

ОРГАНИЗАЦИЯ АВТОРИЗОВАННОГО ДОЛГОСРОЧНОГО ХРАНЕНИЯ ПОЛЕЗНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОГО НАЗНАЧЕНИЯ В ВЕДОМСТВЕННОЙ КОЛЛЕКЦИИ РОССЕЛЬХОЗАКАДЕМИИ***В.И. САФРОНОВА, И.А. ТИХОНОВИЧ**

В 2010 году во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии введена в эксплуатацию новейшая станция низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ («Liconic Instruments», Лихтенштейн). При создании этого комплекса использованы самые современные мировые разработки в области робототехники, компьютерных и криогенных технологий. Операции по загрузке-выгрузке образцов в хранилище осуществляются через передаточный блок ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), что обеспечивает стабильную температуру в камере хранения и максимальную сохранность биологического материала. Компьютерные пароли, применяемые депозиторами при размещении штаммов в хранилище, делают технически невозможным несанкционированный отбор депонированных культур и позволяют использовать комплекс в качестве биобанка. Компьютерная программа, управляющая работой комплекса, формирует «в реальном времени» on-line базу данных микроорганизмов, которая отражает полную информацию о депонированных штаммах, проведенных с ними операциях, истории хранения, а также предоставляет широкому кругу пользователей возможность для быстрого поиска необходимых культур. Резервные системы охлаждения и электроснабжения обеспечивают бесперебойную работу всего комплекса. В настоящее время на базе автоматизированного криохранилища сформирована Ведомственная коллекция полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения Россельхозакадемии, предоставляющая услуги по долгосрочному хранению микроорганизмов не только научно-исследовательским институтам, но и широкому кругу производителей микробных препаратов.

Ключевые слова: микробиологическая коллекция, долгосрочное сохранение микроорганизмов, авторизованное хранение штаммов.

Keywords: microbial collections, long-term maintenance, authorized depositing of strains.

Проблемы повышения урожайности сельскохозяйственных культур и улучшения качества продукции растениеводства становятся все более актуальными в условиях глобального изменения климата, а также усиливающегося истощения пахотных земель и сокращения их площади. Использование биологических технологий — эффективный и экологически безопасный способ роста сельскохозяйственного производства. Сельскохозяйственная биотехнология, основанная на применении микроорганизмов в растениеводстве и животноводстве, не только вносит существенный вклад в решение глобальной проблемы обеспечения человека продовольствием, но и способствует сохранению окружающей среды. В развитых странах сейчас производится более 100 видов микробных биопрепаратов для сельского хозяйства. Это различные энтомопатогенные препараты, гербициды, фунгициды, бактериальные удобрения, белково-витаминные концентраты, закваски для силосования кормов и др. Использование биологических средств защиты растений, стимуляторов роста животных и растений, микробных удобрений позволяет уменьшить дозы применяемых химических пестицидов и минеральных удобрений. В результате увеличение объема сельскохозяйственного производства сопровождается повышением качества продукции и снижением антропогенных воздействий на агроландшафты.

Разнообразные практически ценные свойства микроорганизмов невозможно реализовать без создания хорошо организованных, специализи-

* Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технического комплекса России на 2007-2013 годы» (Государственный контракт № 16.518.11.7095).

рованных коллекций, основными целями которых служит квалифицированное изучение и долгосрочное сохранение микробиологических ресурсов без потери их полезных свойств. Последнее представляет собой непростую задачу, поскольку при поддержании штаммов микроорганизмов в лабораторных условиях часто возникают проблемы, связанные с нестабильностью бактериального генома. Наиболее надежным современным способом хранения микроорганизмов считается криоконсервация (хранение в замороженном состоянии при температуре ниже $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Поддержание микроорганизмов в криоконсервированном состоянии обеспечивает полную остановку клеточного метаболизма и, таким образом, гарантирует генетическую стабильность культур и сохранность практически ценных свойств при хранении. Кроме того, при столь низких температурах невозможны процессы рекристаллизации льда, что способствует сохранению жизнеспособности клеток в течение десятилетий (1-3). Именно поэтому метод криоконсервации рекомендован для широкого использования в Биологических ресурсных центрах микроорганизмов (4). Однако оборудование, применяемое в мировых микробных коллекциях для проведения криоконсервации (сосуды Дьюара с жидким азотом, криотанки и низкотемпературные морозильные камеры), имеет существенные недостатки и не может обеспечить ни стабильной температуры хранения, ни авторизованного доступа к культурам. Это техническое несовершенство приводит к существенному ухудшению качества биологического материала и делает возможным несанкционированный отбор коммерческих штаммов.

В Российской Федерации основная часть работ по поддержанию и изучению сельскохозяйственных микроорганизмов проводится в институтах Российской академии сельскохозяйственных наук, которые располагают уникальным микробиологическим фондом (около 20 тыс. культур). В 2010 году в целях сохранения микробиологического фонда Россельхозакадемии и повышения эффективности его использования в сельском хозяйстве на базе Всероссийского НИИ сельскохозяйственной микробиологии была создана Ведомственная коллекция полезных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ВКСМ).



Рис. 1. Внешний вид станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов («Liconic Instruments», Лихтенштейн): 1 — камера хранения, 2 — передаточный комплекс.

Целью представляемой работы было внедрение системы роботизированного хранения микроорганизмов сельскохозяйственного назначения для обеспечения оптимальных условий их поддержания и авторизованного доступа к коммерчески ценным образцам, а также создание Интернет-базы данных, функционирующей в режиме реального времени.

В ВКСМ новейшая станция низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов («Liconic Instruments», Лихтенштейн), рассчитанная на

200 тыс. образцов (рис. 1), была введена в эксплуатацию в 2010 году. При создании этого комплекса использовались новейшие мировые разработки в области робототехники, компьютерных и криогенных технологий. Стан-

ция состоит из морозильной камеры, в которой поддерживается температура $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, а также передаточного комплекса (интерфейса) с температурой $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, через который осуществляется загрузка-выгрузка образцов. Такой принцип обеспечивает стабильную температуру и минимальную влажность в камере хранения. Образцы штаммов, предназначенные для замораживания, готовятся в соответствии со стандартным протоколом криоконсервации микроорганизмов (5). Клетки, выращенные на соответствующей питательной среде и находящиеся в начале стационарной фазы роста, суспендируются в свежей среде того же состава, содержащей защитный компонент (криопротектор). Титр клеток в суспензии должен составлять 10^8 - 10^{10} /мл. В качестве криопротектора используют 10-15 % глицерин, который легко проходит через клеточную мембрану и обеспечивает как внутри-, так и внеклеточную защиту от замораживания за счет стабилизации водородных связей макромолекул. После периода эквilibрации (15-60 мин при комнатной температуре) суспензии расфасовываются в стерильные пробирки. Для загрузки в криохранилище используются специальные штативы с пробирками объемом 300 мкл, которые снабжены уникальными 2D-баркодами (графические изображения на дне пробирок). После ввода информации об образцах в компьютерную базу данных баркоды считываются специальным сканером и трансформируются в цифровой код. После этого штативы с пробирками загружаются в хранилище через передаточное устройство, где поддерживается температура $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. С помощью робота TubePicker (рис. 2), размещенного в передаточном комплексе, можно манипулировать пробирками, отбирать и выгружать единичные образцы без выгрузки всего штатива.

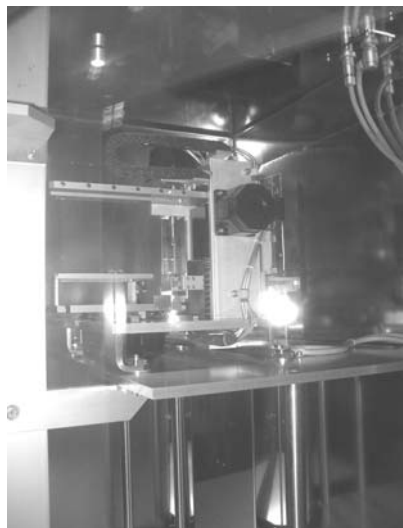


Рис. 2. Робот TubePicker, осуществляющий отбор образцов в передаточном комплексе станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов («Liconic Instruments», Лихтенштейн).

Программа Tube Store Sample management обеспечивает функционирование хранилища и содержит всю информацию о размещаемых образцах: дата загрузки-выгрузки, местонахождение, журнал операций с образцами, паспортные данные штаммов, температура их содержания за период хранения. При загрузке образцов в хранилище возможна организация авторизованного доступа, при котором для выгрузки штамма назначается компьютерный пароль-ключ. Такой пароль предотвращает возможность несанкционированного отбора образцов из хранилища. Программное обеспечение позволяет проводить быстрый поиск штаммов в компьютерной базе данных по ключевым словам: номер штамма, род или вид микроорганизма, полезное свойство, растение-хозяин (для симбионтов и патогенов), организация-депозитор.

На основе программы Tube Store Sample management создана уникальная Интернет-база данных хранилища, которая отражает всю информацию о депонированных штаммах и все операции, производимые с каждым образцом «в реальном времени». Интернет-база данных позволяет депозитора проводить удаленный мониторинг своих образцов, а также предоставляет широкому кругу пользователей возможность поиска штаммов по

ключевым словам. Диалог между заказчиком штамма и депозитором осуществляется с помощью электронных уведомлений, которые автоматически генерируются при заказе штаммов, одобрении (или отклонении) заказа и т.д.

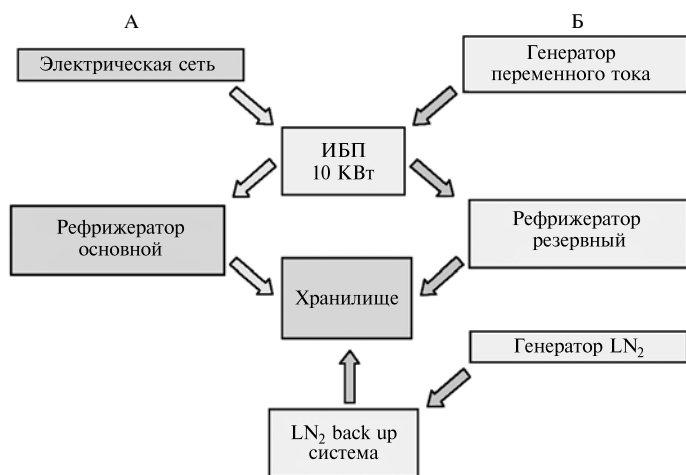


Рис. 3. Основные (А) и резервные (Б) системы, обеспечивающие бесперебойную работу комплекса станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов («Liconic Instruments», Лихтенштейн): ИБП — источник бесперебойного питания, LN₂ back up система — устройство аварийной подачи жидкого азота в хранилище.

Бесперебойную работу хранилища обеспечивают два типа систем — основная и резервная (рис. 3). В штатном режиме хранилище охлаждается основным рефрижератором, который питается от сети через источник бесперебойного питания (ИБП). Резервное оборудование представлено дизельным генератором переменного тока, резервным рефрижератором и системой LN₂ (liquid nitrogen) back up, которая впрыскивает в криохранилище жидкий азот при повышении температуры внутри камеры хранения. Резервуар для жидкого азота имеет объем 250 л и пополняется с помощью генератора жидкого азота. Все резервное оборудование при необходимости включается автоматически.

Основные особенности и обусловленные ими преимущества станции низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов («Liconic Instruments», Лихтенштейн) следующие:

Стабильная температура хранения образцов, отсутствие флуктуаций	⇒ Высокое качество микробиологического материала (жизнеспособность и стабильность практически ценных свойств)
Роботизированная система управления	⇒ Минимизация ошибок
Идентификация штативов и пробирок с помощью 2D-баркодов	⇒ Надежная маркировка образцов и отслеживание всех операций, произведенных с ними
Использование компьютерных ключей (паролей) при загрузке штаммов в хранилище	⇒ Гарантия авторизованного доступа к штаммам
Интернет-база данных хранилища «в реальном времени»	⇒ Доступ к актуальной информации об образцах в хранилище для широкого круга пользователей
Резервные системы энергообеспечения и охлаждения	⇒ Надежность функционирования хранилища

Таким образом, станция низкотемпературного автоматизированного хранения биологических образцов («Liconic Instruments», Лихтенштейн) предоставляет уникальные возможности для долгосрочного хранения культур микроорганизмов в оптимальных условиях без потери свойств. Стан-

ция функционирует по принципу биобанка и гарантирует авторизованный доступ к практически ценным штаммам, принадлежащим научно-исследовательским институтам и коммерческим организациям, занимающимся производством микробных препаратов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Farrant J. General observations on cell preservation. In: Low temperature preservation in medicine and biology /M.J. Ashwood-Smith, J. Farrant (eds.). Pitman Medical Limited, Kent, England, 1980: 1-18.
2. Сафронова В.И., Оследкин Ю.С., Свиридова О.В., Воробьев Н.И. Методы консервации коллекционных культур микроорганизмов. СПб, 2007.
3. Safronova V.I., Novikova N.I. Comparison of two methods for root nodule bacteria preservation: lyophilization and liquid nitrogen freezing. J. Microb. Methods, 1996, 24: 231-237.
4. OECD best practice guidelines for biological resource Centres. OESD, 2007.
5. NNI Cryopreservation manual. Nalge Nunc Int. Corp., Penfield, N.Y., USA, 1998.

ГНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии Россельхозакадемии,
196620 г. Санкт-Петербург— Пушкин, ш. Подбельского, 3,
e-mail: v.safronova@rambler.ru

Поступила в редакцию
30 сентября 2011 года

AUTHORIZED LONG-TERM DEPOSITATION OF AGRICULTURAL MICROORGANISMS IN THE DEPARTMENTAL COLLECTION OF THE RUSSIAN ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

V.I. Safronova, I.A. Tikhonovich

S u m m a r y

The joint Russian Collection of Agricultural Microorganisms (RCAM) was founded in 2010 at the All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology, Saint-Petersburg. For long-term maintenance and authorized depositing of microbial strains in RCAM the newest automated STC Tube Store at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Liconic Instruments, Liechtenstein) is used. Liconic Instruments' Tube Store becomes an extremely useful, simple and intuitive system for a long-term storage of microorganisms at optimum conditions without the loss of their valuable properties. This ultra low temperature store is based on the chest freezer principle. Samples are loaded into the chamber via special interface unit ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), which ensures a stable temperature and dry conditions into the storage compartment. Computer passwords used by depositors during the sample load operation ensure an authorized access to commercial strains of microorganisms. Unique «real time» online database of microorganisms has been organized on basis of the STC Tube Store Sample management software, which contains all information about the strains deposited: description, location in the store and movements of each sample. Such kind of store gives possibilities to intensify the search of new microbial cultures, keeping in mind the huge soil microbe's biodiversity and a necessity to mobilize genetic resources of microorganisms for an agricultural production.

Научные собрания

КОНФЕРЕНЦИЯ «АДАПТАЦИОННЫЕ СТРАТЕГИИ ЖИВЫХ СИСТЕМ»

(пос. Новый Свет, АР Крым, Украина, 11-16 июня 2012 года)

Темы, представляющие интерес: молекулярные, клеточные и системные механизмы, патология онтогенетических адаптаций; управление адаптационными процессами с помощью физических и химических факторов; механизмы филогенетических адаптаций; адаптационные стратегии экосистем к условиям глобального потепления и техносферы; биобезопасность.

Контакты и информация: <http://www.as2012.science-center.net>, ubs@science-center.net

RECOMB SATELLITE CONFERENCE ON OPEN PROBLEMS IN ALGORITHMIC BIOLOGY (RECOMB-AB)

(г. Санкт-Петербург, 27-29 августа 2012 года)

Темы, представляющие интерес: молекулярный анализ последовательностей; молекулярная эволюция; экспрессия генов; биологические сети; генотипирование; геномика; популяционная генетика; системная биология; молекулярная структурная биология; протеомика.

Контакты и информация: <http://bioinf.spbau.ru/ab2012>