

УДК 579.23

К. М. КЕБЕКБАЕВА, Э. Р. ФАЙЗУЛИНА,  
А. К. ДЖОБУЛАЕВА, А. В. МЕДВЕДЕВА, Г. Т. ДЖАКИБАЕВА

## ПОДБОР МЕТОДОВ ХРАНЕНИЯ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г. Алматы

Были подобраны методы хранения для нефтеокисляющих микроорганизмов из коллекции Института микробиологии и вирусологии. Показано, что при закладке на хранение разными способами не все исследуемые штаммы сохранили нефтеокисляющую активность. Все три метода хранения оказались приемлемыми только для двух культур: *Micrococcus roseus* 40, *Micrococcus roseus* 49. Остальные культуры хоть и сохранили жизнеспособность, но нефтеокисляющую активность проявляли не при всех методах хранения.

Среди научных и практических задач, связанных со штаммами микроорганизмов, важное значение имеет надежная консервация культур, длительное сохранение их в исходном состоянии. Практическое значение проблемы связано с возрастающей потребностью микробиологической науки и промышленности постоянно иметь в своем распоряжении жизнеспособные и стабильные культуры.

Поддержание микроорганизмов в жизнеспособном состоянии требует изучения и использования различных методов хранения и состава питательных сред [1, 2]. Используемые методы не всегда являются универсальными, так как различные группы микроорганизмов имеют различную устойчивость к методам консервации.

Природная изменчивость микроорганизмов, обеспечивающая их приспособляемость и выживаемость в неблагоприятной среде и способствующая появлению мутантов, одновременно обуславливает проблему хранения [3]. Поэтому выбор способа хранения индивидуален для каждой культуры и даже штамма.

Целью наших исследований являлся подбор методов хранения для нефтеокисляющих микроорганизмов из коллекции Института микробиологии и вирусологии.

### Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования служили коллекционные штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов: *Micrococcus roseus* 40, *Micrococcus roseus* 49, *Acinetobacter calcoaceticus* 48, *Rhodococcus maris* 65, *Rhodococcus* sp. 7A, *Microbacterium lacticum* 41-3, *Bacillus firmus* 72, *Pseudomonas pseudomallei* 47. Культуры хранились в течение года на сконченном агаре под минеральным маслом, методом пересева при 4 °C и в 10% растворе глицерина при низких температурах (-20 °C).

Жизнеспособность нефтеокисляющих микроорганизмов определяли следующим образом: культуры пересевали на пробирки с рыбно-пептонным агаром (РПА) и выращивали в течение суток в термостате при температуре 28 °C. Методом предельных разведений высевали нефтеокисляющие культуры на чашки Петри и подсчитывали число выросших колоний.

Нефтеокисляющую активность культур проверяли на жидкой среде Ворошиловой-Диановой (ВД) с добавлением 1% нефти. 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.

### Результаты исследования и их обсуждение

Исследуемые штаммы нефтеокисляющих микроорганизмов хранились в коллекции разными способами: методом пересева, под минеральным маслом и в 10% растворе глицерина при низких температурах. Эффективность данных способов хранения штаммов оценивали по жизнеспособности микроорганизмов и нефтеокисляющей активности.

Таблица 1. Число колоний, образуемых жизнеспособными клетками нефтеокисляющих микроорганизмов

Название культур	Жизнеспособность, КОЕ, мл		
	метод пересева (4 °C)	под минеральным маслом (4 °C)	в 10% р-ре глицерина при низких температурах (-20 °C)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 48	40x10 <sup>6</sup>	50x10 <sup>6</sup>	70x10 <sup>6</sup>
<i>Bacillus firmus</i> 72	30x10 <sup>7</sup>	40x10 <sup>7</sup>	40x10 <sup>7</sup>
<i>Micrococcus roseus</i> 40	12x10 <sup>5</sup>	33x10 <sup>5</sup>	30x10 <sup>7</sup>
<i>Micrococcus roseus</i> 49	45x10 <sup>6</sup>	40x10 <sup>6</sup>	36x10 <sup>6</sup>
<i>Microbacterium lacticum</i> 41-3	25x10 <sup>6</sup>	20x10 <sup>6</sup>	36x10 <sup>5</sup>
<i>Rhodococcus maris</i> 65	20x10 <sup>7</sup>	11x10 <sup>7</sup>	40x10 <sup>7</sup>
<i>Rhodococcus</i> sp. 7A	36x10 <sup>6</sup>	10x10 <sup>6</sup>	21x10 <sup>7</sup>
<i>Pseudomonas pseudomallei</i> 47	50x10 <sup>7</sup>	13x10 <sup>7</sup>	25x10 <sup>7</sup>

Результаты исследования по изучению жизнеспособности нефтеокисляющих микроорганизмов, хранящихся разными методами, представлены в табл. 1.

В результате проведенных исследований оказалось, что наибольшее число жизнеспособных клеток образуется при хранении в 10% растворе глицерина при низких температурах. У культур *M. roseus* 40, *Rhodococcus* sp. 7A при хранении этим методом при высеивании на агаризованную среду количество колоний было на порядок выше, чем при хранении методом пересева.

Наименьшая жизнеспособность отмечена у штамма *M. roseus* 40 при хранении под минеральным маслом и методом пересева. На порядок больше жизнеспособных клеток выявлено у культур *M. roseus* 49, *Microbacterium lacticum* 41-3, *Rhodococcus* sp. 7A, *A. calcoaceticus* 48. Наибольшее число колоний образовывали *B. firmus* 72, *Rh. maris* 65, *P. pseudomallei* 47. Хранение нефтеокисляющих культур под минеральным маслом дало такой же результат, что и при хранении методом пересева.

Таким образом, результаты исследований показали, что хранение нефтеокисляющих культур в 10% растворе глицерина при низких температурах (табл. 1) дает такой же результат, что и хранение методом пересева, а некоторые нефтеокисляющие культуры – *M. roseus* 40 и *Rhodococcus* sp. 7A хранятся даже лучше.

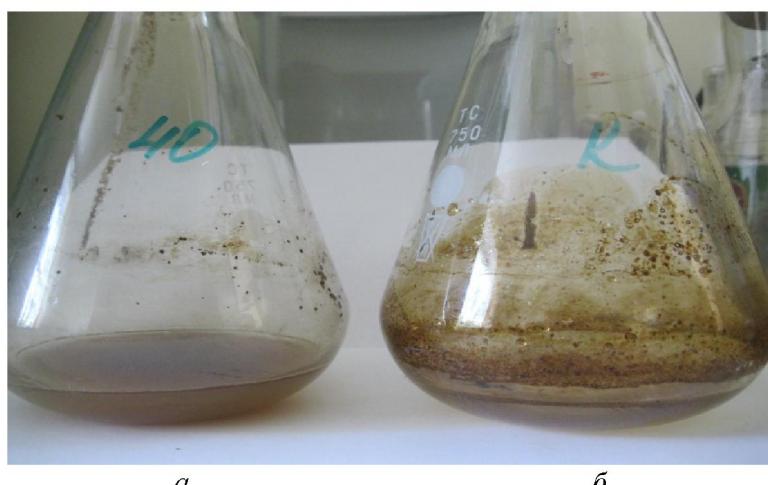
Далее была изучена нефтеокисляющая активность коллекционных штаммов (табл. 2).

Таблица 2. Нефтеокисляющая активность штаммов, заложенных разными методами

Название культур	Деструкция нефти		
	метод пересева(4 °C)	под минеральным маслом (4 °C)	в 10% р-ре глицерина при низких Т° (-20 °C)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> 48	Нефтяная пленка не исчезла	Нефтяная пленка не исчезла	Нефтяная пленка не исчезла
<i>Bacillus firmus</i> 72	Частично сохранилась нефтяная пленка	Частично сохранилась нефтяная пленка	Частично сохранилась нефтяная пленка
<i>Micrococcus roseus</i> 40	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц
<i>Micrococcus roseus</i> 49	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц
<i>Microbacterium lacticum</i> 41-3	Нефтяная пленка не исчезла	Нефтяная пленка не исчезла	Нефтяная пленка не исчезла
<i>Rhodococcus maris</i> 65	Нефтяная пленка не исчезла	Нефтяная пленка не исчезла	Частично сохранилась нефтяная пленка
<i>Rhodococcus</i> sp. 7A	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка не исчезла
<i>Pseudomonas pseudomallei</i> 47	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка исчезла, нефть в виде мелких взвешенных частиц	Нефтяная пленка не исчезла

В результате проведенных опытов установлено, что хранение методом пересева отрицательно сказалось на нефтеокисляющей активности следующих штаммов: *A. calcoaceticus* 48, *B. firmus* 72, *Micr. lacticum* 41-3, *Rh. maris* 65. Рост этих культур был очень слабым, и нефтяная пленка сохранилась на поверхности. Аналогичная картина наблюдалась при хранении этих культур и под вазелиновым маслом, и при хранении в 10% растворе глицерина. У двух культур: *M. roseus* 40, *M. roseus* 49 при высеивании на жидкую среду ВД наблюдался прирост биомассы, и нефтяная пленка превратилась в мелко-дисперсную взвесь при проверке после хранения всеми тремя методами. У культур *Rhodococcus* sp., 7A *P.pseudomallei* 47, хранившихся методом пересева и под минеральным маслом, наблюдался прирост биомассы и деструкция нефтяной пленки. Но эти культуры, хранящиеся в 10% р-ре глицерина, при высеивании на жидкую среду ВД не проявляли нефтеокисляющей активности.

На рис. 1-3 показана деструкция нефти на примере культуры *M. roseus* 40. При культивировании *M. roseus* 40, хранившейся под минеральным маслом, на жидкой среде В-Д с 1% нефтью наблюдался прирост биомассы, и нефтяная пленка была представлена мелко-дисперсной взвесью. Если в контрольном варианте нефть была как на стенках колбы, так и на поверхности среды, то в опытном образце на стенках колбы видны лишь следы нефти и гомогенная выросшая культура *M. roseus* 40.



**Рис. 1.** Нефтеокисляющая активность штамма *M. roseus* 40, хранящегося методом пересева:  
а – штамм *M.roseus* 40, б – контроль



**Рис. 2.** Нефтеокисляющая активность штамма *M. roseus* 40, хранящегося под минеральным маслом:  
а – штамм *M. roseus* 40, б – контроль

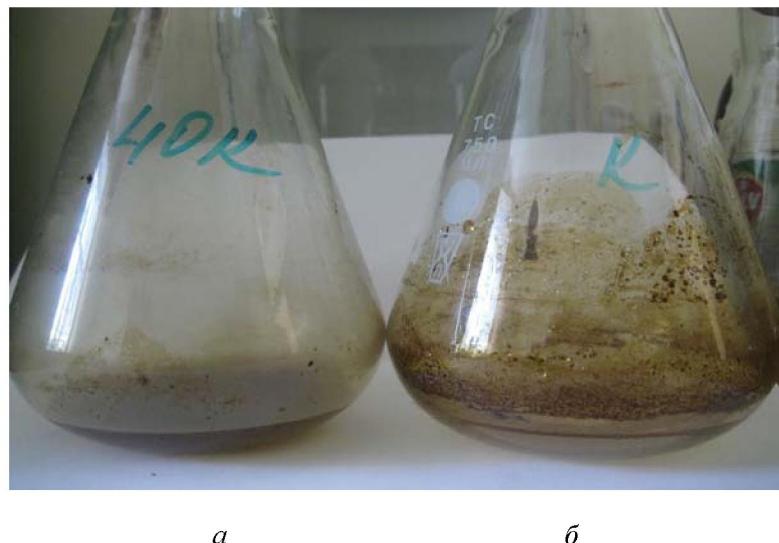


Рис. 3. Нефтеокисляющая активность штамма *M. roseus* 40, хранящегося в 10% растворе глицерина при низких температурах: а – штамм *M. 40*, б – контроль

Таким образом, из приведенных результатов видно, что не все исследуемые штаммы сохранили нефтеокисляющую активность при закладке на хранение разными способами. Все три метода хранения оказались приемлемыми только для двух культур: *M.roseus* 40, *M.roseus* 49. Остальные культуры хоть и сохранили жизнеспособность, но нефтеокисляющую активность проявляли не при всех методах хранения.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Пучков Е.О. Методы определения содержания и жизнеспособности микроорганизмов // Биотехнология. – 1988. – Т. 4, № 1. – С. 132-142.
- Касымбекова С.С. Подбор оптимальных защитных сред для длительного хранения культур микроорганизмов в криоконсервированном виде // Вестник КазНУ. Сер. биологическая. – 2011. – № 2(48), ч. 1. – С. 157.
- Сидякина Т.М. Консервация микроорганизмов в коллекциях культур // В сб. «Консервация генетических ресурсов» АН СССР, Пушкинский научный центр, Институт биофизики. – Пущино, 1991.

*K. M. Kebekbaeva, Э. Р. Файзулна, А. К. Жобулаева, А. В. Медведева, Г. Т. Жакыбаева*

#### МҰНАЙ ТОТЫҚТЫРҒЫШ МИКРООРГАНИЗМДІ САҚТАУ ТАҢДАУ ӘДІСТЕРИ

Микробиология және вирусология институтының коллекциясынан алғынған мұнай тотықтырғыш микроорганизмдер үшін сақтау әдістері таңдалынып алынды. Әртүрлі әдістермен сақтауда зерттелінген кейір штамдар өздерінің мұнай тотықтырғыш белсенделілігін сақтап қалмағандығын көрсетті. Барлық үш сақтау әдістері тек ғана екі культураға *Micrococcus roseus* 40, *Micrococcus roseus* 49 қолайлы болып табылды. Қалған культуралар тіршілікке қабілеттілігін сақтап қалғанымен, бірақ мұнай тотықтырғыш белсенделілігін сақтаудың барлық әдістерін де көрсетпеді.

*K. M. Kebekbayeva, Ey. R. Faizulina, A. K. Dzhobulayeva, A. V. Medvedeva, G. T. Dzhakibayeva*

#### SELECTION STORAGE METHOD OXIDIZING MICROORGANISMS

The methods of storage for oil-oxidizing of microorganisms from collection of Institute of microbiology and virology were selected. Are showed, that under laying for storage different of methods not all investigation of strains oil-oxidizing activity were kepted. All three methods of storage show preference only for two cultures: *Micrococcus roseus* 40, *Micrococcus roseus* 49. The rest of culture the viability were kepted, but oil-oxidizing of activity were showed not at all methods of storage.