

**АССОЦИАЦИЯЛАР ҚҰРАМЫНА КІРЕТІН МҰНАЙТОТЫҚТЫРУШЫ  
МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ КУЛЬТИВИРЛЕУ ЖАҒДАЙЛАРЫН ІРІКТЕУ**  
(ҚР БҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК)

*Зерттеу барысында А4, А5 және А6 ассоциацияларының құрамына кіретін микроорганизмдерді культивирлеу жағдайлары және оларды бірге культивирлеу үшін ең қолайлы қатынастары іріктелініп алынды.*

Қазақстан пайдалы қазбалар мен мұнай өндіруде әлемдегі жетекші елдердің бірі болып саналады. Осыған байланысты, негізгі экологиялық проблемалар мұнай және тау-кен өндіру саласындағы өнеркәсіптердің әрекеттерімен тығыз байланысты.

Әлемдік практикада кеңінен қолданылатын рекультивациялық шаралар, қазіргі микробиологиялық рекультивация әдістеріне, мұнайтотықтырушы микроорганизмдердің белсенділігі жоғары штамдарын пайдалануға негізделген. Қоршаған ортадағы нысаналарды мұнай және мұнай өнімдерінен тазалау мақсатында тиімділігі жоғары биопрепараттарды дайындау – тек, штамдардың физиологиялық ерекшеліктерін ескере отырып, ортаның ластану жағдайына бейімделген, көмірсуларын тотықтырушы микроорганизмдер мен асассоциацияларды қолдануға негізделген, және оған оларды өндірудің өзіндік технологиясын жасап шығарған жағдайда ғана мүмкіндік туады [1].

Зерттеу жұмыстың мақсатына: ҚР БҒМ ҒК «Микробиология және вирусология институты» РМК алынған мұнайтотықтырушы микроорганизмдер мен олардың ассоциацияларын культивирлеу жағдайлары мен қоректік орталарды іріктеу жатады.

**Зерттеу әдістері және материалдар**

Зерттеу нысанына мұнайтотықтырушы бактериялардың *Arthrobacter sp.* П-1, 24, К-3, *Candida sp.* культуралары жатады. Культуралар қиғаштап қатырылған қоректік агар ЕПА-да өсірілді. Сұйық қоректік ортаға егу, есертіліп отырған микроорганизмдердің бастапқы культураларын – ЕПА-дан ( $n \times 10^8$  КОЕ/мл) 1% мөлшерде шайынды алынып егіледі. Өсіру 28<sup>0</sup>С температурада 24 және 48 сағат тербелгіште жүргізілді. Ассоциацияларды алу мақсатында, сұйық қоректік ортада өсірілген мұнайтотықтырушы микроорганизмдер тең қатынаста араластырылды.

Бактериялардың тіршілікке қабылетті клеткаларын анықтау ЕПА тығыз қоректік ортасына белгілі сұйылту дәрежесіне сай Петри аяқшасына егу жолымен жүргізілді. Бактериялардың мұнайтотықтыру белсенділігі, 2% шикі мұнай қосылған сұйық қоректік ортада 10 тәулік бойы тербелгіште өсіріліп, олардың мұнайды пайдалану (сіңіру) мүмкіндігі гравиметрикалық әдіспен анықталды.

**Нәтижелер және оларды талдау**

*Arthrobacter sp.* 24 және К-3, *Candida sp.* дрожжылардан құралған А4 ассоциациясына қоректік орталар және оларды культивирлеу жағдайларына іріктеу жүргізілді.

Қоректік орталардың мына нұсқалары сыналды (г/л):

1.  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{CaCl}_2$  – 0,02;  $\text{FeCl}_3$  – 2 тамшы концентрленген ертіндісі;  $\text{NaCl}$  – 10,0; дистилденген су – 1л. дейін

2. Жүгері экстракты – 10,0; дрожжылар ферментализаты – 3,0;  $\text{NaCl}$  – 10,0; су – 1 л. дейін, рН 7,2–7,5

3.  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 2,0;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 3,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,5;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,0;  $\text{CaCl}_2$  – 0,01;  $\text{FeCl}_3$  – 0,05; соя ұны – 5,0; сахароза – 10,0; су – 1 л. дейін, рН 7,0–7,2.

4. ЕПС

5. № 1 қоректік орта нұсқасына + 10г/л қоректік сорпа + 10 г/л сахароза.

Культураларды егер алдында қоректік ортаға 2% мөлшерде мұнай қосылды.

Культивирлеу тербелгіште 10 тәулік бойы жүргізілді. Содан кейін (1–2 тәуліктен соң) тіршілікке қабылетті клеткалардың саны мен мұнайды пайдалану пайызы (10 тәуліктен кейін) анықталды [2].

**Кесте 1** – Сұйық мұнай қосылған әртүрлі қоректік орталарда өскен мұнай тотықтырғыш бактериялардың саны

Қоректік орталардың нұсқалары	Бактериялар штамдары	Бактериялық клеткалар саны, КОЕ/мл	
		1 сутки	2 сутки
1	24	$3,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$

2	24	$2,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$
3	24	$1,6 \times 10^7$	$2,5 \times 10^8$
4	24	$1,2 \times 10^8$	$2,2 \times 10^9$
5	24	$2,0 \times 10^6$	$3,5 \times 10^8$
1	К-3	$2,8 \times 10^8$	$2,4 \times 10^9$
2	К-3	$1,8 \times 10^8$	$2,6 \times 10^9$
3	К-3	$4,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
4	К-3	$1,3 \times 10^7$	$2,0 \times 10^8$
5	К-3	$1,4 \times 10^8$	$3,0 \times 10^9$

Кестеде көрсетілгендей, сынаққа алынған қоректік орталарға 2% сұйық мұнай қосқан кезде, бактериялық клеткалар саны 2-тәулікте көбірек жиналатынын көреміз. Оның үстіне 24 штамм үшін ең жақсы қоректік орта № 4 (ЕПС) болса, К-3 штамын – №№ 1, 2 және 5 қоректік орталарда культивирлеу қолайлы. Қоректік ортаға қою мұнайды қосқанда ең үздік көрсеткішті К3 штамы № 2 және 3, ал 24 штамм – № 3 қоректік орталарда көрсетті.

Жай көзбен бақылау барсында, бір қатар нұсқаларда: екі штаммда да (сұйық мұнай қосылған) № 2 және 4 қоректік орталарда, К-3 штамында сонымен бірге № 3 қоректік ортада (қою мұнай қосылған) 5 тәулікте-ақ мұнайдың ыдырауы байқалады.

К-3 штамын № 2 және 3 орталарда өсіргенде, 10 тәулікте сұйық мұнайды 100%-ға, № 4 ортада № 32,3 % пайдаланды. № 5 қоректік ортада өсірген кезде 24 штамм мұнайды 77% сіңірді.

Культивирлеу мерзімінің ұзақтығы мен аэрацияның қажеттілігі – культураларды ЕПС-да өсіру арқылы анықталды. Аэрацияның қарқаны – тербелгішке арналған көлемдері 50-ден 250 мл болатын 750-мл-лік колбаларға қоректік орта құйып, өсіру арқылы анықталды. Культуралар тербелгіште 28°C температурада 2 тәулік өсірілді.

Сынаққа алынған культураларды ЕПС-да өсірген кезде, бір тәуліктен кейін клеткалардың ең көп мөлшерде ( $1,7-10,0 \times 10^9$  КОЕ/мл дейін) жиналатыны анықталды. 24 штаммды көлемі 50 - 200 мл қоректік ортада өсіргенде биомассаның жиналуы жағынан бәлендей өзгеріс байқалмады, ал қоректік ортаның көлемін 250 мл көтергенде, бактериялық клеткалардың саны  $n \times 10^7$  КОЕ/мл дейін төмендегенін көреміз. Осыған байланысты, мұнайотықтырушы бактериялардың сынаққа алынатын культураларын ферменттерде өсірген кезде, ауаның технологиялық шығыны 0,8-1,0 V/мин (қоректік ортаның көлеміне шаққанда) болды. К3 штамын 50 - 250 мл қоректік ортада өсіргенде, биомассаның жиналуы жағынан ерекше өзгеріс байқалмады. Бұл К3 штамын ферменттерде өсіргенде, ауаның технологиялық шығыны 0, 6V/мин (қоректік ортаның көлеміне шаққанда) артпайтынын көрсетеді.

*Candida sp.* дрожжылары ең көп биомассаны, ВД қоректік ортасына 1 г/л ет-пептонды сорпа мен 1 г/л сахароза қосып даярланған модификацияланған (№ 5 орта) қоректік ортада 1 тәулік өсіргенде және ауаның технологиялық шығыны 0, 6V/мин (қоректік ортаның көлеміне шаққанда) болған жағдайда ғана түзеді.

А4 ассоциациясының құрамына кіретін микроорганизмдер культураларының әр қайсысын, жеке-жеке өсіру қажеттігі анықталды. Микроорганизмдерді жеке өсірген кездегі ассоциацияның мұнайотықтыру белсенділігі 54,7 %, ал бірге культивиргенде – 18,2 % болды.

*Arthrobacter sp.* 24, К-3 и П-1 бактериялары мен *Candida sp.*, дрожжысынан тұратын, А5 және *Arthrobacter sp.* 24, К-3 және П-1 бактерияларынан тұратын А6 ассоциацияларының биомасса жинақтауына жағдайлар іріктеп алынды.

Микроорганизмдердің биомассаны жинақтауы үшін қоректік орта ретінде, ВД мен ЕПС-ға қосымша 1 г/л ет-пептонды сорпа мен 1 г/л сахарозны қосылған орталар сыналды.

Сынаққа алынған культуралар қоректік орталардың екі нұсқасында да бірдей жақсы өсетіні белгілі болды. Соның ішінде *Arthrobacter sp* П-1 культуралары екінші тәулікте клеткаларды мейілінше көп жинақтаса, *Candida sp.*, *Arthrobacter sp.* 24 және К-3 – бірінші тәулікте жинақтайды.

А5 ассоциациясын дайындауда микроорганизмдер үйлесімділігінің 9 нұсқасы алынды (таблица 2).

**Кесте 2** – Микроорганизмдерді өсіру әдісінің А5 ассоциациясы бактерияларының титрі мен мұнайотықтыру белсенділігіне әсері

Тәжірибе нұсқалары	Ассоциация титрі, КОЕ/мл	Бақылаумен салыстырғанда (бірге өсіру), мұнайотықтыру белсенділігінің өсуі, %.
24+К-3+П1; <i>Candida sp.</i>	$5,6 \times 10^6$	22±0,90

24+К-3; П-1+ <i>Candida sp.</i>	$4,1 \times 10^7$	17±0,06
24+ <i>Candida sp.</i> ; К-3+ П-1	$2,4 \times 10^7$	12±0,07
24+ П-1; К-3; <i>Candida sp.</i>	$4,6 \times 10^8$	31±0,30
24+К-3 + <i>Candida sp.</i> ; П-1	$3,9 \times 10^7$	9±0,02
24+ <i>Candida sp.</i> +П-1; К-3	$2,8 \times 10^7$	30±0,40
<i>Candida sp.</i> + П-1+ К-3; 24	$3,0 \times 10^7$	30±0,60
Раздельное культивирование	$1,8 \times 10^8$	30±0,50

А5 ассоциациясы нұсқалары ішінде микроорганизмдер клеткаларын жинақтауы жағынан ең тәуірі, культуралары жеке культивирлеп, соңынан тендей қатынаста ( $2,0 \times 10^8$ ) қосып араластырылған 8-нұсқа мен *Arthrobacter* 24 *Arthrobacter* П-1-мен бірге және *Arthrobacter* К3-ды *Candida sp.*-мен өсіріліп, соңынан тендей қатынаста ( $4,6 \times 10^8$ ) араластырылған 3-нұсқа болатыны анықталды.

Культураларын жеке-жеке өсіріп бірдей қатынаста араластырып дайындалған ассоциация, барлық 4 штамы бірге өсірілген ассоциацияға қарағанда мұнайототықтыру белсенділігі жағынан 30 %-ға артық болды. *Arthrobacter* 24, *Arthrobacter* П-1 және *Candida sp.* культуралары бірге, ал *Arthrobacter* К3 жеке өсірілген 6-нұсқада, және де *Arthrobacter* К3, *Arthrobacter* П-1 және *Candida sp.* бірге, ал *Arthrobacter* 24 жеке өсіріп, соңынан 3:1 қатынаста араластырылған 7-нұсқада да дәл осындай нәтиже алынды.

А6 ассоциациясының құрамына кіретін культураларды жеке-жеке өсірілгенде, оның мұнайототықтыру – 26%, ал 24 және П-1 культураларын бірге, К-3 культурасын жеке өсіріліп, соңынан араластырылған нұсқада – 27 % болды.

Сонымен, зерттеу барысында А4, А5 және А6 ассоциацияларының құрамына кіретін микроорганизмдерді культивирлеу жағдайлары және оларды бірге культивирлеу үшін ең қолайлы қатынастыры іріктелініп алынды.

1. Звягинцев Д.Г., Умаров М.М., Чернов Ю.И. и др. Микробиологические сообщества и их функционирование в процессах деградации и самовосстановления почв / Деградация и охрана почв/ Под ред. Г.В.Добровольского. М.Изд-во МГУ, 2002. С.441-445.

2. Гаврилова Н.Н., Айткельдиева С.А., Ратникова И.А., Треножникова Л.П., Баякишева К., Хасенова А.Х. Подбор условий культивирования нефтеокисляющих бактерий // Биотехнология. Теория и практика. – 2010. - №3. – С. 15-18.

\*\*\*

Подобраны условия культивирования микроорганизмов, входящих в состав ассоциаций А4, А5 и А6 и оптимальные их соотношения для совместного культивирования.

\*\*\*\*

The conditions for cultivation of microorganisms belonging to the association, А4, А5 and А6 and their relationship to the optimal co-cultivation.

**Р.К. Блиева**

## **ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ И СЕЛЕКЦИЯ МИКРОМИЦЕТОВ-ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ**

(РГП «Микробиология және вирусология институты» КН МОН РК)

*В статье представлены результаты многолетних исследований о путях увеличения биосинтеза жизненно необходимых для различных отраслей промышленности и сельского хозяйства энзимов. Показана необходимость изучения физиологической регуляции направленного биосинтеза ферментов, разработан новый более продуктивный и экономичный способ выращивания микромицетов на подложке в нитчато-губчатый структуре. Разработан перспективный способ селекции микромицетов-продуцентов ферментов, позволяющий не только восстановить утерянную активность культур, но и увеличить ее активность от 3 до 10 раз, а в некоторых случаях до 30 раз.*

Одной из центральных задач современной микробиологии является направленный биосинтез таких востребованных и важных активных веществ как ферменты и разработка способов повышения их образования. При отработке технологии получения ферментов необходимо стремиться к возможно более полному использованию биологического потенциала применяемых штаммов микроорганизмов и вести процесс биосинтеза с максимальной интенсивностью. Зная основные биологические возможности выбранных продуцентов ферментов и параметры их образования, можно создать необходимые условия культивирования и получить заданную производительность ферментационного процесса.

Значительное количество гидролитических ферментов образуют некоторые штаммы микромицетов и бактерий. Но большей агрессивностью в расщеплений органических субстратов