

ЭКОЛОГИЯ ИЛИМДЕРИ
ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ НАУКИ
ENVIRONMENTAL SCIENCES

Токпаева Ж., Тотубаева Н.

**КОМУР-СУУТЕК КЫЧКЫЛДАНДЫРУУЧУ БАКТЕРИЯЛАРДЫ
КУЛЬТИВАЦИЯЛООҮЧҮН ОПТИМАЛДУУ ТАМАК ЧӨЙРӨСҮН ТАНДОО**

Токпаева Ж., Тотубаева Н.

**ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ
КУЛЬТИВИРОВАНИЯ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

Zh. Tokpaeva, N. Totubaeva

**SELECTION OF AN OPTIMAL CULTURE MEDIUM FOR
THE CULTIVATION OF HYDROCARBON OXIDIZING BACTERIA**

УДК:616.981.452:576.809.33

Топурактардын муңай заттар менен кирдөөсүнөн келип чыккан көйгөйлөрдөн улам топурактарды ремедиациялоодо экологиялык таза ыкмаларды издөө маселеси актуалдуу. Топурактарды микробиологиялык жол менен биоремедиациялоо ыкмалары менен иштеп жаткан, окумуштуу микробиологдор тарабынан көптөгөн муңай заттарды деструкциялоочу активдүү штаммдар бөлүнүп алынган. Бирок, алардын негизинде активдүү биопрепараттарды даярдоодо оптималдуу тамак чөйрөлөрүн тандоо маселеси маанилүү. Макалада Кумтөр кениндеги майланышкан калдыктардын жатагынан бөлүнүп алынган активдүү муңай зат ажыратуучу штаммдарды культивациялоо үчүн оптималдуу тамак чөйрөлөрүнүн салыштырмалуу анализи жүргүзүлдү. Бактериялардын жашоого мүмкүн болгон санынын максимуму №1 жана №2 тамак чөйрөлөрүндө 32 саат культивациялоодон соң байкалды.

Негизги сөздөр: биопрепараттар, ремедиациялоо, топурактар, микробиологиялык жол, активдүү штаммдар, культивациялоо, тамак чөйрөлөрү, анализ.

В свете проблем загрязнения почвы нефтепродуктами, поиск экологически безвредных методов ремедиации почв является актуальным. Учеными микробиологами, занимающимися вопросами биоремедиации почв микробиологическими методами, выделены много активных штаммов деструкторов нефтепродуктов. Однако важным вопросом при изготовлении на их основе активных биопрепаратов является подбор оптимальной питательной среды для их культивирования. В данной статье произведен сравнительный анализ питательных сред для культивирования штаммов нефтедеструкторов, которые были выделены из полигона промасленной ветоши рудника Кумтор. Максимум

численности жизнеспособных бактерий наблюдали на среде №1 и №2 после 32 ч культивирования.

Ключевые слова: биопрепараты, ремедиация, почвы, микробиологический путь, активные штаммы, культивация, питательная среда, анализ.

In light of the problems of soil pollution with oil products, the search for environmentally friendly methods of soil remediation is relevant. Many active strains of petroleum products destructors have been identified by scientists' microbiologists involved in soil bioremediation by microbiological methods. However, an important issue in the manufacture of active biological products based on them is the selection of the optimal nutrient medium for their cultivation. This article provides a comparative analysis of culture media for the cultivation of oil destructor strains that were isolated from the oiled rags of the Kumtor mine. The maximum number of viable bacteria was observed on medium No. 1 and No. 2 after 32 hours of cultivation.

Key words: biologicals, remediation, soils, microbiological pathway, active strains, cultivation, culture medium, analysis.

Введение. Локальные разливы нефти и нефтепродуктов неизбежно возникают в процессах ее транспортировки и эксплуатации, нанося ущерб окружающей среде и ставя под угрозу нарушение целостности экосистемы [1-2]. Особо остро эта проблема стоит для уникальных высокогорных экосистем. Для сохранения природного потенциала и поддержания стабильности высокогорных экосистем необходима разработка и внедрение новых экологически безопасных способов ликвидации возможных нефтяных раз-

ликов. В настоящее время успешно применяют биопрепараты на основе углеводородокисляющих штаммов, однако стоит отметить, что выделенные активные аборигенные штаммы проявляют наиболее высокую эффективность в очищении загрязненных сред, являясь адаптированными к данным источникам субстратов и геохимическим условиям [3,5].

Одной из актуальнейших задач экобиотехнологии является разработка новейших методик по совершенствованию процесса биоремедиации загрязненных почв с использованием биопрепаратов на основе штаммов-деструкторов ксенобиотиков и изучение процесса ремедиации, взаимодействия, динамики развития, внесенного биодеструктора в загрязненную природную среду. Однако, практическое применение штаммов-деструкторов будет возможна лишь после промышленной наработки активных биопрепаратов. Ключевой стадией при производстве биопрепаратов является наработка максимума биомассы микроорганизмов за оптимальное время культивации при максимальном экономическом эффекте. При этом оптимизация состава питательной среды для культивирования микроорганизмов является актуальным вопросом в настоящее время. Исходя из вышеизложенного целью нашего исследования являлось оптимизация жидкой питательной среды для культивирования выделенных нами ранее активных штаммов – нефтедеструкторов из нефтезагрязненной почвы в условиях высокогорья [10].

Материалы и методы исследования. В работе использованы три активные штаммы *Pseudomonas fluorescens* P1, *Rhodococcus rhodococcus* R3 и *Flavobacterium* K, отобранные в результате скрининга из 70 культур микроорганизмов и выделенных из нефтезагрязненной почвы высокогорного (3600 м над уровнем моря) полигона опасных отходов [4].

Проведена сравнительная оценка получения наибольшей биомассы штаммов на следующих питательных средах:

№1 синтетическая жидкая среда Ворошиловой-Диановой, содержащая (г/л):

K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; NH_4NO_3 – 1,0;
 $MgSO_4$ – 0,2; $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ – 0,2;
 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; pH 7,0 – 7,2.

№2 синтетическая жидкая среда Миллса, содержащая (г/л):

NaCl – 24, KCl – 0,7, KH_2PO_4 – 2,
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1, Na_2HPO_4 – 3, NH_4NO_3 – 1, pH – 7,3.

№3 синтетическая жидкая среда М9, содержащая (г/л):

$Na_2HPO_4 \cdot H_2O$ – 12, KH_2PO_4 – 3, NaCl – 0,5,
 NH_4Cl – 1, глюкоза – 0,2%, $MgSO_4$ (1M) – 2 мл,
 $CaCl_2$ (1M) – 0.1 мл, pH – 7,2.

Изучаемые штаммы культивировали в колбах Эрленмейера объемом 500 мл при температуре 37°C, на круговой качалке с частотой оборотов 120 об/мин. Для обеспечения оптимального массопереноса кислорода на уровне 0,4-0,6г O_2 /л·ч использовали рабочий объем питательной среды, который составлял 50 мл.

С целью создания начальной численности бактерий в изучаемой среде посевной материал вносили из расчета 1,0-2,0·10⁶ кл/мл. Длительность культивации составила 8-72 ч.

При помощи метода ортогональных латинских прямоугольников проводили оптимизацию, при этом критерием оптимизации была взята численность жизнеспособных бактерий в культуральной жидкости (КОЕ/мл), количество которых определяли методом серийных разведений с последующим высевом на среду МПА (мясо-пептонный агар).

Результаты и их обсуждение. Многочисленные исследования по способности активных штаммов культур к деструкции нефтепродуктов различна [6-9], поэтому нами был исследован процесс роста ассоциации трех выделенных штаммов *Pseudomonas fluorescens* P1, *Rhodococcus rhodococcus* R3 и *Flavobacterium* K.

При культивировании исследованных штаммов бактерий на изучаемых средах различного состава, бактерии проявили неодинаковую ростовую активность. Максимум численности жизнеспособных бактерий наблюдали на среде №1 и №2 после 32 ч культивирования. При росте на среде №3 у штаммов-нефтедеструкторов наибольший титр клеток отмечен на 24 часу культивирования (рис. 1). Полученные результаты показали, что в среде №1 и №2 достигался оптимальный титр клеток (10⁸) у штаммов деструкторов на 32 часе культивирования. Затем рост культур шел на спад.

Изучаемые питательные среды по накоплению бактерий за 32 ч культивирования расположились в следующей последовательности: среда №1 > среда №2 > среда №3. Следовательно, как показали проведенные эксперименты, питательная среда №1 оказалась наиболее приемлемой для дальнейшей наработки и рекомендации для производственных назначений.

При анализе совместного культивирования штаммов деструкторов наблюдалась тенденция снижения численности бактерий *Pseudomonas fluorescens*, что подразумевает внесение культур *Pseudomonas* больше чем культур *Rhodococcus*.

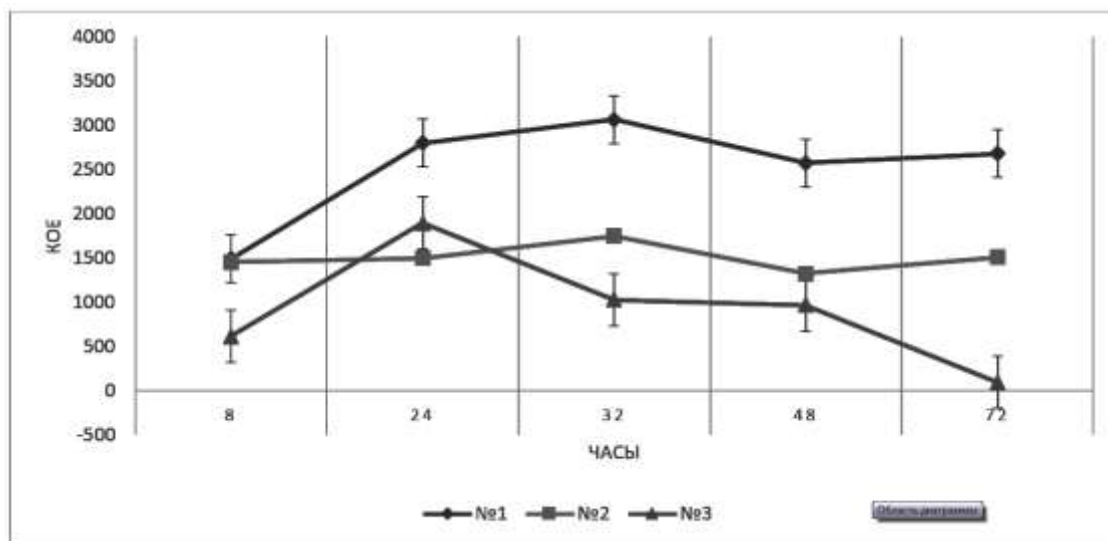


Рис. 1. Рост культур нефтеструктуров на различных средах.

Таким образом, исследованная питательная среда №1 предназначенная для культивирования штаммов *Pseudomonas fluorescens* P1, *Rhodococcus rhodococcus* R3 и *Flavobacterium* K в лабораторных условиях позволяет получить высокий титр жизнеспособных клеток за 32 ч культивирования.

Литература:

- Белоусова Н.И., Шкидченко А.Н. Деструкция нефтепродуктов различной степени конденсации микроорганизмами при пониженных температурах // Прикл. биох. и микробиол. - 2004. - Т. 40. - №3. - С. 312-316.
- Киреева Н.А., Микробиологическая рекультивация нефтезагрязнённых почв / Н.А. Киреева. - М.: ВНИИОЭНГ, 2001.
- Карасева Э.В., Волченко Н.Н., Худокормов А.А. Нефтеокисляющий штамм *Rhodococcus erythropolis* b2 как основа создания биопрепарата для ликвидации углеводородных загрязнений и рекультивации земель // 185 Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. - 2012. - №83 (09). - С. 1-10.
- Токпаева Ж.К., Акжигит уулу А., Тотубаева Н.Э. Микробиологическое разнообразие почвы полигона опасных отходов рудника Кумтор. // Журнал «Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана», №1. - 2018. - С. 31-34.
- Яппаров А.Х., Дегтярева И.А., Хидиятуллина А.Я. Использование эффективных аборигенных углеводородоокисляющих микроорганизмов при биологической рекультивации нефтезагрязненных территорий РТ. // Ученые записки Казанской гос. акад. вет. мед. им. Н.Э. Баумана. - Казань, 2009. - Т. 199. - С. 218-222.
- Хомякова Д.В. Углеводородоокисляющая микробиота нефтезагрязненных почв района Крайнего Севера / Д.В. Хомякова, И.В. Ботвинко, А.И. Нетрусов // Биоразнообразие восстанавливаемых территорий. / Под ред. Л.П. Капелькиной. - СПб.: Наука, 2002.
- Santa Anna L. Production of Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 Isolated in Oil Environments / L.Santa Anna, G. Sebastian, E. Menezes [et al.] // Braz. J. Chem. Eng. - 2002. - V. 19, No. 2. - P. 301-307.
- Rapp P. Degradation of alkanes and highly chlorinated benzenes, and production of biosurfactants, by a psychrophilic *Rhodococcus* sp. and genetic characterization of its chlorobenzene dioxygenase / P. Rapp, L. Gabriel-Jurgens // Microbiolog. - 2003. - V. 149. - P. 2879-2890.
- Thaniyavarn J. Production and Characterization of Bio surfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2/J. Thaniyavarn, N. Roongsavang, T. Kaneyama [et al.] // Biosci. Biotechnol. Biochem. - 2003. - V. 67(6). - P. 1239-1244.
- Totubaeva N., Tokpaeva Zh., Akjigit Uulu, Kojobaev K. Microbiological Diversity and Biotechnological Potential of the Soil Ecosystem of a High-Mountainous Landfill// Pol. J. Environ. Stud. Vol. 28, No. 6 (2019), 4429-4435.