УДК579.083.13

И. Э. СМИРНОВА, Р. ГАЛИМБАЕВА, Г. С. МАХМУДОВА,
К. М. КЕБЕКБАЕВА, А. К. ДЖОБУЛАЕВА

ОПТИМИЗАЦИЯ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ НА ОСНОВЕ ПОДБОРА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

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

Необходимым условием поддержания генофонда микроорганизмов, является сохранение в течение длительного времени жизнеспособности, таксономических свойств и физиологической активности коллекционных штаммов, для чего требуется подбор соответствующих условий консервации с последующей реактивацией микроорганизмов. В статье приводятся данные по подбору питательных сред для оптимизации жизнедеятельности целлюлолитических бактерий *Bacillus cytaseus ИМВ В-52, Cellulomonas effusa ИМВ В-46, Brevibacterium erythra ИМВ В - 16, Brevibacterium opacum ИМВ В-14, Flavobacterium aurantiacum ИМВ В-15*, находящихся на длительном хранении, а также влияние источников азота, углерода, биологически активных веществ на накопление биомассы и целлюлазную активность целлюлолитических бактерий.

Известно, что целлюлолитические бактерии находят широкое применение в различных отраслях биотехнологии и сельском хозяйстве [1-4]. Расширение практического использования данных микроорганизмов в различных отраслях биотехнологии и сельского хозяйства ставит задачу как более углубленного изучения целлюлолитических бактерий, так и получения стабильных вариантов целлюлолитических бактерий, превосходящих по всей целлюлазной активности исходные культуры. С целью оптимизации жизнедеятельности целлюлолитических бактерий проведен подбор питательных сред для их культивирования.

Материалы и методы

Из коллекции Института микробиологии и вирусологии были взяты пять штаммов целлюлолитических бактерий*: Bacillus cytaseus ИМВ В-52, Cellulomonas effusa ИМВ В-46, Brevibacterium erythra ИМВ В-16, Brev. opacum ИМВ В-14, Flavobacterium aurantiacum ИМВ В-15,* находящихся на длительном хранении и имеющих производственно-ценное значение. Оптимизацию жизнедеятельности проводили по трем параметрам: накопление биомассы, скорость роста и биосинтез целлюлаз. В качестве сред культивирования использовали элективные среды: жидкую и твердую среду Гетчинсона с 2% пшеничной соломы, с 2% пшен. отрубями, с 2% кукурузной соломы и среду Гоулда-Декстера. В качестве источников азота использовали нитриты, нитраты, аммонийные соли, мочевину и аминокислоты – аланин, лейцин, триптофан, в качестве белковой формы азота использовали кукурузную и соевую муку и пептон. В качестве биологически активных веществ использовали дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт, пептон и травяной отвар. Целлюлазную активность определяли по диаметру зон гидролиза твердой среды с 0,1% Na-КМЦ после ее окрашивания раствором конго-рот и соответственного пересчета, и выражали в ед./мл [1].

Результаты и обсуждение

Для оптимизации жизнедеятельности целлюлолитических бактерий *B. cytaseus ИМВ В-52* и *C. effusa ИМВ В-46* проведен подбор питательных сред для их культивирования, результаты которых приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что для оптимизации жизнедеятельности культур бактерий *B. cytaseus ИМВ В-52* и *C. effusa ИМВ В-46* по выбранным параметрам лучшие результаты получены при использовании жидких сред культивирования. Лучшей средой для накопления биомассы для штамма *B. cytaseus ИМВ В-52* является среда РПБ, на этой же среде отмечалась наибольшая удельная скорость роста, при этом активность целлюлазного комплекса была наименьшая. На среде Гетчинсона с пшеничными отрубями накопление биомассы и удельная скорость роста была несколько ниже, чем на среде РПБ, а активность целлюлазного комплекса практически

Таблица 1. **Влияние среды культивирования на жизнедеятельность целлюлолитических бактерий**

Среда	АСБ, г/л	Уд. скорость роста, $ч^{-1}$	Целлюлазная активность, ед./мл
Bacillus cytaseus ИМВ В-52			
Твердые среды			
РПА	2,4±0,2	0,4±0,01	2,0±0,2
Гетчинсона с 2 % пшеничной соломой	1,6±0,1	0,3±0,01	3,8±0,3
Гетчинсона с 2 % пшен. отрубями	2,2±0,2	0,6±0,03	3,5±0,3
Гетчинсона с 2 % кукурузной соломой	1,8±0,1	0,4±0,02	3,6±0,2
Гоулда-Декстера	1,5±0,1	0,6±0,02	3,4±0,2
Жидкие среды			
РПБ	2,8±0,2	0,8 ±0,04	2,2±0,1
Гетчинсона с 2 % пшеничной соломой	2,4±0,2	0,4±0,02	3,9±0,3
Гетчинсона с 2 % пшен. отрубями	2,6±0,1	0,6±0,02	3,7±0,2
Гетчинсона с 2 % кукурузной соломой	1,4±0,1	0,5±0,01	3,5±0,2
Гоулда-Декстера	1,3±0,1	0,6±0,02	3,4±0,1
Cellulomonas effusa ИМВ В-46			
Твердые среды			
РПА	1,4±0,1	0,8±0,03	3,0±0,1
Гетчинсона с 2 % пшеничной соломой	1,0±0,1	0,3±0,01	4,2±0,3
Гетчинсона с 2 % пшен. отрубями	1,9±0,2	0,4±0,02	4,1±0,2
Гетчинсона с 2 % кукурузной соломой	1,1±0,1	0,4±0,02	3,8±0,2
Гоулда-Декстера	1,1±0,1	0,6±0,03	3,6±0,2
Жидкие среды			
РПБ	2,0±0,1	0,9±0,02	3,0±0,1
Гетчинсона с 2 % пшеничной соломой	1,2±0,1	0,4±0,01	4,4±0,3
Гетчинсона с 2 % пшен. отрубями	2,4±0,2	0,5±0,02	4,2±0,2
Гетчинсона с 2 % кукурузной соломой	1,5±0,1	0,4±0,01	4,2±0,2
Гоулда-Декстера	1,3±0,1	0,7±0,02	3,6±0,1

на уровне активности культуры, выращенной на среде Гетчинсона с пшеничной соломой. Максимальную удельную скорость роста у штамма *C. effusa ИМВ В-46* отмечали на среде РПБ, в то время как наибольшее накопление биомассы было на среде Гетчинсона с пшеничными отрубями. Активность целлюлаз у обоих штаммов отмечали на среде с Гетчинсона с пшеничной соломой. Таким образом, подбирая среду культивирования, вполне возможно получать культуры с высокой скоростью роста, быстрым накоплением биомассы или с высокой целлюлазной активностью или культуры, сочетающие необходимые производственно-ценные показатели в зависимости от требования производства. При изучении влияния источников азота на накопление биомассы, биосинтез каротина и целлюлазную активность у трех штаммов целлюлолитических бактерий, *Brevibacterium erythra ИМВ В-16, Brevibacteriu. opacum ИМВ В-14, Flavobacterium aurantiacum ИМВ В-15,* находящиеся на хранении в коллекции Института более 10 лет и заложенных в качестве перспективных для получения кормового. Исследования проводились на среде Гетчинсона, в качестве источников азота использовали нитриты, нитраты, аммонийные соли, мочевину и аминокислоты – аланин, лейцин, триптофан. В качестве белковой формы азота использовали кукурузную и соевую муку и пептон (табл. 2).

Из данных табл. 2 видно, что максимальное накопление биомассы отмечали на средах с органическими источниками азота – кукурузной и соевой мукой, а лучшим неорганическим источником азота для накопления биомассы оказался сульфат аммония. Исследование влияние источника азота на биосинтез каротина показало, что наиболее благоприятным для синтеза каротина была аммонийная форма азота, несколько хуже – нитратная форма азота. Самый низкий выход каротина отмечали на среде с хлоридом натрия. Добавление в среду некоторых аминокислот в качестве единственного источника азота повышает синтез каротина, однако, уровень синтеза каротина не превышает таковой, полученный на среде с аммонийной формой азота. Органические источники азота: кукурузная, соевая мука, пептон и мочевина увеличивают выход биомассы, но при этом не повышают синтез каротина клетками бактерий. Максимальную целлюлазную

Таблица 2. **Влияние источников азота на накопление биомассы, биосинтез каротина и целлюлазную активность бактерий**

Источник азота	Содержание, %	*Brev. erythra ИМВ В-16*			*Brev. opacum ИМВ В-14*			*F. aurantiacum ИМВ В-15*		
		АСБ, г/ л	каротин, мкг/г АСБ	КМЦ-аза, ед./мл	АСБ, г/ л	каротин, мкг/г АСБ	КМЦ-аза, ед./мл	АСБ, г/ л	каротин, мкг/г АСБ	КМЦ-аза, ед./мл
$NaNO_3$	0,1	3,0±0,2	31,6±2,3	3,0±0,3	2,9±0,1	34,4±2,3	2,4±0,2	3,0±0,2	34,6±2,3	3,7±0,3
	0,25	3,2±0,2	34,8±2,3	3,2±0,2	3,0±0,1	35,6±2,3	2,5±0,2	3,2±0,2	36,8±2,3	3,8±0,3
	0,5	3,0±0,1	30,6±2,3	2,9±0,1	2,8±0,1	32,9±2,2	2,3±0,1	2,9±0,1	36,2±2,3	3,5±0,21
$NaNO_2$	0,1	2,2±0,1	26,6±2,2	1,0±0,09	2,0±0,1	28,9±2,1	1,0±0,08	2,0±0,1	28,9±2,2	0,9±0,08
	0,25	2,6±0,1	28,4±2,2	1,2±0,1	2,3±0,1	30,7±2,1	1,2±0,09	2,3±0,1	30,3±2,2	1,0±0,09
	0,5	2,3±0,1	25,2±2,2	1,1±0,08	2,1±0,1	29,7±2,0	1,1±0,08	2,2±0,1	29,9±2,1	1,1±0,08
$(NH_4)_2SO_4$	0,1	3,2±0,2	33,6±2,2	2,6±0,1	3,4±0,1	35,3±2,3	3,6±0,1	3,2±0,2	36,0±2,3	3,2±0,3
	0,25	3,4±0,1	35,8±2,4	2,8±0,1	3,6±0,1	36,7±2,4	3,7±0,3	3,5±0,3	36,4±2,3	3,4±0,3
	0,5	2,8±0,2	32,6±2,4	2,6±0,1	3,3±0,1	34,6±2,2	3,4±0,3	3,3±0,2	35,8±2,3	3,2±0,2
NH_4Cl	0,1	1,5±0,1	10,4±2,2	2,0±0,2	1,6±0,1	9,9±1,0	1,0±0,09	1,9±0,1	9,6±2,2	2,0±0,1
	0,25	1,8±0,1	11,4±2,2	2,2±0,2	1,9±0,1	10,9±1,2	1,2±0,09	2,1±0,1	9,9±2,2	2,1±0,1
	0,5	1,4±0,1	9,9±0,8	2,1±0,1	1,4±0,1	9,8±2,2	1,1±0,08	2,0±0,1	9,9±1,2	1,9±0,1
Пептон	0,1	3,0±0,1	24,8±2,1	3,1±0,2	3,5±0,1	22,4±2,2	3,2±0,2	3,6±0,1	20,1±1,2	3,3±0,2
	0,25	3,4±0,2	25,4±2,1	3,2±0,3	3,6±0,1	23,8±1,1	3,6±0,3	3,8±0,3	20,6±2,2	3,4±0,2
	0,5	3,6±0,1	23,3±2,3	3,0±0,1	3,8±0,1	21,9±2,2	3,8±0,3	3,9±0,3	19,8±1,2	3,3±0,2
Мочевина	0,1	3,5±0,1	22,5±2,1	3,0±0,1	3,7±0,1	20,5±2,2	3,2±0,1	3,6±0,3	23,6±2,0	3,2±0,2
Аланин	0,1	3,0±0,2	30,6±2,1	3,0±0,2	3,1±0,1	27,8±2,2	3,1±0,1	2,8±0,1	27,8±2,1	3,0±0,1
Лейцин	0,1	3,2±0,1	30,4±2,2	2,9±0,1	3,0±0,1	27,4±2,2	3,0±0,1	3,1±0,1	27,6±2,1	3,1±0,1
Триптофан	0,1	3,1±0,1	28,8±2,1	3,1±0,1	3,1±0,1	27,1±2,2	2,8±0,1	3,0±0,2	29,9±2,1	2,8±0,1
Кукурузная мука	2,0	6,5±0,3	27,8±2,2	2,6±0,2	6,6±0,1	29,9±2,0	2,8±0,1	6,4±0,4	32,1±2,2	3,0±0,2
Соевая мука	2,0	7,2±0,3	28,5±2,1	2,5±0,1	7,1±0,1	30,1±2,3	2,9±0,1	7,2±0,4	30,2±2,2	3,1±0,2

активность отмечали для двух штаммов рода *Brevibacterium* на среде с сернокислым аммонием, для штамма *F. aurantiacum ИМВ В-15* на среде с нитратной формой азота. На органических источниках азота – кукурузной и соевой муки, пептоне и мочевине активность целлюлазного комплекса достаточно высокая, но ниже чем на среде с сернокислым аммонием. Хлорид аммония оказывал угнетающее действие на биосинтез целлюлаз. Наиболее интенсивный синтез каротина у всех штаммов отмечали на среде с пшеничной соломой. Однако на среде с глюкозой для штаммов рода *Brevibacterium* и на среде с лактозой для штамма *F. aurantiacum ИМВ В-15* синтез каротина был незначительно ниже, чем на среде с пшеничной соломой (табл. 3).

Таблица 3. **Влияние источников азота на накопление биомассы, биосинтез каротина и целлюлазную активность бактерий**

Источник углерода	*Brev. erythra ИМВ В-16*			*Brev. opacum ИМВ В-14*			*F. aurantiacum ИМВ В-15*		
	АСБ, г/ л	каротин, мкг/г АСБ	КМЦ-аза, ед./мл	АСБ, г/ л	каротин, мкг/г АСБ	КМЦ-аза, ед./мл	АСБ, г/ л	каротин, мкг/г АСБ	КМЦ- аза, ед./мл
Арабиноза	2,1±0,1	11,2±1,3	2,4±0,2	2,2±0,1	12,8±1,3	2,3±0,2	1,8±0,1	10,4±1,2	2,1±0,2
Ксилоза	1,9±0,1	15,7±1,5	2,2±0,2	2,0±0,1	16,4±1,6	2,4±0,2	1,9±0,1	12,4±1,3	2,2±0,3
Глюкоза	3,4±0,3	37,8±2,3	1,8±0,1	3,6±0,2	38,5±2,8	1,6±0,1	3,7±0,3	34,4±2,4	1,6±0,1
Фруктоза	2,8±0,2	34,9±2,0	2,3±0,1	2,8±0,1	36,4±2,4	2,2±0,2	3,0±0,2	30,2±2,0	2,2±0,2
Лактоза	3,0±0,2	36,4±2,4	3,5±0,3	3,4±0,3	37,2±2,6	3,6±0,3	3,9±0,3	38,2±2,7	3,7±0,3
Мальтоза	3,2±0,2	35,8±2,3	2,4±0,2	3,3±0,2	37,9±2,4	2,3±0,2	3,5±0,3	36,6±2,3	2,3±0,2
Сахароза	2,6±0,1	34,3±2,2	2,1±0,1	3,5±0,3	34,7±2,3	2,2±0,2	3,2±0,1	32,8±2,3	2,1±0,2
Пшеничная солома	3,0±0,2	38,0±2,8	3,8±0,3	3,1±0,3	39,3±2,8	3,7±0,3	3,1±0,2	38,6±2,7	3,8±0,3
Кукурузная солома	2,8±0,1	37,4±2,6	3,6±0,3	2,9±0,1	38,0±2,5	3,5±0,3	3,0±0,2	36,4±2,5	3,6±0,3
Фильтровальная бумага	2,0±0,1	21,4±2,6	1,3±0,1	1,9±0,1	19,6±2,3	1,2±0,1	1,8±0,1	19,4±2,0	1,3±0,1
Na-КМЦ	1,8±0,1	12±1,3	1,2±0,1	1,6±0,1	10,5±1,3	1,0±0,1	1,5±0,1	9,8±1,0	1,1±0,1

Наименьшее накопление каротина для всех штаммов отмечали при росте на среде с пентозами – ксилозе и арабинозе и на среде с Na-КМЦ в качестве единственного источника углерода.

При изучении влияния биологически активных веществ на накопление биомассы и целлюлазную активность исследуемых штаммов бактерий, в качестве биологически активных веществ использовали дрожжевой экстракт, кукурузный экстракт, пептон и травяной отвар. Эти вещества вносили в среду Гетчинсона в количестве 1 %. Контролем служила среда без добавок. Данные о влиянии биологически активных веществ на целлюлазную активность представлены в табл. 4.

Таблица 4. **Влияние биологически активных веществ на целлюлазную активность бактерий, ед./мл**

Штамм	Контроль	Дрожжевой экстракт	Кукурузный экстракт	Пептон	Травяной отвар
Brev. erythra ИМВ В-16	3,6±0,2	4,3±0,3	4,0±0,3	3,9±0,2	3,8±0,2
Brev. opacum ИМВ В-14	3,7±0,2	4,2±0,3	4,1±0,3	3,8±0,2	3,9±0,2
F. aurantiacum ИМВ В-15	3,6±0,2	4,4±0,3	4,3±0,3	4,1±0,3	4,2±0,3

Табл. 4 наглядно демонстрирует, что введение в среду биологически активных веществ положительно сказывается на активности целлюлаз бактерий. Показано, что все биологически активные вещества повышали выход биомассы. Максимальное накопление биомассы отмечали на среде с дрожжевым экстрактом.

Источник углерода существенно влияет на накопление биомассы, биосинтез каротина и целлюлазную активность исследуемых штаммов бактерий. Максимальное накопление биомассы отмечали для штаммов рода *Brevibacterium* на среде с глюкозой, а для штамма *F. aurantiacum ИМВ В-15* на среде с лактозой. Наиболее интенсивный синтез каротина у всех штаммов отмечали на среде с пшеничной соломой.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Смирнова И.Э., Саубенова М.Г.* Способ биологической стимуляции всхожести семян и роста растений пшеницы // Предпатент РК № 4900, опубл. 15.08.1997, бюл. № 3.

2. *Смирнова И.Э., Саубенова М.Г.* Способ биологической стимуляции всхожести семян // Предпатент РК № 8751, опубл. 14.04.2000, бюл. № 4.

3. *Нелидов С.Н, Саубенова М.Г. Смирнова И.Э.* Спопсоб мелиорации засоленных почв под культуру риса // Авт. свид. СССР № 1740358, опубл. 15.06.92, бюл. № 22.

4. *Смирнова И.Э., Саубенова М.Г.* Целлюлолитические азотфиксирующие бактерии для протеинизации грубых кормов // Прикл. биохим. и микробиол. 2001. 37, № 1. С .87-89.

5. *Смирнова И.Э., Саубенова М.Г.* Способ биологической защиты сельскохозяйственных растений от фитопатогенных грибов и бактерий // Предпатент РК № 13287, опубл. 15.08.2003, бюл. № 8.

6. *Егоров Н.С.* Практикум по микробиологии. М.: Моск. универ., 1976. 307 с.

7. *Смирнова И.Э., Саубенова М. Г., Олейникова Е.А.* Целлюлолитические бактерии – антагонисты фитопатогенных бактерий // Вестник Государственного агроэкологического университета МАП Украины. 2005. № 6.

8. *Олейникова Е. А., Смирнова И. Э., Саубенова М. Г.* Целлюлолитические бактерии – антагонисты микромицетов возбудителей дерматомикозов // Изв. НАН РК. Сер. биол. и мед. 2006. № 2. С. 87-90.

Резюме

Микроорганизмдер генофондын қолдауға қажетті жағдайлар коллекциялық штамдардың физиологиялық белсенділігі мен таксономикалық қасиеттерін және ұзақ уақыт аралығында тіршілікке қабілеттілігін сақтау болып табылады, ол үшін микроорганизмдер реактивациясына сәйкес консервация жағдайларын таңдау қажет. Бұл мақалада ұзақ уақыт сақтауда тұрған целлюлолитикалық бактериялардың *Bacillus cytaseus ИМВ В-52, Cellulomonas effusa ИМВ В-46, Brevibacterium erythra ИМВ В-16, Brev. opacum ИМВ В-14, Flavobacterium aurantiacum ИМВ В-15* өмірсүргіштігін тұрақтандыру үшін қоректік орталардың іріктеуі жүргізілді, сонымен қатар целлюлолиттік бактериялардың целлюлазды белсенділігі мен биомасса жинақтауына биологиялық белсенді заттардың, көмірсулардың, азот көздерінің әсер етуі туралы мәліметтер келтірілген.

Summary

In order to keep the gene pool of microorganisms is to maintain for a long time viability of taxonomic properties and physiological activity of collection strains, which require the selection of appropriate conditions for preservation, followed by reactivation of microorganisms. The article provides data on the selection of culture media for the optimization of life cellulolytic bacteria *Bacillus cytaseus ИМВ В-52, Cellulomonas effusa ИМВ В-46, Brevibacterium erythra ИМВ В-16, Brev. opacum ИМВ В-14, Flavobacterium aurantiacum ИМВ В-15,* are on long-term storage, as well as the impact of sources of nitrogen, carbon, biological active substances on the accumulation of biomass and cellulase activity of cellulolytic bacteria.