

A *Rhizobium*-törzsek eltartása liofilizált állapotban

MANNINGER ERNŐ

MTA Talajtani és Agrokémiai Kutató Intézete, Budapest

Mivel a rhizobium-tenyészetek laboratóriumi fenntartásával járó gyakori átoltások előnytelen disszociációkat eredményezhetnek, amelyek következtében a rhizobium-baktériumok teljesítőképessége megváltozhat, az oltóanyaggyártáshoz évről évre új rhizobium-törzseket kell izolálni és teljesítőképességüket ellenőrizni. Mivel ez hosszadalmas és költséges, hasznosnak látszott oly módszer után kutatni, melynek alkalmazásával a rhizobium-baktériumok hosszabb ideig eltarthatók anélkül, hogy tulajdonságaik megváltoznának.

A liofilizálás technikájának az utóbbi néhány évtizedben bekövetkezett nagymérvű fejlődése következtében manapság a legalkalmasabb módszernek tekintik ezt az eljárást mikroorganizmusok tartósítására.

A rhizobiumoknak ily módon történő eltarthatóságáról alig találunk közleményeket (APPELMANN és SEARS [1], BORODULINA [2], KUPLETSZKAJA [3], Manual of Microbiological Methods [4], WRÓBEL [6]).

Módszer

A liofilizálást, más néven fagyasztva szárítást egy a Phylaxiában már jó eredménnyel használt, házilag összeállított Flosdorf—Mudd rendszerű készülékkel (SZAKMÁRY [5]) végeztem a következőképpen: a liofilizálandó baktérium, szuszpenzió 0,5—0,5 ml-nyi mennyiségét kb. 15 cm hosszú kapillárisal rendelkező Pasteur-féle pipettákkal 3 ml-t befogadó ampullákba pipettáztam, ügyelve arra, hogy az ampullák nyaka ne legyen nedves. Miután az ampullák tartalmának „előzetes megfagyasztása” megtörtént, felerősítettem azokat az elosztókra. Az ampullák alját továbbra is alkohol-szárazjég-fürdőben tartottam. Miután a Mayeren-féle vacuscop segítségével meggyőződtem arról, hogy a rendszerben a szivattyú működésének hatására már létrejött 0,1 mm higanyoszlopnak megfelelő vákuum, megnyitottam az elosztó és az ampullák közé szerelt vákuumcsapokat. Ezután az ampullák tartalmát már csak a párolgás okozta hővesztés tartotta fagyott állapotban, ami a fürdőből kiemelt ampullákon félórán belül lecsapódó dér megjelenéséből is megítélhető volt.

A felszabaduló párák az elosztón keresztül kerültek a jénai üvegből készült Flosdorf—Mudd rendszerű sűrítőkbe, amelyekben az alájuk helyezett Dewar-féle palackokban levő alkohol-szárazjég-kása hűtő hatására a pára ismét jéggé fagyott. A szárítás végére a baktériumszuszpenzió lyukacsos váz alakjában marad vissza.

Eredmények és következtetések

A liofilizáláshoz szilárd babagar felületén nőtt 24 órás kultúrákat használtam, amelyeket kétféle védőkolloiddal: főlözött, autoklávozott tejjel és sterilre szűrt, inaktivált lóvérsavóval mostam le. Minden lemosott szuszpen-

zióból liofilizáltam 5—5 ampullát, s ugyanakkor megállapítottam a szuszpenziókban foglalt csírák számát lemezöntéses módszerrel. A leforrasztott ampullák minőségét Tesla-féle készülékkel ellenőriztem, majd az ampullákat szoba-hőmérsékleten tároltam.

Először 10 hónap után bontottam ampullákat, amelyeknek tartalmát 1 ml steril vízben oldottam fel. A szuszpenzióból közvetlenül ferde babagarrá oltottam, amelyen 48 óra alatt 27 C°-os termosztátban, a savóval lemosott egy VII/5 jelű liofilizált tenyészet kivételével, kinőttek a kultúrák. Ebből az egyből is valószínűleg azért nem nőttek ki a baktériumok, mert az ampullák nyakának letöréséhez használt alkoholos vattából az ampulla belsejébe némi alkohol szivároghatott, amely a lelángolásnál meggyulladva elégette a baktériumokat. (Ezt látszik bizonyítani az a tény is, hogy ugyanezt a rhizobium-törzset tartalmazó másik ampulla tartalmazott élő baktériumokat.) A csíraszám alakulását 10 hónap után a táblázatban mutatom be.

Az eredményből megállapíthattam, hogy 1. A csíraszámban 10 hónapig tartó tárolás után elég nagy csökkenés következik be, szaporodásképes sejt azonban mégis marad elegendő mennyiségben minden ampullában. Tehát ennyi ideig eltarthatók a rhizobium-törzsek liofilizált állapotban.

1. táblázat

A rhizobium baktériumok száma a liofilizáláskor, 10 és 26 hónap után

(1) Időpont	Rhizobium törzsek							
	VIII/1		VII/5		XXXVII/3		IX/3	
	s	t	s	t	s	t	s	t
Liofilizáláskor	(8) 2,6	(9) 3,7	(7) 5,5	(8) 2,5	(8) 2,0	(9) 2,0	(8) 1,3	(8) 4,1
10 hónap után	(4) 2,7	(3) 5,0	(2) 8,0	(4) 4,1	(4) 2,9	(4) 8,8	(1) 5,5	(3) 2,0
26 hónap után	(5) 1,1	(4) 1,2	0	(3) 4,5	0	(4) 7,0	(2) 4,0	0

s = savó mint védőkolloid; t = tej mint védőkolloid

A zárójelbe tett szám mutatja, hogy az alatta levő számot 10-nek hányadik hatványával kell szorozni. A baktériumszámok 0,5 ml liofilizált szuszpenzióra vonatkoznak.

2. A baktériumok a 10 hónapos tárolási idő folyamán a gumóképző tulajdonságukat is változatlanul megtartották.

A következő vizsgálatra a liofilizálást követő 26. hónap után került sor. Ekkor ugyanazokat a vizsgálatokat végeztem, mint az első alkalommal. A táblázat adataiból látható, hogy 26 hónap után oly erősen csökkent a csíraszám, hogy 3 esetben nem nőtt telep a lemezen. A csíraszámcsökkenés átlag 10^5 -szeres, két esetben 10^8 -szoros. Az életben maradt baktériumok növekedési erélye kielégítő volt, a megszokott idő alatt nőttek ki a tenyészetek. A liofilizált baktériumokkal végzett tenyésztedény-kísérletek is e baktériumok hatásosságát igazolják.

Az utóbbi kísérletből megállapítható, hogy a szobahőmérsékleten tartott, liofilizált rhizobium készítmények két évig nem tarthatók el, mert ennyi idő alatt a vizsgált törzseknek csaknem a fele elpusztult. További kísérletek lennének szükségesek annak eldöntésére, hogy a 10 és 26 hónap között melyik az az idő, amelynek tartamáig a liofilizált készítmények eltehető tulajdonságaik megváltozása nélkül. Gyakorlatilag azonban ennek nincs sok jelentősége, mert e tekintetben csak a teljes évek számának ismerete fontos, mivel az új növények begyűjtése, illetve a baktériumok izolálása vegetációs periódusonként, tehát csak évenként ismétlődő szakaszban történhet meg.

További kísérletek lennének szükségesek annak megállapítására is, nem lehetne-e a liofilizált tenyészeteknek jégszekrényben való tartásával a kísérletben meghatározott eltartási idejüket meghosszabbítani.

Összefoglalás

A fagyasztva szárítást egy házilag összeállított Flosdorf—Mudd rendszerű készülékkel végeztem. A liofilizáláshoz szilárd babagar felületén nőtt 24 órás tenyészeteket használtam, amelyeket kétféle védőkolloiddal: fölözött, autoklavozott tejjel és sterilre szűrt lóvérsavóval mostam le. Az ampullákat szobahőmérsékleten tároltam, majd 10 és 26 hónap után vizsgáltam tartalmukat. Az eredményekből megállapíthatam, hogy:

1. A csiraszámban 10 hónapig tartó tárolás folyamán elég nagy csökkenés következik be, szaporodóképes sejt azonban mégis marad elegendő mennyiségben minden ampullában a törzs elszaporítására.

2. A baktériumok száma 26 hónap után oly erősen csökkent, hogy három mintában nem találtam élő baktériumpéldányt. Ebből következik, hogy liofilizált rhizobium-készítmények szobahőmérsékleten két évig nem tarthatók el, mert ennyi idő alatt a vizsgált törzseknek csaknem a fele elpusztul.

Érkezett: 1964. április 6.

Irodalom

- [1] APPELMANN, M. D. & SEARS, O. H.: Studies on lyophilized cultures: lyophile storage of cultures of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **52**. 209—211. 1946.
- [2] BORODULINA, J. Sz.: Liofilnűje kulturü klubenkövü bakterij ih aktivnoszty i virulentnoszty. *Trudüj. Inst. Mikrobiol.* **11**. 211—214. 1961.
- [3] KUPLETZKAJA, M. B.: Ö liofilizacii szaprofitnüh mikroorganizmov. *Mikrobiologija.* **30**. 717—721. 1961.
- [4] PELCZAR, M. J.: *Manual of Microbiological Methods.* Society of American Bacteriologists, McGraw—Hill New York, Toronto, London. 1957.
- [5] SZAKMÁRY, G.: A baromfipestis H-virus lyophilizálása. *Magyar Állatorvosok Lapja.* **6**. 301—305. 1951.
- [6] WRÓBEL, T.: Wpływ liofilizacji szczepów rhizobium na aktywność ich współzycia z roślinami. *Acta Microbiol. Polon.* **9**. 181—189. 1960.

Хранение штаммов ризобия в лиофилизированном состоянии

E. МАННИНГЕР

Научно-исследовательский институт почвоведения и агрохимии Н. А. Венгрии, Будапешт

Резюме

При частой инокуляции штаммы ризобия претерпевают нежелательные изменения, поэтому для нужд бактериальной промышленности необходимо каждый год выделять новые и новые штаммы ризобия, жизнеспособность которых должна постоянно контро-

лироваться. Приготовление новых штаммов длительный и дорогостоящий процесс и поэтому возникла необходимость в разработке нового метода хранения штаммов, при котором бактерии могут сохраняться длительное время, не изменяя существенно свои свойства. Для этой цели автор применял лиофилизацию. Высушивание промораживанием проводилось в приборе «Flosdorf—Mudd» изготовленным в институтской мастерской. Для лиофилизации брались 24 часовые штаммы, которые обрабатывались двумя видами защитных коллоидов: промывались стерильным снятым молоком и профильтрованной стерильной инактивной сывороткой, полученной из крови лошади. Ампулы хранились при комнатной температуре, затем через 10 и 26 месяцев содержани их проанализировалось. Из данных анализа установили, что:

1. При хранении до 10 месяцев бактериальное число в значительной мере снизилось, но способность клеток к размножению все же сохранилась и была достаточной для дальнейшего размножения штаммов каждой ампулы.

2. За 26 месяцев число бактерий так сильно снизилось, что в трех образцах живых бактерий совсем не обнаружили. Из этого следует, что лиофилизированные препараты ризобия при комнатной температуре не могут сохраняться до 2-х лет т.к. за такой промежуток времени почти половина исследуемых штаммов погибает.

Необходимо поставить опыты для установления возможности продления сохранения лиофилизированных штаммов в холодильниках.

Табл. 1. Число бактерий ризобия в момент лиофилизации через 10 и 26 месяцев. (1) Время наблюдений. *S* = сыворотка как защитный коллоид, *t* = молоко как защитный коллоид. Цифры в скобках показывают степень 10, на которое нужно умножить значения находящиеся в нижней строке. Бактериальное число относится к 0,5 мл. лиофилизированной суспензии.

The Preservation of *Rhizobium* Strains in Lyophilid Condition

E. MANNINGER

Research Institute of Soil Science and Agricultural Chemistry of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Summary

Since the frequent grafting of rhizobium cultures may result in disadvantageous dissociations, year by year new rhizobium strains must be isolated and their productivity controlled for the production of inoculum. Since this is a circumstantial and therefore expensive process it seemed important to search for a method by the application of which the rhizobia can be preserved for a longer period without changing their properties. For this purpose I wanted to make use of lyophilization. Freeze-drying was carried out with a home made Flosdorf—Mudd apparatus. For the lyophilization 24 hour cultures grown on the surface of solid bean agar were used which have been washed off with two kinds of protective colloids; skimmed autoclaved milk and sterile filtered inactivated horse blood serum. The ampoules were stored at room temperature and the contents examined after 10 and 26 months. From the results it has been established that:

1. In the number of germs during storage for 10 months a rather considerable decrease occurs but still in each ampoule there remained cells capable of reproduction in a sufficient amount to increase the strain.

2. The number of the bacteria has so considerably diminished after 26 months that in three samples no living bacterium specimen was found. From this it follows that lyophilid rhizobium preparations can not be preserved at room temperature for two years because during that period almost half of the strains examined perish.

Further experiments were needed to establish whether by keeping the lyophilid cultures in a refrigerator the period of their preservation could not be prolonged.

Table 1. Number of rhizobium bacteria at lyophilization after 10 and 26 months (1) Date. *s* = serum as protective colloid. *t* = milk as protective colloid. The figure put in brackets shows which power of 10 must the number below be multiplied with. The bacterium numbers are related to 0,5 ml lyophilid suspension.