УДК [579/22:57.063.8]:661.185.002.68

ИЗУЧЕНИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВЫХ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

© 2011 А.А. Утепешева, О.Б. Сопрунова

ФГУП «Астраханский государственный технический университет», г. Астрахань

Поступила 27.05.2011

Дана характеристика новым штаммам микроорганизмов, выделенных из промышленных отходов, обладающих полезными свойствами.

Ключевые слова: *гетеротрофные микроорганизмы, свойства, деградация, поверхностно-активные вещества*

В настоящее время во всем мире, в том числе и в России, остро стоят проблемы загрязнения воздуха, почвы, воды различными поллютантами [2]. Такие соединения, как поверхностно-активные вещества (ПАВ), пестициды, различные органические соединения, содержащие нитрогруппу, галоидорганические соединения, фосфорорганические соединения, пластмассы, синтетические смолы и некоторые другие продукты промышленности органического синтеза разрушаются в природе медленно и отличаются высокой устойчивостью к действию микроорганизмов. Такие синтетические вещества кумулируются в водоемах и почве, загрязняют окружающую среду [7].

Целью исследований являлось выделение новых штаммов микроорганизмов из промышленных отходов и изучение их свойств. Задачи исследования: выделение микроорганизмов из сточных вод и почв прилегающей территории очистных сооружений; изучение культурально-морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных штаммов микроорганизмов; изучение способности микроорганизмов к деградации ПАВ (катионные и анионные).

Объектом исследований являются гетеротрофные микроорганизмы, выделенные из сточных вод и почв прилегающей территории завода «Стекловолокно».

Микроорганизмы выделяли методом Коха [1] с использованием поверхностного и глубинного культивирования на следующих питательных твердых средах: питательный агар и агаризованная среда М9 следующего состава (г/л): Na_2HPO_4 – 6,0; KH_2PO_4 – 3,0; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1,0; pH 7,0–7,2. Для выделения специфичной микрофлоры использовали ПА и М9, в которые вносили ПАА в количестве 1 г/л. Посевы со средой ПА инкубировали при комнатной температуре в течение недели; со средой М9 – в течение 3-4 недель.

В результате микробиологических исследований установлено, что в сточных водах и почвах присутствует гетеротрофная ($1{,}7\cdot10^6$…$1{,}4\cdot10^7$ КОЕ/мл; $6{,}0\cdot10^4$…$1{,}4\cdot10^5$ КОЕ/г) и специфическая ($3{,}0\cdot10^4$…$1{,}7\cdot10^7$ КОЕ/мл; $0{,}2\cdot10^2$…$0{,}4\cdot10^2$ КОЕ/г) микрофлора.

Доминирующие формы микроорганизмов представлены в основном бактериями кокковидной формы, Г+ спорообразующими и неспорообразующими палочками.

В результате периодических пересевов в чистые культуры выделено 12 штаммов бактерий, изучены их культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства.

Для изучения физиолого-биохимических свойств исследовали особенности углеродного и азотного питания, амилолитические, протеолитические, эмульгирующие, фунгицидные свойства, а также способность выделенных штаммов усваивать поверхностно-активные вещества.

В качестве источников углерода использовали различные моно- и дисахариды, которые вносили (1%) в ПА [6]. Рост микроорганизмов оценивали визуально в баллах (шкала от 0 до 5) (рис. 1).

Для изучения способности использовать азот минеральных солей применяли среду следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; K_2HPO_4 – 1,0; KH_2PO_4 – 1,0; $MgSO_4\cdot7H_2O$ – 0,5; NaCl – 0,5; агар-агар – 15,0; раствор микроэлементов – 1 мл ($CuSO_4\cdot5\ H_2O$ – 0,64 г; $FeSO_4\cdot7H_2O$ – 0,11 г; $MnCl_2\cdot4H_2O$ – 0,79 г; $ZnSO_4\cdot7H_2O$ – 0,15 г; дистиллированная вода – 100 мл). Использование солей аммония определяли путем добавления к основной среде NH_4Cl (1,0 г) и $CaCO_3$ (5,0 г), использование нитратов – KNO_3 (1,0 г). Среды стерилизовали при 0,5 атм.

Изучение роста бактерий на среде с различными источниками углерода показало, что наилучший рост всех штаммов наблюдается на среде с добавлением мальтозы и галактозы. На среде с добавление сахарозы штамм № 4 выделял пигмент красного цвета. Штаммы № 1, 3 и 5 растут на среде с добавлением NH_4Cl, штаммы № 4 и 5 – с добавлением KNO_3.

При изучении амилолитических свойств обнаружено, что выделенные штаммы микроорганизмов данной способностью не обладают.

Изучение протеолитических свойств показало, что этой способностью обладают штаммы № 4, 5,

Утепешева Алия Алимгазиевна, e-mail: aliyashka.85@mail.ru; *Сопрунова Ольга Борисовна*, докт. биол. наук, проф., e-mail soprunova@mail.ru.

10. Причем штамм № 4 при этом выделял пигмент розового цвета, штамм № 10 – пигмент черного цвета [6].

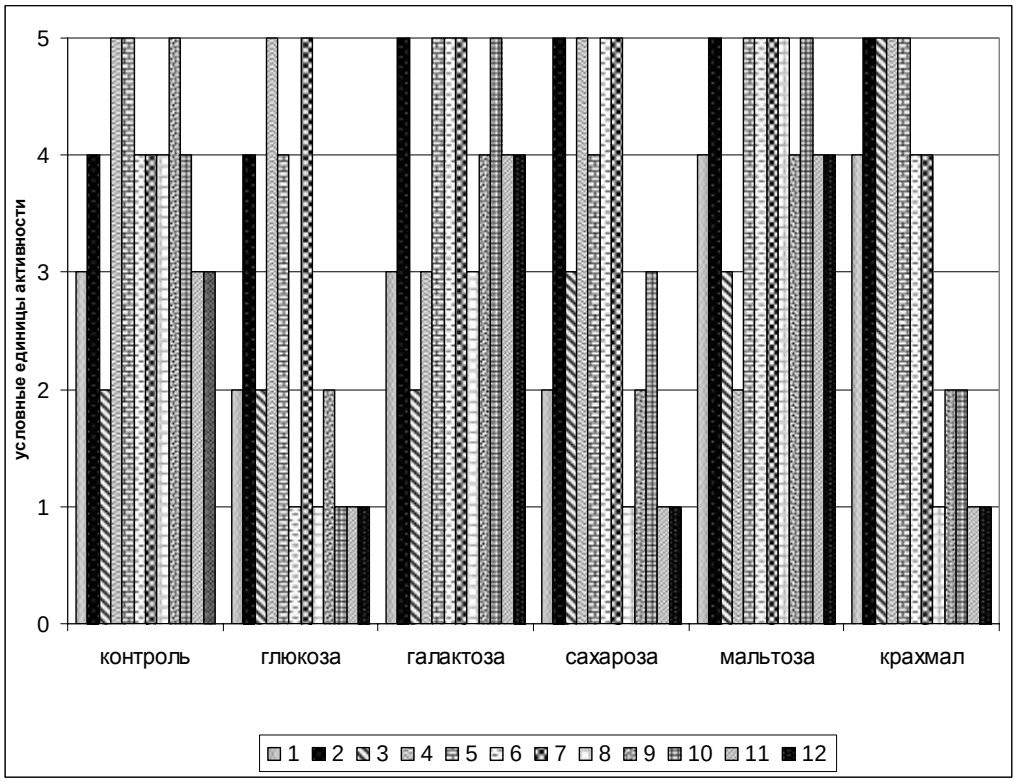


Рис. 1. Рост бактериальных штаммов на среде с различными источниками углерода.

Для определения эмульгирующей активности культуры выращивали в течение 5 сут на скошенной агаризованной среде. Клетки смывали средой следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 7,0; KH_2PO_4 – 3,0; $CaCl_2$ (1%, мл) – 1,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1; $(NH_4)_2SO_4$ – 1,0; $FeSO_4$ $7H_2O$ – 0,5; $ZnSO_4$ $7H_2O$ – 0,5; $MnSO_4$ $3H_2O$ – 0,5; H_2SO_4 (0,1н, мл) – 10,0. Суспензию клеток оставляли на сутки, далее 4 мл суспензии центрифугировали при 6000 об/мин в течение 15 мин. Эмульгирующую активность определяли путем добавления к 4 мл исследуемого образца 4 мл бензина и дизельного топлива (ДТ) с последующим встряхиванием в течение 10 мин. Полученную эмульсию оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Эмульгирующую активность определяли как отношение высоты эмульсионного слоя к общей высоте жидкости в измерительной пробирке и выражали в % [8].

При изучении эмульгирующей активности наблюдалась высокая активность эмульгирования с использованием бензина у штаммов № 1 (40%), 3 (60%), 8 и 11 (53%); с использованием ДТ эмульгирующая активность значительно ниже (0-7%) (рис. 2).

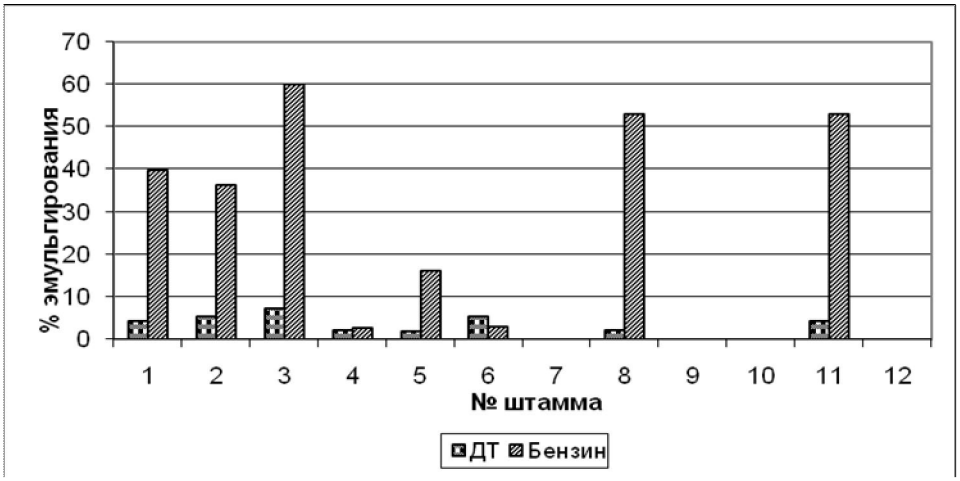


Рис. 2. Эмульгирующая активность бактериальных штаммов (%).

Изучение фунгицидной активности проводили в чашках Петри на картофельно-декстрозном агаре (КГА), содержащем картофельный экстракт – 230 мл, глюкозу – 20,0, водопроводную воду – 770 мл,

и глюкозо-пептонном агаре следующего состава (г/л): глюкоза – 5,0; пептон – 5,0; K_2HPO_4 – 4,0; KH_2PO_4 – 2,0; агар-агар – 15,0. Суспензию спор тест-гриба высевали на агаризованную среду, а исследуемую культуру вносили, делая посев уколом поверх газона гриба. Чашки инкубировали в термостате в течение 5-7 сут при температуре 25ºС. Антагонистов выявляли по наличию вокруг колонии бактерий зоны подавления роста тест-гриба [3].

В качестве тест-объектов для определения фунгицидной активности штаммов служили следующие мицелиальные грибы: *Alternaria tennuissima, Fusarium culmorum, F. graminearum, Phytophtora ultum.*

Изучение фунгицидной активности показало, что данным свойством обладают штаммы № 2, 6, 10, проявляя фунгицидную активность к *Fusarium graminearum, F. culmorum, Phytophtora ultum.*

Для определения способности штаммов микроорганизмов усваивать поверхностно-активные вещества (ПАВ) использовали ПА с добавлением катионных и анионных ПАВ. Микроорганизмы высевали радиальными штрихами. Контролем служили чашки с посевом без добавления ПАВ. Чашки помещали в термостат. Интенсивность развития культур бактерий по штриху оценивали в баллах визуально (шкала от 0 до 5) (рис. 3).

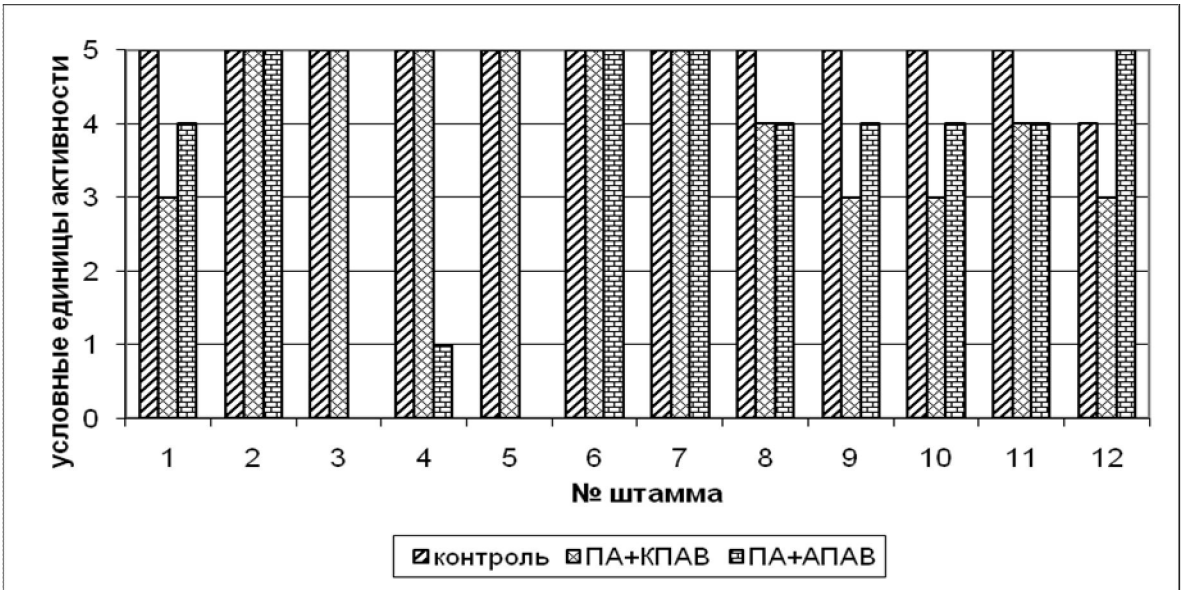


Рис. 3. Активность бактериальных культур по отношению к катионным и анионным ПАВ.

При изучении способности использовать КПАВ наблюдался рост всех штаммов микроорганизмов. На ПА с добавлением АПАВ активный рост наблюдался практически для всех культур, за исключением штаммов № 3, 4, 5.

Способность микроорганизмов деградировать ПАВ изучали флуориметрическим методом, который основан на экстракции хлороформом ионных пар АПАВ с красителем акридиновый желтый [5], деградации КПАВ – на экстракции хлороформом ионных пар КПАВ с красителем эозин [4] и измерении концентрации ПАВ в полученном экстракте с помощью анализатора жидкости «Флюорат-02».

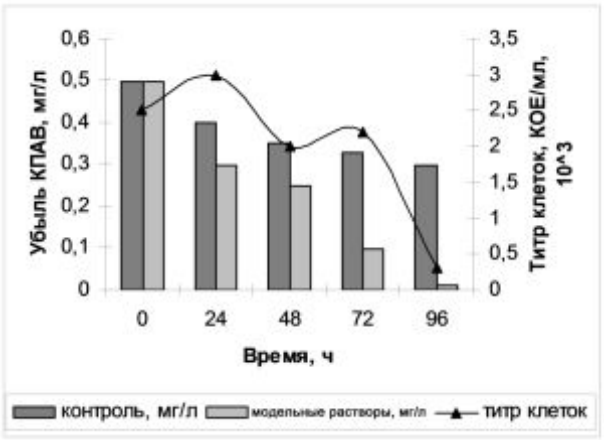
Для эксперимента использовали растворы КПАВ с концентрацией 1, 5, 10 мг/л, растворы АПАВ – 1, 2, 10, 20 мг/л. В данные растворы вносили бактериальные штаммы, титр клеток, при внесении в растворы КПАВ составляет $2{,}5 \cdot 10^3$ КОЕ/мл, в растворы АПАВ – $1{,}47 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Убыль ПАВ и титр клеток в ходе эксперимента отмечали через каждые 24 ч в течение 4 сут.

Установлено, что все исследуемые штаммы осуществляют деградацию КПАВ и АПАВ. Максимальной способностью деградировать ПАВ обладает штамм № 11. Деградация КПАВ с концентрацией 1 мг/л в течение 96 ч достигла 60%, 5 мг/л – 65%, 10 мг/л – 62% (рис. 4). Деградация АПАВ в течение 96 ч достигла 100% во всех модельных растворах (рис. 5).

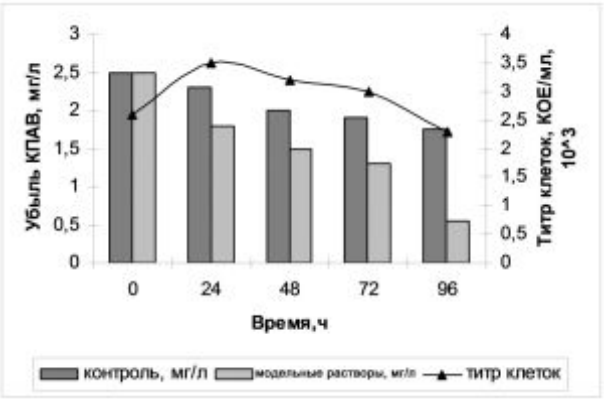
Убыль КПАВ с концентрацией 1 и 5 мг/л происходит постепенно в течение 96 ч. При этом численность микроорганизмов возрастает и убывает постепенно. В первом случае численность микроорганизмов имеет два пика: 24 ч и 72 ч, после чего резко уменьшается. При концентрации 5 мг/л титр клеток в первые 24 ч увеличивается, затем постепенно снижается в течение эксперимента. Деструкция КПАВ с концентрацией 10 мг/л происходит незначительно в первые 24 ч, затем никаких изменений не наблюдается. При этом численность микроорганизмов резко уменьшается также в течение 24 ч культивирования. Исходя из этого, можно предположить, что концентрация КПАВ 10 мг/л, является летальной для данного штамма.

Во всех модельных растворах происходит резкое снижение концентрации АПАВ в первые 24 ч, в последствии к 72 ч происходит полная деградация АПАВ. При этом титр клеток увеличивается (до 10^7) в течение 48 ч, затем постепенно снижается (до 10^4).

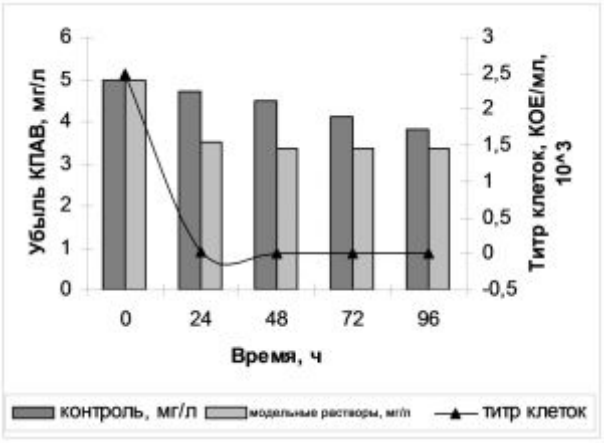
Таким образом, в ходе исследований выделены новые штаммы микроорганизмов, способные использовать поверхностно-активные вещества в качестве источников питания, что позволяют сделать вывод о возможности применения бактериальных культур для разработки способов очистки от ПАВ.



а

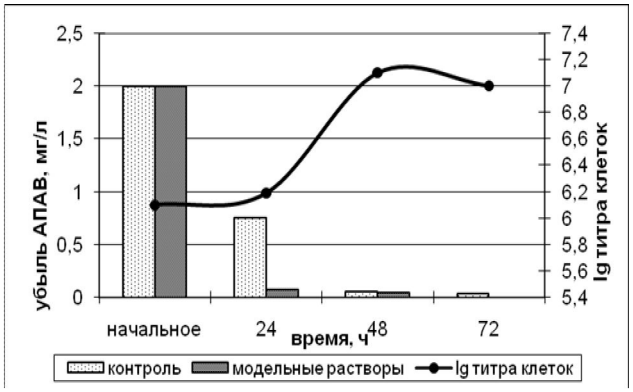


б



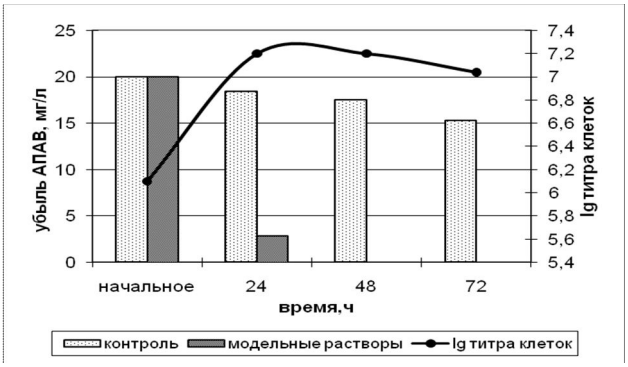
в

Рис. 4. Деградационная способность штамма № 11 по отношению к КПАВ: а) концентрация 1 мг/л; б) концентрация 5 мг/л; в) концентрация 10 мг/л.



а

б



В

Рис. 5. Деградационная способность штамма № 11 по отношению к АПАВ: а) концентрация 2 мг/л; б) концентрация 10 мг/л; в) концентрация 20 мг/л.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Градова Н.Б., Бабусенко Е.С., Горнова И.Б.* Лабораторный практикум по общей микробиологии. М., 2004. 144 с.
2. *Егорова Т.А., Клоунова С.М., Живухина Е.А.* Основы биотехнологии. М.: Академия, 2005. 208 с.

3. *Логинов О.Н.* Бактерии *Pseudomonas* и *Azotobacter* как объекты сельскохозяйственной биотехнологии. М.: Наука, 2005. 166 с.
4. ПНД Ф 14.1:2:4.39-95. Методика выполнения измерений массовой концентрации катионных поверхностно-активных веществ (КПАВ) в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02»: Утв. 1995-06-23. М., 1995. 21 с.
5. ПНД Ф 14.1:2:4.158-2000 Методика выполнения измерений массовой концентрации анионных поверхностно-активных веществ (АПАВ) в пробах природной, питьевой и сточной воды флуориметрическим методом на анализаторе жидкости «Флюорат-02»: Утв. 2000-03-15. М., 2000. 21 с.
6. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др. М.: Академия, 2005. 608 с.
7. *Ротмистров М.Н., Гвоздяк П.И., Ставская С.С.* Микробиология очистки воды. Киев: Наукова думка, 1978. 268 с.
8. *Турковская О.В.* Биологические и технологические аспекты микробной очистки сточных вод и природных объектов от поверхностно-активных веществ и нефтепродуктов : Дис. … докт. биол. наук. Саратов, 2000. 360 с.

THE STUDYING OF FIZIOLOGO-BIOCHEMICAL PROPERTIES OF NEW STRAINS OF MICROORGANISMS ALLOCATED FROM INDUSTRIAL WASTES

© 2011 A.A. Utepesheva, O.B. Soprunova

Astrakhan State Technical University, Astrakhan

In this article is given the characteristic new штаммам the microorganisms allocated from industrial wastes, possessing useful properties.

Key words: *heterotrophic microorganisms, properties, degradation, surface-active substances.*

Utepesheva Aliya Alimgazievna, e-mail: aliyashka.85@mail.ru; *Soprunova Olga Borisovna*, Doctor of Biology, Professor, e-mail soprunova@mail.ru.