

УДК 579.22

Галеева Ю.С., Шустов М.Д., Белодед А.В.

ВЫДЕЛЕНИЕ И ПЕРВИЧНАЯ МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ, ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ ТЕРМОФИЛЬНЫХ КИСЛОТООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

Галеева Юлия Сергеевна, студентка 3 курса факультета Биотехнологии и промышленной экологии, e-mail: galeevaiulia2016@yandex.ru;

Шустов Максим Дмитриевич студент 3 курса факультета Биотехнологии и промышленной экологии;

Белодед Андрей Васильевич, к.б.н., доцент кафедры биотехнологии;

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

125047, Москва, Миусская пл., д.9

Методом накопительных культур из растительных и почвенных образцов при температуре 50 °С выделены 11 чистых культур термофильных бактерий. Для полученных штаммов установлены морфологические характеристики, способность продуцировать органические кислоты, для трех штаммов определена возможность сбраживать различные углеводные субстраты и установлены амилолитическая, протеолитическая активности и отношение к молекулярному кислороду.

Ключевые слова: термофильные бактерии; факультативные анаэробы; молочная кислота.

ISOLATION, PRIMARY MORPHOLOGICAL, PHYSIOLOGICAL, AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF THERMOPHILIC ACID-FORMING BACTERIA STRAINS

Galeeva J.S., Shustov M.D., Beloded A.V.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia.

11 pure thermophile bacteria cultures were obtained from vegetable and soil samples with the method of cumulative cultures at the temperature 50 °C. For the obtained strains we determined morphological characteristics, organic acids production ability, for three strains we determined the capability of different carbohydrates fermentation, amylolytic and proteolytic activities and the attitude to molecular oxygen.

Key words: thermophilic bacteria; facultative anaerobes; lactic acid.

Термофильные бактерии представляют собой экологически обособленную группу микроорганизмов, отличительной особенностью которой является рост при повышенных температурах (от 50 °С и выше). Данная группа микроорганизмов является перспективной для использования в биотехнологиях, поскольку имеет ряд преимуществ в сравнении мезофильными культурами. Использование термофилов в качестве продуцентов различных метаболитов имеет ряд технологических преимуществ: облегчается экстракция летучих продуктов метаболизма и поддержание анаэробных условий из-за меньшей растворимости кислорода, кроме того, с повышением температуры культивирования снижается вероятности контаминации посторонней микрофлорой [1]. Также термофильные штаммы бактерий имеют ускоренный метаболизм, что определяет их быстрый рост и высокую продуктивность в оптимальных условиях культивирования [2].

Термофильные микроорганизмы могут использоваться в качестве продуцентов органических кислот и других первичных и

вторичных метаболитов. Кроме того, ферменты термофильных микроорганизмов термостабильны. Помимо активности в условиях повышенных температур такие ферменты, как правило, устойчивы к действию растворителей, кислых или щелочных рН, некоторых протеиназ и могут применяться с высокой эффективностью в разнообразных биотехнологических процессах [3].

Целью данной работы являлось выделение из растительных и почвенных образцов чистых культур термофильных бактерий, способных развиваться при температурах не ниже 50 °С, описание их морфологии и скрининг штаммов на рост в анаэробных условиях, сбраживание углеводов, образование органических кислот и амилолитическую и протеолитическую активности.

Накопительные культуры термофильных бактерий получены по методу С.Н. Виноградского путем внесения 1 г образца природного происхождения в элективные питательные среды и дальнейшего культивирования при 50 °С в течение 24 часов с несколькими пересевами в жидкую питательную среду и последующим высевом по методу Коха на агаризованную питательную среду

состава (г/л): глюкоза – 20, дрожжевой экстракт – 15, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 0,05, $CaCO_3$ – 10. В селективных питательных средах использовалась минеральная основа постоянного состава (г/л): K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 0,05; и варьировались следующие компоненты (г/л): глюкоза – 100-150, крахмал – 10, сахароза – 100, дрожжевой экстракт – 5-15, молочная кислота (в виде лактата аммония) – 0-75.

Образование кислот при анаэробном культивировании на среде состава (г/л): глюкоза – 10 (20), дрожжевой экстракт – 5, K_2HPO_4 – 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ – 0,05; с начальным рН 7,2 фиксировали при помощи внесенного в питательную среду индикатора бромкрезолового пурпурного в количестве 0,01% или, измеряя конечный рН ферментационной среды при помощи рН-метра. Количественно органические кислоты, в том числе молочную кислоту, определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Agilent 1220 Infinity LC, оснащенный колонкой Eclipse Plus C18 4,6x150 мм. Образование газа при анаэробном культивировании, амилолитическая и протеолитическая активности штаммов, отношение культур к молекулярному кислороду определялись стандартными микробиологическими методами [4].

В качестве растительных и почвенных образцов для получения накопительных культур термофильных бактерий были использованы:

1. Компост (Московская обл., Серпуховской р-н, с. Молоди, май 2016 года);

2. Сено с животноводческой фермы (Московская обл., Серпуховской р-н, с. Молоди, июнь 2016 года);

3. Частично перегнившая трава (Московская обл., Клинский р-н, с. Ивановское, ноябрь 2016 года);

4. Торфяной горизонт почвы (восточное Подмосковье, апрель 2017 года).

Всего методом накопительных культур на селективных питательных средах при 50 °С выделено 11 штаммов термофильных бактерий, отличающихся размерами, формой и цветом колоний. Морфология клеток выделенных штаммов представлена кокковидной и палочковидной формой.

По закислению ферментационной среды в анаэробных условиях культивирования и методом ВЭЖХ определена способность штаммов термофильных бактерий продуцировать органические кислоты. Результаты исследования представлены в табл. 1 и на рис. 1.

Таблица 1. Органические кислоты, продуцируемые термофильными бактериальными штаммами на питательной среде с начальным содержанием глюкозы 20 г/л.

№	Штамм	рН после 24 часов культивирования	Концентрация молочной кислоты, г/л	Концентрация пропионовой кислоты, г/л	Концентрация масляной кислоты, г/л
1	КБ.1.7.1	4,60	10,186	0,946	9,36
2	КБ.3.3.2	4,06	12,507	0,0	9,06
3	КБ.3.3.3	4,30	14,259	0,0	7,55
4	КБ.3.3.4	4,27	0,0	0,0	8,51
5	КБ.1.7.5	4,69	10,161	1,780	8,816
6	КБ.2.7.6	4,50	13,645	0,0	6,892
7	КБ.3.9.7	5,02	8,9	0,0	8,730
8	КБ.1.7.8	4,76	0,0	1,815	8,741
9	КБ.1.7.9	4,86	0,0	1,005	8,611
10	КБ.1.3.10	4,09	16,154	0,0	7,386
11	КБ.4.3.11	4,80	12,324	0,0	8,647

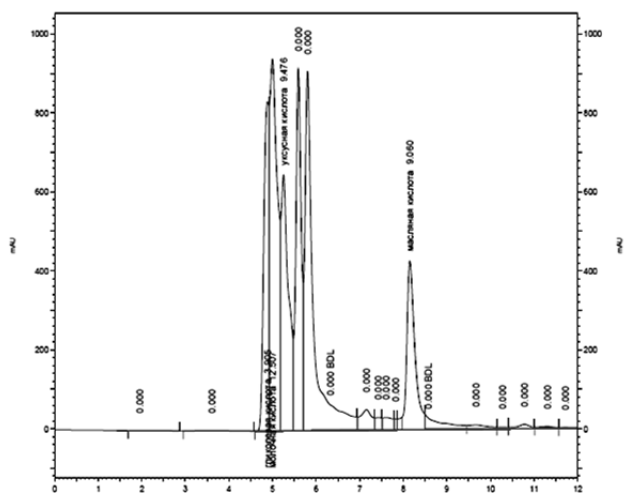


Рис. 1. Хроматограмма ферментационной среды штамма КБ.3.3.2 на 24 час культивирования.

В результате исследования установлено, что 8 из 11 выделенных штаммов продуцируют молочную кислоту, 4 из 11 в небольших количествах образуют пропионовую кислоту (менее 2 г/л).

Для трех перспективных штаммов термофильных бактерий определена способность сбрасывать в анаэробных условиях различные углеводные субстраты, а также выявлены амилолитическая и протеолитическая активности и отношение культуры к кислороду. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Таблица 2. Сбраживание углеводов термофильными штаммами КБ.3.9.7, КБ.2.7.6, КБ.1.7.8.

№	Углеводный субстрат	Штамм бактерии	Окраска индикатора после 24 часов культивирования	Окраска индикатора после 48 часов культивирования	Образование биомассы на дне пробирки	Образование газа
1	глюкоза	КБ.3.9.7	желтая	желтая	+	-
		КБ.2.7.6	желтая	желтая	+	-
		КБ.1.7.8	желтая	желтая	+	-
2	сахароза	КБ.3.9.7	желтая	желтая	+	-
		КБ.2.7.6	желтая	желтая	+	-
		КБ.1.7.8	желтая	желтая	+	-
3	арабиноза	КБ.3.9.7	желтая	желтая	+	-
		КБ.2.7.6	фиолетовая	фиолетовая	-	-
		КБ.1.7.8	желтая	желтая	+	-
4	ксилоза	КБ.3.9.7	переходная окраска индикатора	желтая	+	-
		КБ.2.7.6	фиолетовая	фиолетовая	-	-
		КБ.1.7.8	фиолетовая	фиолетовая	-	-
5	мальтоза	КБ.3.9.7	желтая	желтая	+	-
		КБ.2.7.6	переходная окраска индикатора	желтая	+	-
		КБ.1.7.8	желтая	желтая	+	-
6	лактоза	КБ.3.9.7	фиолетовая	фиолетовая	-	-
		КБ.2.7.6	фиолетовая	фиолетовая	-	-
		КБ.1.7.8	фиолетовая	фиолетовая	-	-
7	целлюлоза	КБ.3.9.7	фиолетовая	фиолетовая	-	-
		КБ.2.7.6	фиолетовая	фиолетовая	-	-
		КБ.1.7.8	фиолетовая	фиолетовая	-	-

Все три исследуемых штамма по результатам эксперимента продемонстрировали способность использовать в качестве источника углерода глюкозу, сахарозу, мальтозу, закисляя при этом ферментационную среду. Пентозы оказались способны сбраживать штаммы КБ.3.9.7 (использует арабинозу и ксилозу) и КБ.1.7.8 (использует только арабинозу). Ни один из представленных штаммов бактерий не проявил признаков роста и брожения на питательной среде с лактозой и целлюлозой в качестве единственного источника углерода. Газообразования в ходе брожения для исследуемых штаммов на всех типах субстратов не выявлено. Все три штамма являются факультативными анаэробами, проявляют амилолитическую активность и осуществляют протеолиз желатина.

В результате проведенных исследований получены и изучены чистые культуры термофильных бактерий. Некоторые штаммы по способности синтезировать кислоты, утилизировать углеводные субстраты и хорошо расти в анаэробных условиях при высоких температурах признаны

перспективными кандидатами-продуцентами молочной кислоты и термостабильных ферментов.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (ID проекта: RFMEFI57714X0037).

Список литературы

- Herring C. D. et al. Strain and bioprocess improvement of a thermophilic anaerobe for the production of ethanol from wood // *Biotechnology for Biofuels*. – 2016. – Т. 9. – №. 1. – С. 125.
- Lacis L. S., Lawford H. G. Ethanol production from xylose by *Thermoanaerobacter ethanolicus* in batch and continuous culture // *Archives of Microbiology*. – 1988. – Т. 150. – №. 1. – С. 48-55.
- Asgher M. et al. A thermostable α -amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing // *Journal of Food Engineering*. – 2007. – Т. 79. – №. 3. – С. 950-955.
- Егорова М. А., Нетрусов А. И. Практикум по микробиологии. Учеб. пособие для студ. ВУЗов // М.: Изд. Центр «Академия». – 2005.