



УДК 636.597:612.1:619; 631.95:631.461:579.841.11

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КСЕРО- И ТЕРМОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

*Н.Н. Гаврилова, С.А. Айткельдиева, И.А. Ратникова, Л.П. Треножникова,
А.Х. Хасенова, К. Баякышова*

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, г. Алматы

Изучены ксеро- и термочувствительность нефтеокисляющих микроорганизмов. Полученные результаты могут быть полезны для оптимального подбора режима распылительного высушивания препаратов на основе нефтеокисляющих микроорганизмов и для выбора оптимальной коммерческой формы препаратов.

Ключевые слова: нефтеокисляющие микроорганизмы, ксерочувствительность, термочувствительность.

Современный микробиологический метод рекультивации, основанный на применении высокоэффективных штаммов нефтеокисляющих микроорганизмов, широко применяется в мировой практике рекультивационных мероприятий. Создание высокоэффективных биопрепаратов для очистки объектов окружающей среды от нефти и нефтепродуктов возможно лишь на основе активных углеводородокисляющих микроорганизмов и ассоциаций, адаптированных к условиям загрязнения.

В настоящее время в ДПП «Институт микробиологии и вирусологии» МОН РК выделены, изучены и рекомендованы для практического использования новые штаммы микроорганизмов-деструкторов углеводородного сырья, способные утилизировать сырую нефть на 84-98% [1-5]. На основе активных нефтеокисляющих штаммов бактерий созданы биопрепараты, которые проходят испытания на нефтезагрязненных почвах. Для внедрения данных препаратов в практику необходима разработка оптимальной технологии производства, поскольку углеводородокисляющая активность биопрепаратов, предназначенных для очистки объектов окружающей среды от нефти и нефтепродуктов, определяется не только их составом, но во многом зависит также от товарной формы, в которой они предлагаются потребителю.

Способность микроорганизмов переносить обезвоживание, или ксерочувстви-

тельность микроорганизмов, является индивидуальным свойством каждой культуры. По ксерочувствительности отличаются не только различные виды одного рода, но даже различные штаммы одного вида. Данный показатель необходим для подбора оптимального режима обезвоживания микроорганизмов.

Целью исследования является изучение ксеро- и термочувствительности нефтеокисляющих микроорганизмов для выбора оптимальной коммерческой формы препаратов.

Объекты и методы исследований

Объектом исследований служили бактерии *Micrococcus roseus* 49, *Microbacterium lacticum* 41-3, *Acinetobacter calcoaceticum* 2A, *Arthrobacter* П-1, *Micrococcus roseus* 34 и 40, *Rhodococcus erythropolis* 7A. В качестве питательной среды для накопления биомассы бактерий использовали мясо-пептонный бульон (МПБ). Выращивание культур производили в 750 мл колбах Эрленмейера с 300 мл питательной среды на качалке при 180-200 об/мин при 28°C в течение 48 ч. Засев жидкой питательной среды производили упомянутыми исходными культурами микроорганизмов - смывом их со скошенного питательного мясо-пептонного агара (МПА) в количестве 1%. После окончания ферментации биомассу отделяли от культуральной



жидкости с помощью центрифугирования при 3 тыс. об/мин в течение 30 мин, промывали стерильной водопроводной водой с последующим центрифугированием.

Для изучения ксерорезистентности микроорганизмов использовали контактный метод фиксации влажности в биомассе, который заключается в том, что строго определенное количество биомассы с известной влажностью равномерно смешивают с расчетным количеством сухого сыпучего адсорбента также с установленной влажностью. В качестве адсорбента использовали тонкоизмельченный мел.

После смешивания биомассы с адсорбентом в смесях определяли количество жизнеспособных клеток/г путем высева из соответствующего разведения культуры в чашки Петри с плотной питательной

средой МПА. Затем полученные препараты каждой культуры микроорганизмов с различной влажностью (10, 20, 30, 40 и 50%) оставляли для выравнивания влаги в термостате при 28°C в течение 24 ч, после чего в них определяли процент выживших бактериальных клеток.

Результаты и обсуждение

Установлено, что исследованные нефтеокисляющие микроорганизмы обладают повышенной ксерочувствительностью в интервале остаточной влажности 30-40%. Поэтому в процессе обезвоживания и реактивации этих бактерий время прохождения указанного интервала влажности необходимо сократить (таблица 1).

Таблица 1

Ксерочувствительность нефтеокисляющих бактерий

| Влажность препарата, % | Выживаемость нефтеокисляющих бактерий, % | | | | |
|------------------------|--|------|------|------|------|
| | П-1 | 2а | 7а | 40 | 41-3 |
| 10 | 20,0 | 10,0 | 8,3 | 16,0 | 13,0 |
| 20 | 5,0 | 12,0 | 8,0 | 20,0 | 12,0 |
| 30 | 3,0 | 3,0 | 15,0 | 8,5 | 3,0 |
| 40 | 22,5 | 15,6 | 3,0 | 2,0 | 10,0 |
| 50 | 40,0 | 44,0 | 33,0 | 32,0 | 40,0 |

При определении термочувствительности в выращенные 2-суточные культуры вышеперечисленных микроорганизмов вносили 0,5% тиомочевины в качестве защитного компонента. Затем жидкие культуры отбирали в небольшие пробирки с пробками и прогревали на водяной бане

при температуре 47, 57, 67, 77, 87 и 97°C в течение 15 минут. По истечении времени пробирки с культурами сразу охлаждали и определяли количество выживших бактериальных клеток путем высева на поверхность плотной питательной среда МПА (табл. 2).

Таблица 2

Термочувствительности нефтеокисляющих бактерий в присутствии защитного компонента (тиомочевина)

| Наименование штаммов | Величина титра микроорганизмов при действии высоких температур, КОЕ/мл | | | | | | |
|------------------------------|--|----------------------|----------------------|-------------------|-------------------|----|----|
| | контроль | 47 | 57 | 67 | 77 | 87 | 97 |
| <i>M. lacticum</i> 41-3 | $1,5 \times 10^{11}$ | $1,4 \times 10^{11}$ | $1,0 \times 10^{11}$ | $1,4 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^3$ | 0 | 0 |
| <i>Arthrobacter</i> П-1 | $1,8 \times 10^8$ | $1,6 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^5$ | $8,0 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^3$ | 0 | 0 |
| <i>M. roseus</i> 34 | $4,9 \times 10^1$ | $3,1 \times 10^{10}$ | $3,0 \times 10^{10}$ | $2,1 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^3$ | 0 | 0 |
| <i>A. calcoaceticum</i> 2A | $8,0 \times 10^8$ | $8,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^4$ | $9,0 \times 10^3$ | 0 | 0 |
| <i>Micrococcus roseus</i> 40 | $5,0 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^9$ | $2,0 \times 10^9$ | $4,0 \times 10^3$ | $1,0 \times 10^3$ | 0 | 0 |
| <i>M. roseus</i> 49 | $6,0 \times 10^9$ | $3,0 \times 10^9$ | $1,0 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^3$ | $3,0 \times 10^3$ | 0 | 0 |
| <i>Rh. erythropolis</i> 7A | $8,0 \times 10^1$ | $1,2 \times 10^{10}$ | $1,9 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^5$ | $3,8 \times 10^2$ | 0 | 0 |



Установлено, что культуры *M. lacticum* 41-3, *M. roseus* 34, *Micrococcus roseus* 40 не теряют жизнеспособности при выдерживании их при температуре 60°C в течение 15 мин., что свидетельствует о возможности их распылительного высушивания. У культур *Arthrobacter П-1*, *A. calcoaceticum* 2А, *M. roseus* 49 и *Rh. erythropolis* 7А при таком температурном режиме происходит снижение количества жизнеспособных клеток на 3, 1, 2 и 3 порядка, соответственно. Для этих культур требуется адаптация к температурному режиму распылительного высушивания.

Проведено пробное сублимационное высушивание ассоциации нефтеокисляющих бактерий из культур *M. roseus* 49, *M. lacticum* 41-3, *A. calcoaceticum* 2а, *Arthrobacter П-1* с использованием различных защитных сред: 1) 0,5% тиомочевины; 2) 7% глюкозы и 1,5% желатина; 3) 10% сахарозы+5% лимоннокислого натрия+1,5% уксуснокислого натрия. Высушивали биомассу бактерий, адсорбированную на бен-

тоните, разбавленную защитной средой в соотношении 1:1. Продолжительность высушивания 24 ч.

При использовании различных защитных компонентов получены сухие препараты с содержанием от 2×10^9 до 14×10^9 КОЕ/мл.

Таким образом, исследованные нефтеокисляющие микроорганизмы обладают повышенной ксерочувствительностью в интервале остаточной влажности 30-40%. Культуры *M. lacticum* 41-3, *M. roseus* 34, *M. roseus* 40 не теряют жизнеспособности при выдерживании их при температуре 60°C в течение 15 мин., что свидетельствует о возможности их распылительного высушивания. Для остальных микроорганизмов требуется адаптация к температурному режиму распылительного высушивания.

При сублимационном высушивании с использованием различных защитных компонентов из нефтеокисляющих микроорганизмов получены сухие препараты с содержанием от 2×10^9 до 14×10^9 КОЕ/мл.

Литература

1. Предварительный патент РК №19848 от 15.08.2008 «Штамм бактерий *Micrococcus roseus* 34, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов».
2. Предварительный патент РК №18846 от 15.08.2008 «Штамм бактерий *Acinetobacter calcoaceticus* 2-А, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов».
3. Предварительный патент РК №19845 от 15.08.2008 «Штамм бактерий *Microbacterium lacticum* 41-3, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов».
4. Предварительный патент РК №19843 от 15.08.2008 «Штамм бактерий *Micrococcus roseus* 40, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов».
5. Предварительный патент РК № 19842 от 15.08.2008 «Штамм бактерий *Rhodococcus erythropolis* 7-А, используемый для очистки почвы от нефти и нефтепродуктов».

Түйін

Мұнайтотықтырғыш микроорганизмдердің ксеро- және жылусезімталдығы зерттелген. Алынған нәтижелер мұнайтотықтырушы микроорганизмдердің негізгі препараттардың ыдыратып кептірудің қолайлы ережесін және сауда түрін таңдап алу үшін пайдалы болуы мүмкін.

Summary

Thermo- and xero-sensitivity of oiloxidizing microorganisms have been studied. The findings can be useful to select the optimum regime for spray-type drying of the products containing oiloxidizing microorganisms, so as to find an optimum commercial form of the products.