

УДК 576.809.558

Г.Т. Джакибаева., К.М.Кебекбаева., А.К.Джобулаева., А.В.Медведева  
 РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г.Алматы, Казахстан  
 \*e.mail: J.Gulnar60@mail.ru

### **Биологическая активность нефтеокисляющих и целлюлолитических бактерий и методы их хранения**

В данной работе было проведено изучение жизнеспособности и активности нефтеокисляющих и целлюлолитических бактерий и сравнение их методов хранения. Установлено, что нефтеокисляющая активность культур, заложенных на хранение различными способами, неодинакова. Выявлена высокая жизнеспособность нефтеокисляющих бактерий после года хранения методом высушивания, утилизация нефти была выше, чем при хранении другими способами. Проверка активности целлюлолитических бактерий после года хранения различными способами показала, что все культуры проявили активность при разных методах хранения, кроме хранения в почве. Самая высокая активность культур наблюдалась при хранении методом лиофилизации (диаметр задержки роста составил 30-38 мм).

**Ключевые слова:** штаммы, микроорганизмы, бактерии, жизнеспособность, активность.

Г.Т. Джакибаева., К.М. Кебекбаева., А.К. Джобулаева, А.В. Медведева

### **Мұнайды тотықтыратын және целлюлолитикалық бактериялардың биологиялық белсенділігі және оларды сақтау әдістері**

Бұл жұмыста мұнайды тотықтыратын және целлюлолитикалық бактериялардың биологиялық белсенділігін және тіршілікке қабілеттілігін және оларды сақтау әдістерін салыстыру бойынша зерттеулер жүргізілді. Өртүрлі әдістермен сақтауға берілген культуралардың мұнайды тотықтырғыш қасиеттері бірдей болмайтындығы анықталды. Басқа сақтау әдістеріне қарағанда, бір жылғы кептіру әдісімен сақтауда мұнайды тотықтыратын бактериялардың тіршілікке қабілеттілігінің жоғары болатындығы және мұнайдың ыдырауы анағұрлым жоғары екендігі анықталды. Бір жылғы өртүрлі әдістермен сақтауда целлюлолитикалық бактериялардың биологиялық белсенділігін тексеру көрсеткендей, барлық культуралар өртүрлі әдістермен сақтауда белсенділік көрсетті, тек ғана топырақта сақтау әдісінен басқасы. Лиофилизация әдісімен сақтауда культуралардың анағұрлым жоғары белсенділігі бақыланды (өсуді тежеу диаметрі 30-38 мм құрады).

**Түйін сөздер:** штаммдар, микроорганизмдер, бактериялар, тіршілікке қабілеттілік, биологиялық белсенділік.

G.T. Dzhakibaeva., K.M. Kebekbaeva, A.K. Dzhobulaeva., A.V. Medvedeva

### **The biological activity of oxidizing and cellulolytic bacteria and their methods of storage**

In this work studied the viability and activity of oxidizing and cellulolytic bacteria and comparison of methods of storage. Installed that the oil-oxidizing activity of cultures laid in storage varies in different ways. Showed a high viability oxidizing bacteria after years of storage by drying, utilization oil was higher than when stored in other ways. Check of activity cellulolytic bacteria after years of storage in different ways showed that all cultures were active at different storage methods, except for storage in the soil. The highest activity of cultures was observed in method of storage lyophilization (diameter growth inhibition was 30-38mm).

**Keywords:** strains, microorganisms, bacterias, viability, activity.

Благодаря научным достижениям микробиологии, внедрению новых разработок генной инженерии стало возможным получать высокотехнологичные штаммы микроорганизмов, продуцентов ферментов, аминокислот, антимикробных метаболитов и других биологически активных веществ. При этом неотъемлемым компонентом фундаментальной базы практически любого биотехнологического проекта являются

коллекции микроорганизмов, которые гарантируют сохранение ресурсов микробного разнообразия и делают их доступными для использования в научных исследованиях [1-4].

Особое внимание уделяется группам бактерий, представляющим потенциальный интерес в качестве объектов биотехнологии и играющим важную роль в функционировании различных экосистем.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования служили коллекционные штаммы нефтеокисляющих бактерий: *Acynetobacter calcoaceticum* 2A, *Arthrobacter globisporis* 44A, *Micrococcus roseus* 6A, *Micrococcus roseus* 34, *Micrococcus roseus* 40, *Microbacterium lacticum* 8C, *Microbacterium lacticum* 41-3, *Rodococcus erythopolis* 7A. и целлюлолитических бактерий: *Brevibacterium opacum* 103KSC, *Flavobacterium auranticus* 81/3KSC, *Brevibacterium erythra* 38 KSC, *Cellulomonas effusa* № 60 CS.

Все культуры были заложены на хранение четырьмя способами: методом хранения микроорганизмов при низких температурах (-20С) в 10% водном растворе глицерина в качестве протектора, методом высушивания, под минеральным маслом и в почве.

Жизнеспособность нефтеокисляющих микроорганизмов определяли следующим образом: культуры пересевали на пробирки с рыбо-пептонным агаром (РПА) и выращивали в течение суток в термостате при температуре 28°С. Методом предельных разведений высевали выросшие культуры на чашки Петри. Особо крупные колонии пересевали на скошенный агар с рыбо-пептонной средой и культивировали в течение суток в термостате. Выросшие культуры высевали на жидкую среду Ворошиловой–Диановой (ВД) и добавляли 1% нефти для проверки нефтеокисляющей способности штаммов. Колбы ставили на качалку на 14 суток. Контролем служила среда с нефтью.

Рост микроорганизмов оценивали визуально, при этом отмечали изменения,

происходящие с нефтью под воздействием микроорганизмов по отношению к контролю.

Жизнеспособность целлюлолитических бактерий проверяли следующим образом: на свежие косяки со средой МПА пересевали исследуемые культуры микроорганизмов, затем инкубировали в термостате при температуре 28°С. По истечении срока инкубации данные культуры использовали для приготовления разведений ( $10^1$ - $10^{10}$ ). Высев производили на чашки Петри со средой МПА из  $10^2$ - $10^{10}$ .

### Результаты и их обсуждение

Изучена биологическая активность нефтеокисляющих и целлюлолитических бактерий, хранящихся различными методами в лаборатории коллекции микроорганизмов Института.

С целью подбора методов хранения и консервации бактерий в 2012 году на хранение были заложены 8 штаммов нефтеокисляющих бактерий: *Acynetobacter calcoaceticum* 2A, *Arthrobacter globisporis* 44A, *Micrococcus roseus* 6A, *Micrococcus roseus* 34, *Micrococcus roseus* 40, *Microbacterium lacticum* 8C, *Microbacterium lacticum* 41-3, *Rodococcus erythopolis* 7A.

Все культуры были заложены на хранение четырьмя способами: методом хранения микроорганизмов при низких температурах (-20С) в 10% водном растворе глицерина в качестве протектора, методом высушивания, под минеральным маслом и в почве.

Через год хранения в условиях коллекции Института проведена проверка сохранности, жизнеспособности и активности нефтеокисляющих бактерий. Полученные данные представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Жизнеспособность нефтеокисляющих бактерий после года хранения различными методами

Микроорганизмы		Жизнеспособность клеток, %			
Вид	№ штамма	10% р-р глицерина при -20°С	Под минеральным маслом	Лиофилизация	В почве
<i>Acynetobacter calcoaceticum</i>	2A	80±2,2	45±1,2	96±2,7	40±1,3
<i>Arthrobacter globisporis</i>	44A	81±2,3	44±1,1	97±3,4	43±1,2
<i>Micrococcus roseus</i>	6A	83±2,0	40±1,1	94±2,8	49±1,0
<i>Micrococcus roseus</i>	34	79±3,1	47±2,2	98±4,1	42±1,1
<i>Micrococcus roseus</i>	40	78±2,2	46±2,1	95±3,2	44±1,2
<i>Microbacterium lacticum</i>	8C	80±2,5	50±2,1	94±2,3	38±1,1
<i>Microbacterium lacticum</i>	41-3	83±2,1	44±1,2	96±3,3	45±1,3
<i>Rodococcus erythopolis</i>	7A	80±2,0	48±1,0	90±4,1	46±1,4

Из приведенных в таблице данных видно, что все нефтеокисляющие бактерии, заложенные на хранение год назад сохранили свою жизнеспособность. Показано, что наиболее высокую сохранность жизнеспособности штаммов бактерий обеспечивает метод лиофилизации. Использование метода хранения под минеральным маслом снижает жизнеспособность бактерий через год хранения в среднем на 50%. Метод хранения культур при

низких температурах (-20<sup>0</sup>С) в 10% растворе глицерина, также обеспечивает хорошую сохранность жизнеспособности бактерий (78-83%).

С целью оценки нефтеокисляющей активности культур проводили количественное определение утилизации нефти гравиметрическим методом по суммарному показателю ее убыли в жидкой среде. Полученные данные представлены в таблице 2.

**Таблица 2** – Нефтеокисляющая активность бактерий после года хранения различными методами

Микроорганизмы		Утилизация нефти, %			В почве
Вид	№ штамма	10% р-р глицерина при -20 <sup>0</sup> С	Под минеральным маслом	Лиофилизация	
<i>Acinetobacter calcoaceticum</i>	2А	32,0	29,0	42,0	27,0
<i>Arthrobacter globisporis</i>	44А	40,0	34,0	38,0	22,0
<i>Micrococcus roseus</i>	6А	39,0	30,0	41,0	24,0
<i>Micrococcus roseus</i>	34	42,0	34,0	42,0	22,0
<i>Micrococcus roseus</i>	40	37,0	25,0	39,0	21,0
<i>Microbacterium lacticum</i>	8С	28,0	24,0	32,0	26,0
<i>Microbacterium lacticum</i>	41-3	30,0	26,0	34,0	25,0
<i>Rodococcus erythropolis</i>	7А	33,0	22,0	36,0	21,0

Примечание - данные приведены без учета естественной убыли нефти в контроле, которая составляла 27%.

Нефтеокисляющая активность культур, заложенных на хранение различными способами, неодинакова. Отмечено, что, высокую жизнеспособность показали нефтеокисляющие бактерии после года хранения методом высушивания, утилизация нефти была выше, чем при хранении другими способами. Только, у штамма *Arthrobacter globisporis* при хранении в лиофильно-высушенном виде утилизирующая способность составляла 38,0%, в то время как этот же показатель у культуры, хранившейся в 10% растворе глицерина при -20<sup>0</sup>С составлял – 40,0%.

Установлено, что наиболее оптимальным способом консервации для этих штаммов является метод лиофилизации, при котором отмечается самый высокий уровень выживаемости бактерий (90-98%). При

использовании метода хранения под минеральным маслом жизнеспособность бактерий уменьшилась в среднем на 60-65%.

Для проверки жизнеспособности культуры целлюлолитических бактерий *Brevibacterium opacum* 103KSC, *Flavobacterium auranticus* 81/3KSC, *Brevibacterium erythra* 38 KSC и *Cellulomonas effusa* № 60 CS высевали на твердую среду Гетчинсона с пшеничной соломой в качестве источника углерода и энергии. Установлена сохранность жизнеспособности культур, однако отмечено снижение целлюлазной активности штаммов, а также способности к синтезу β-каротина. С целью повышения данных признаков проведена активация роста культуры на элективных средах (травяной отвар с ксилозой и сухим клевером, среда Гоулда-Декстера). В результате целлюлазная активность и способность к синтезу β-каротина полностью восстановлена.

**Таблица 3** – Жизнеспособность целлюлолитических бактерий после года хранения различными методами

Вид	10% р-р глицерина при -20 <sup>0</sup> С	Под минеральным маслом	Лиофилизация	В почве
<i>Brevibacterium opacum</i> 103KSC	77±3,1	46±2,1	9,2±2,1	45±1,3
<i>Flavobacterium auranticus</i> 81/3KSC	80±2,4	44±1,3	95±3,3	42±1,2
<i>Brevibacterium erythra</i> 38 KSC	79±2,0	47±2,5	94±2,2	37±1,4
<i>Cellulomonas effusa</i> № 60 CS	83±2,2	45±1,1	96±3,4	43±1,4

**Таблица 4** – Изучение активности целлюлолитических бактерий после года хранения различными методами

Название культуры	диаметр зоны, мм			
	лиофилизация	Под минеральным маслом	10% р-р глицерина при -20 <sup>0</sup> С	В почве
<i>Brevibacterium opacum</i> 103 KSC	38±1,3	22±1,2	18±2,0	-
<i>Flavobacterium auranticus</i> 81/3KSC	30±2,2	26±1,7	20±2,1	-
<i>Brevibacterium erythra</i> 38 KSC	31±2,4	24±1,4	22±2,3	-
<i>Cellulomonas effusa</i> № 60 CS	33±2,0	24±1,1	23±2,4	-

Целлюлолитические бактерии, заложенные на хранение разными методами также сохранили жизнеспособность. Метод лиофилизации обеспечивает самую высокую сохранность жизнеспособности целлюлолитических бактерий (92-96%). При хранении в почве и под минеральным маслом жизнеспособность снижается в 2 раза. При хранении в 10% растворе глицерина при низких температурах жизнеспособность бактерий чуть ниже, чем при хранении методом лиофилизации. Проверка активности целлюлолитических бактерий после года

хранения различными способами показала, что все культуры проявили активность при разных методах хранения, кроме хранения в почве. Самая высокая активность культур наблюдалась при хранении методом лиофилизации (диаметр задержки роста составил 30-38 мм).

Следовательно, наиболее приемлемым методом хранения, при котором сохраняется жизнеспособность и активность коллекционных культур нефтеокисляющих и целлюлолитических бактерий является метод лиофильного высушивания.

### Литература

- 1 Украинская коллекция микроорганизмов. Каталог культур / Под ред. В.С. Подгорского. – Киев: Наукова Думка, 2007. – 237 с.
- 2 Цуцаева А.А., Ананьина А.Е., Балыбердина Л.М., Степанюк Л.В., Павленко Н.В. Опыт долгосрочного хранения промышленных штаммов микроорганизмов // Микробиология. - 2008. –Т.77. -№5. - С. 696-700.
- 3 Рубан Е.Л. Хранение культур микроорганизмов (Обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. -1989. - Т.25. – Вып.3. - С.. 291-301.
- 4 Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения // Микробиология. – 2011. -Т.80. - №6. – С. 842-846.