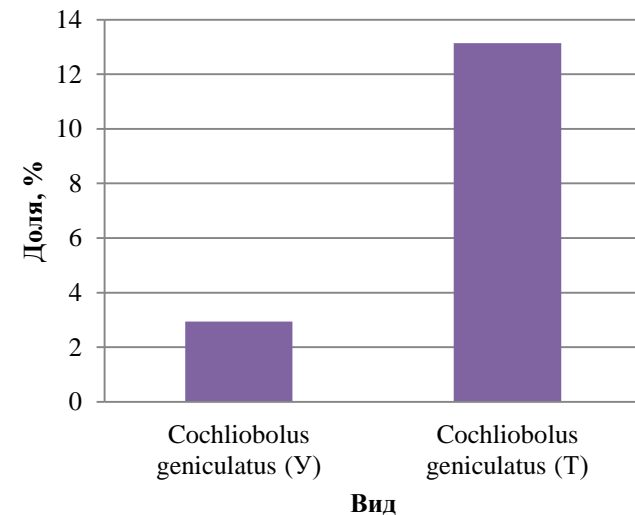
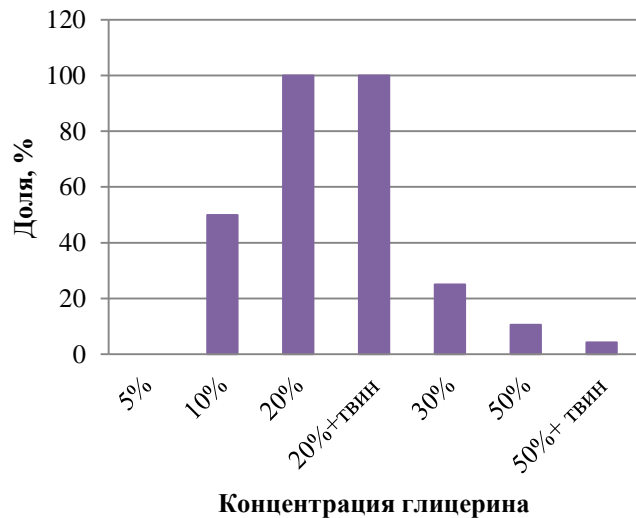
Таб.3 Оценка в баллах качества хранения культур *C. geniculatus* разными методами

	-80°	Силикагель	Почва	Целлюлоза	Вода	Сумма
<i>Cochliobolus geniculatus</i> (У)	3	2	3	3	2	13
<i>Cochliobolus geniculatus</i> (Т)	3	3	3	3	3	15

Доля выживших КОЕ от исходных (-80°С) *C. geniculatus* (Т)

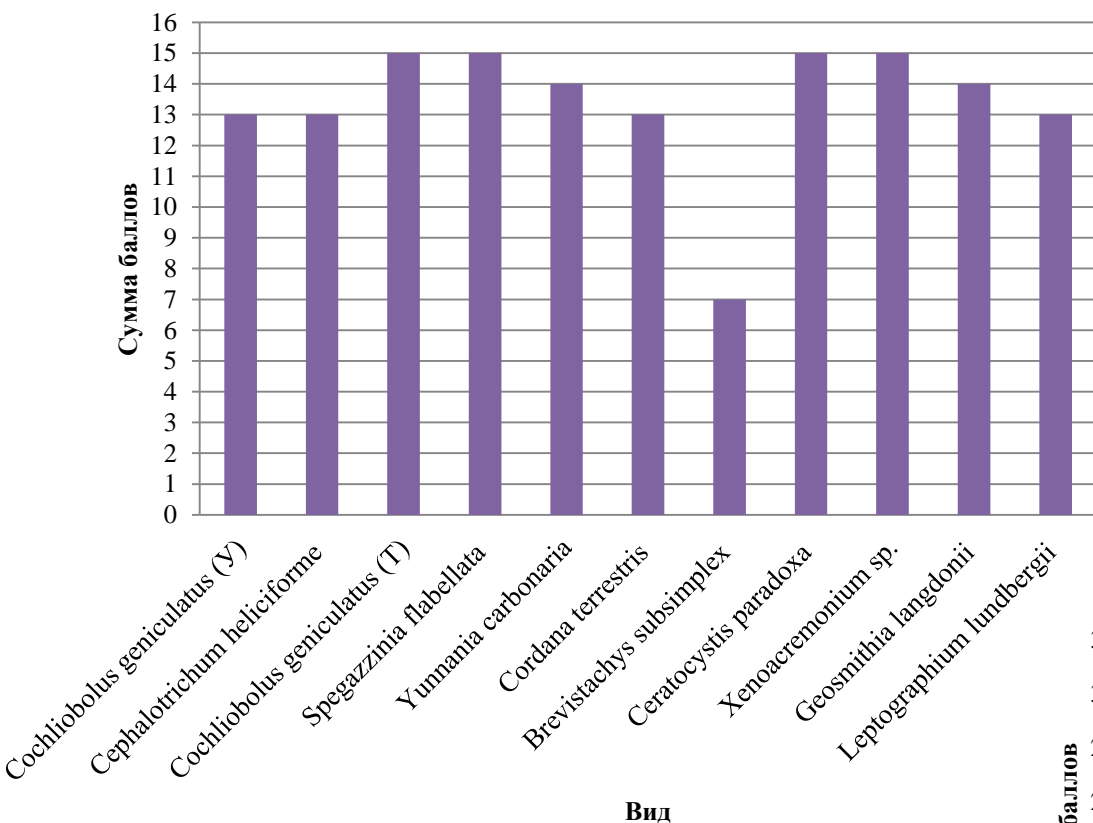
Доля выживших КОЕ от исходных (-80°С) *C. geniculatus* (У)

Доля выживших КОЕ после хранения на силикагеле



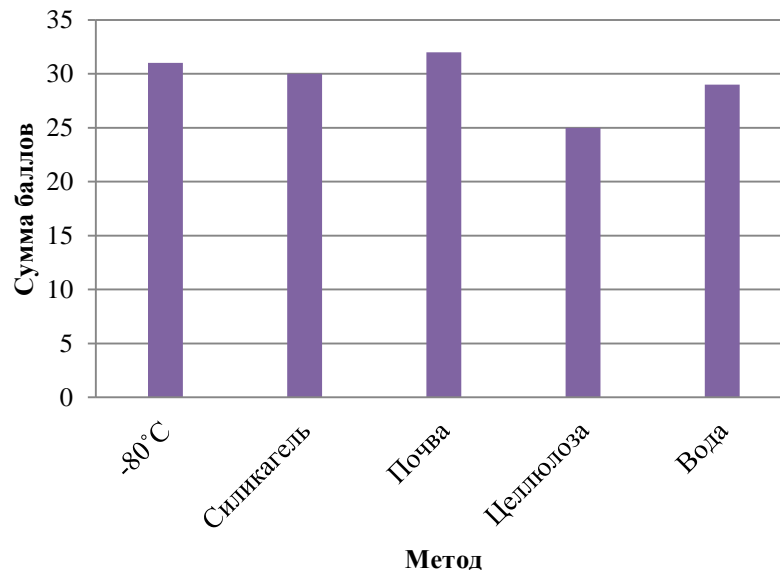
Обобщение результатов

Общая балльная оценка хранения культур



- Минимальную сумму баллов за хранение набрала культура *Brevistachys subsimplex*
- Остальные культуры набрали сравнимые баллы

Общая балльная оценка методов хранения

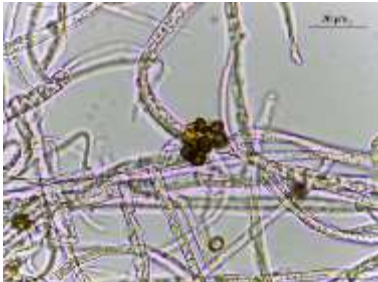


- Минимальную сумму баллов набрал метод хранения на целлюлозе;
- Максимальное число баллов получил метод хранения в стерильной почве.

Дополнительные результаты

Таб.4 Результаты проверки выживаемости культур кафедральной коллекции после долгосрочного хранения

Метод	Количество культур	Срок хранения	Количество выживших культур
Лиофилизация	10	12 лет	7
Высушивание на агаре	25	1–2 года	17
Высушивание на целлюлозе	10	17 лет	5



Выводы

- При методе хранения при -80°C диапазоны оптимальных концентраций криопротектора чаще всего включали 20% и 30%-ный растворы глицерина; Tween в среде с оптимальным содержанием глицерина положительно влияет на выживаемость культур; данный метод оказался подходящим для всех культур.
- В дистиллированной воде культуры хранились в двух вариациях, различающихся по температуре. Значимой разницы между хранением при комнатной температуре [$+15^{\circ}$, $+20^{\circ}$] и при $+4^{\circ}\text{C}$ после периода хранения выявлено не было.
- Наиболее подходящие субстраты высушивания в рамках данной работы – почва и силикагель.
- По качественной оценке культур, выведенных из хранения, хранение в высушенном состоянии на целлюлозе наименее оптимально из всех использованных в работе методов.
- Для культуры *Brevistachys subsimplex* при всех методах хранения отмечена наименьшая выживаемость в сравнении с остальными культурами.

- Значимой разницы в успешности хранения культур *Cochliobolus geniculatus* из умеренной и тропических климатических зон обнаружено не было.
- По результатам проверки качества долгосрочного хранения культур кафедральной коллекции: 3 из 10^{-ти} лиофилизированных культур не дали роста после 12-ти лет хранения. Половина проверенных культур (5 из 10^{-ти}), 17 лет хранящихся в высушенном состоянии на целлюлозе, дала рост. Часть культур (32%) после 2^{-х} лет хранения на скошенном агаре не дала роста, но для краткосрочного хранения (до 1 года) этот метод хорошо подходит.

A close-up photograph of a petri dish containing a brown agar medium. The surface is covered with a dense, white, fuzzy growth of mold. A semi-transparent white rectangular box is overlaid in the center of the dish, containing the text "Спасибо за внимание!".

Спасибо за внимание!

Благодарности

- Особая благодарность за кураторство, внимание и содействие в работе – **Александровой Алине Витальевне.**
- За ознакомление с порядком работы на кафедре – **Алдобаевой Ирине Игоревне.**
- За участие и помощь – **Воронко Оксане Васильевне,
Благовещенской Екатерине Юрьевне.**

Источники использованных фотографий:

[1] – <https://nrrl.ncaur.usda.gov/>

[2] – <http://asclepii.ru/zabolevaniia/aspergillez.php#>

[3] – <http://vinograd.info/stati/vino/italyanskoe-vinodelie-prichiny-uspeha.html>

Литература:

Croan S. C., Burdsall Jr H. H., Rentmeester R. M. Preservation of tropical wood-inhabiting basidiomycetes //Mycologia. – 1999. – С. 908-916.