

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ
МИКРООРГАНИЗМОВ ИЗ ГИПЕРСОЛЁНЫХ СРЕД И
ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
ПОТЕНЦИАЛА**

Учебно-методическое пособие для студентов биологического факультета,
обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 «Биология»

Саратов
2019

УДК 19.31
ББК 28.072я73+28.070я73
В54

Составители:

И.М. Ибрахим, С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, Е.Н. Сигида

Выделение и идентификация микроорганизмов из гиперсолёных сред и исследование их биотехнологического потенциала: Учеб.-метод. пособие для студ. биол. фак. / Сост.: И.М. Ибрахим, С.А. Коннова, Ю.П. Федоненко, Е.Н. Сигида. – Саратов, 2019. – 42 с.: ил.

Учебно-методическое пособие содержит практические рекомендации по изоляции и идентификации полисахаридпродуцирующих микроорганизмов из гиперсолёных сред с учетом особенностей их осмоадаптации. Пособие необходимо для освоения курса «Экспериментальные методы исследования стресса и адаптации», который реализуется для студентов биологического факультета, обучающихся по направлению подготовки 06.03.01 «Биология» профилю «Биохимия и физиология процессов стресса и адаптации». Каждая работа содержит краткие теоретические комментарии по цели и технике проведения экспериментов.

Публикуется по решению учебно-методической комиссии
биологического факультета
Саратовского государственного университета

УДК 19.31
ББК 28.072я73+28.070я73

Работа издана в авторской редакции

© И.М. Ибрахим, С.А. Коннова,
Ю.П. Федоненко, Е.Н. Сигида
составление, 2019

ТЕМА 1. ОСОБЕННОСТИ РАБОТЫ С МИКРООРГАНИЗМАМИ ИЗ ГИПЕРСОЛЕННЫХ СРЕД

Большая часть земной поверхности покрыта Мировым океаном, характеризующимся высоким разнообразием населяющей его микробиоты, способной выживать в условиях осмотического стресса. Гиперсоленые среды, такие как естественные соляные озера, почвы-солончаки, искусственные солеварни представляют экосистемы с меньшим разнообразием, но более высокой плотностью сообществ. Эти относительно просто организованные экосистемы, по сравнению с морскими или пресноводными, представляют удобный объект исследования фундаментальных аспектов биоразнообразия, селекции, биогеографии, эволюции и адаптации микроорганизмов.

Микроорганизмы, которые выживают в этих средах, классифицированы как галофильные (требующие соли для сохранения их жизнеспособности) и галотолерантные (способные расти как в отсутствие, так и в присутствии солей). Галотолерантные (осмофильные) микроорганизмы не требуют хлорида натрия для своего роста, но способны адаптироваться к довольно высоким (до 15%) концентрациям соли. Галофильные бактерии по уровню адаптации к разным концентрациям соли разделяют на три группы: слабые (2-5% NaCl); умеренные (3-15% NaCl); экстремальные (15-25% NaCl). Среди

галотолерантных и галофильных организмов встречаются археи, прокариоты и эукариоты.

Галобактерии относятся как к грамотрицательным (*Vibrio*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Halomonas*), так и к грамположительным (*Clostridium*, *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Bacillus*), среди них встречаются аэробы, факультативные и облигатные анаэробы. Галобактерии и археи являются продуцентами различных важных в практическом отношении биомолекул, таких как низкомолекулярные соединения, каротиноиды, вещества белковой природы, в том числе бактериородопсин, ферменты, и другие полимеры, например, полигидроксibuтират, экзополисахариды.

Изоляция, идентификация и исследование свойств галофильных микроорганизмов весьма перспективны, но имеют ряд особенностей, которые необходимо учитывать при манипуляциях с ними.

Потенциальными источниками изоляции галофильных бактерий и архей являются насыщенные рассолы (рапа) соленых озёр, сырая соль из испарительных прудов. Солеустойчивые археи могут быть отделены от бактерий либо путем обогащения солью, либо путем прямого посева на среду, содержащую пенициллин, ограничивающий рост галотолерантных и галофильных эубактерий.

1.1 Отбор образцов микроорганизмов из природной среды

Галофильные микроорганизмы (изоляты) могут быть выделены из различных источников (рисунок 1).

Жидкие пробы, как правило, отбираются из солёных озёр или морей с глубины 30 см ниже поверхности воды. Во избежание контаминации, используют специальные стерильные бутылки, открывающиеся и закрывающиеся под водой. Образцы почвы на берегах озёр или морей отбирают на глубине от 5 до 10 см от поверхности воды, чтобы исключить

забор слоев почвы, подвергавшихся воздействию солнечных лучей. Образцы помещаются в стерильные пластиковые коробки или пакеты.

Для выделения изолятов микроорганизмов из солнечных соляных прудов используют образцы сухой соли, часто окрашенной в желтый, розовый или красный цвет.



Солнечный соляной пруд
(озеро Карун, Файюм)



Солончаки на берегу соляного
пруда



Соляная грязь, собранная из
пруда - испарителя



Сырая соль, окрашенная
пигментами галофилов

Рисунок 1 – Источники выделения галофильных микроорганизмов.

Внешний слой образца должен быть очищен, а внутренняя часть используется для изоляции микроорганизмов в условиях стерильности.

Образцы грязи обычно отбираются в наполненных водой углублениях на берегах солнечных соляных прудов, которые часто имеют желтый, оранжевый, розовый или красный цвет. Предварительно снимают

поверхностный слой и отбирают образцы в стерильные контейнеры с помощью стерильных инструментов, чтобы минимизировать возникновение загрязнения.

1.2 Питательная среда для выделения галофилов

Как правило, для полноты характеристики всех типов микроорганизмов, обитающих в условиях засоления, используют богатые питательные среды с достаточно высоким содержанием углеводных компонентов.

Примером такой среды является среда Сегала-Гибсона (S-G) [1] следующего состава, в граммах на 1 литр H₂O:

NaCl	50-250;
MgSO ₄ ×7H ₂ O	20;
KCl	2;
Цитрат натрия	3;
Дрожжевой экстракт	10;
Казаминовые кислоты	7,5;
Сахароза	10;
Глюкоза	10.

Для приготовления среды готовят растворы А и Б.

Раствор А: глюкоза – 10 г, сахароза – 10 г, дрожжевой экстракт – 10 г, казаминовые кислоты – 7,5 г, H₂O – 200 мл.

Раствор Б: MgSO₄×7H₂O – 20 г, KCl – 2 г, цитрат натрия (Na₃C₆H₅O₇) – 3 г, NaCl – 0; 50; 100; 150 или 250 г (в зависимости от варианта опыта), H₂O – 800 мл.

Затем растворы А и Б смешивают и титруют 1н NaOH (4 г NaOH : 100 мл H₂O) до конечного значения рН 7,5 (по показаниям рН-метра). Среду S-G стерилизуют в конических колбах, закрытых ватно-марлевыми

пробками, автоклавируя 30 мин при 121°C. Для получения плотной среды S-G в нее перед стерилизацией добавляют 2,0 % бактериологического агара. Культивирование бактерий осуществляют с использованием жидкой и плотной сред S-G, а для хранения изолятов (при –70°C) используют жидкую среду S-G с добавлением 20% глицерина.

1.3 Приготовление накопительной культуры

Для получения накопительной культуры в конические колбы объемом 250 мл, содержащие жидкую среду S-G (90 мл) с разными концентрациями NaCl (5, 10, 15, 25%), выбранными в соответствии с классификацией микроорганизмов по устойчивости к соли, добавляют образцы в жидкой (10 мл) либо твердой (10 г) форме и культивируют в шейкере-инкубаторе при 30 или 37°C в течение 3–7 суток (170 об/мин).

По окончании времени инкубации выполняют разведение взвеси микроорганизмов методом серийных разведений (рисунок 2), для чего в условиях стерильности проводят отбор 1 мл взвеси клеток из накопительной культуры и выполняют следующие процедуры:

1) по 1 мл обогащенной культуры асептически пипетируют в 4-х пробирках с 9 мл стерильного фосфатно-солевого буфера в каждой, различающихся содержанием NaCl (5, 10, 15, 25% соответственно), что позволяет получить 10-ти кратное разведение культуры бактерий (разбавление 10^{-1});

2) затем берут по 1 мл взвеси бактерий, полученных на предыдущем этапе, и последовательно не менее шести раз повторяют аналогичные процедуры разведения (см. пункт 1), что позволяет получить кратные разбавления ($10^{-2} - 10^{-8}$);

3) начиная с разведения 10^{-5} , отбирают по 1 мл взвеси бактерий и помещают в стерильные пустые чашки Петри (\varnothing 90 мм), в которые затем добавляют стерильную агаризованную среду S-G (20 мл), разогретую, а

затем остуженную до температуры 50-55°C, содержащую NaCl, в концентрации, соответствующей той, в которой находилась взвесь бактерий. Суспензию бактерий равномерно распределяют в среде, и оставляют до полного затвердевания среды;

4) Затем чашки Петри инкубируют при 30 и 37°C в термостате в течение от 3 дней до 2 недель (рисунок 3). В качестве контроля стерильности среды в термостате выдерживают не инокулированную чашку с агаризованной средой;

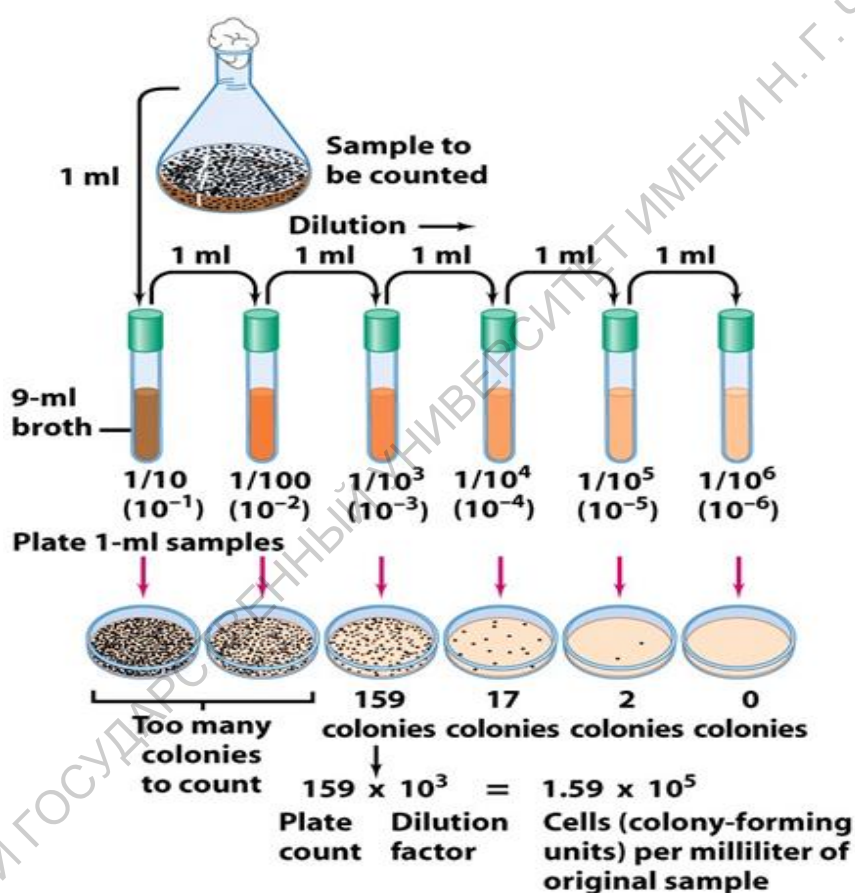


Рисунок 2 – Схема разведения накопительной культуры.



Рисунок 3 – Чашка Петри с высевом из накопительной культуры.

5) по мере роста микроорганизмов из накопительной культуры отбирают колонии, растущие на поверхности среды (аэробные). Эти колонии собирают с помощью микробиологической петли и рассеивают на другие чашки Петри со средой аналогичного состава для получения индивидуальных колоний чистых культур (рисунок 4).



Рисунок 4 – Чашки Петри с посевами изолированных культур галофильных микроорганизмов и с рассевом для получения индивидуальных колоний: слева (1-4) представлены схемы штриховки микробиологической петлём при посеве для получения индивидуальных колоний микроорганизмов.

Для выделения бактериальных изолятов, продуцирующих экстраклеточные полисахариды (ЭПС), отбирают колонии

микроорганизмов с мукоидным фенотипом (ослизненные колонии), которые затем засевают на чашки Петри со свежей средой для получения чистых бактериальных культур.

Чистоту культур контролируют с помощью световой микроскопии методом «раздавленной» капли. Визуализацию полисахаридного слизистого материала на поверхности клеток осуществляют с использованием трансмиссионной электронной микроскопии. Отобранные для дальнейших исследований микробные культуры хранят при -70°C в среде S-G, содержащей 20% глицерина и оптимальные концентрации NaCl.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. Чернышевского

ТЕМА 2. ИССЛЕДОВАНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНО- МОРФОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ИЗОЛЯТОВ ГАЛОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Для каждой изолированной культуры микроорганизмов обязательно характеризуют морфологию колоний, указывая следующие параметры: *профиль* (плоский, выпуклый, кратерообразный или конусовидный); *форму* (округлая, амебоидная или неправильная, ризоидная); *размер* (мм); *поверхность* (гладкая, шероховатая, морщинистая и т.д.); *наличие блеска и его характер, прозрачность* колоний (блестящая, матовая, тусклая, прозрачная); *цвет* (наличие пигментации); *край колонии* (ровный, волнистый, зубчатый, бахромчатый); *структуру* (однородная, мелко - или крупнозернистая, струйчатая и т.д.); *консистенцию* колоний (плотная, мягкая, слизистая, хрупкая, мучнистая и т.д.), а также способность к образованию глубинных, врастающих колоний; способность к выделению углекислого или других газов. Эту работу выполняют с помощью лупы, бинокля или микроскопа при малом увеличении. Примеры некоторых из описываемых параметров морфологии колоний представлены на рисунке 5. Колонии изолятов галофильных бактерий с мукоидным фенотипом представлены на рисунке 6.

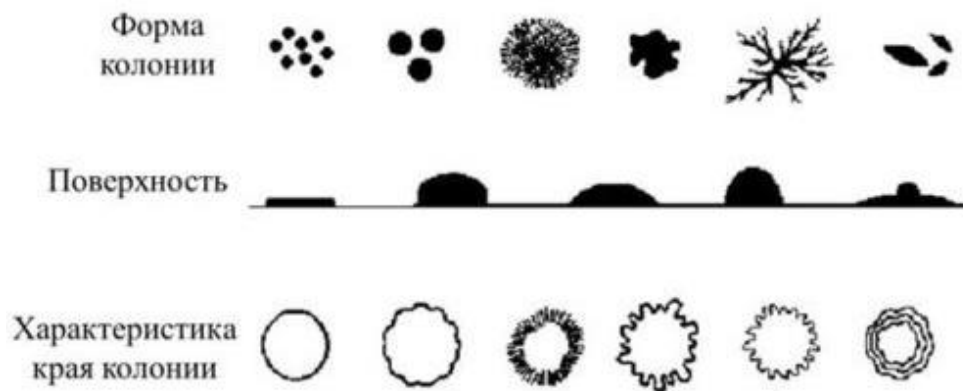


Рисунок 5 – Характеристика морфологии колоний, схема описания.



Рисунок 6 – Фото мукоидных (ослизненных) колоний бактерий (предположительно продуцирующих ЭПС) на чашках Петри с плотной питательной средой S-G и добавлением NaCl.

Подвижность изолятов исследуют при помощи световой микроскопии, морфологию и размеры клеток, наличие и характер жгутикования, наличие и положение спор оценивают с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) на микроскопе Libra 120 («Carl Zeiss», Германия).

Для каждой культуры определяют основные биохимические характеристики, важные для определения ее таксономической принадлежности. Подробно методика этих анализов приведена в методическом пособии [2]. Все результаты исследований свойств культур заносят в таблицу, пример оформления которой представлен ниже (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты исследования штаммов галофильных микроорганизмов по морфологическим и биохимическим характеристикам.

характеристика	штаммы		
	1	2	3
окраска по Граму	+		
морфология клеток	бациллы		
наличие/форма/положение спор	+/С/Л		
подвижность	+		
пигментация колоний	кремовые		
размер колоний (Ø, мм)	5		
диапазон концентраций NaCl (%), при котором наблюдается рост	5-15		
концентрация NaCl (%), оптимальная для роста	10		
диапазон pH, при котором наблюдается рост	5-9		
диапазон T (°C), при котором наблюдается рост	10-43		
тест Фогеса-Проскауэра	-		
каталазная активность	+		
оксидазная активность	-		
редукция нитратов/нитритов	+/+		
способность к гидролизу			
казеина	+		
желатины	-		
крахмала	-		
образование кислоты из:			
глюкозы аэр/анаэр	+/+		
маннита	-		
сорбита	-		
ксилозы	+		
арабинозы	+		
маннозы	+		
фруктозы	+		
лактозы	+		
сахарозы	+		
мальтозы	-		

Примечания. «-» Отрицательная реакция, «+» положительная реакция, «±» слабоположительная реакция; «С» – сферическая; «Л» – латеральное. Первый столбец заполнен в качестве примера.

2.1 Таксономические исследования отобранных изолятов микроорганизмов

Совокупность морфологических, биохимических, физиологических характеристик при дополнительном использовании молекулярно-биологического подхода с биоинформатическим анализом полученных данных позволяет идентифицировать видовую принадлежность микробных изолятов. Ниже мы приводим общую схему проведения молекулярно-биологического анализа, который может быть выполнен с привлечением сервисных компаний соответствующего профиля.

Одним из признанных критериев определения рода (вида) микроорганизмов на молекулярном уровне является анализ последовательности нуклеотидов гена 16S рДНК, амплификацию которого осуществляют методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием универсальных пар праймеров:

fD1 5' GCCGGAGGTCATTGCTAGTGGAGTC 3'

rD1 5' AGGAGGTGATCCAGCCGCAGATTCC 3' для архей [3] и

fD1 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

rD1 5' CTTAAGGAGGTGATCCAGCC 3' для бактерий [4].

ПЦР выполняют в течение 30 циклов: денатурация 30 с при 95°C, отжиг 1 мин при 40°C и полимеризация в течение 2 мин при 72°C. Продукты ПЦР (~1540 п.н.) разделяют методом электрофореза в агарозном геле и извлекают продукты амплификации с помощью набора Nucleotrap («Macherey-Nagel», Германия).

Секвенирование осуществляют на базе доступных сервисных компаний, например, «Синтол» или «Genetico» (<https://www.syntol.ru/> и <https://genetico.ru/price/uslugi-po-sevenirovaniyu> г. Москва).

Сравнение полученных последовательностей генов 16S рДНК с таковыми в базе данных GenBank осуществляют с использованием онлайн сервиса Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Результаты секвенирования с

использованием различных праймеров обобщают с использованием CAP программ (Contig Assembly and Genomic Expression programs).

На основании полученных сведений осуществляют построение филогенетических дендрограмм, например, методом присоединения соседей с использованием программного пакета FASTMe (<https://galaxy.pasteur.fr>). Статистическую достоверность дендрограмм рассчитывают с помощью «bootstrap» анализа с использованием построения 1000 альтернативных деревьев. Результирующее дерево может быть построено с помощью программы TreeView и использованием восходящего алгоритма кластерного анализа.

2.1.1 Исследование микроорганизмов световой микроскопией

Исследование проводят методом «раздавленной» или «висячей» капли на лабораторных микроскопах DM2500 и DM6000 В («Leica», Германия) для определения подвижности, формы и размеров клеток на разных стадиях роста как в жидкой, так и на плотной питательной среде S-G при различных концентрациях NaCl. Если есть необходимость сравнить две культуры по подвижности, используют специальную компьютерную программу, позволяющую анализировать скорость и траекторию движения микроорганизмов [5].

2.2 Дифференциация бактерий по способности к окраске по Граму

Метод окраски микроорганизмов, предложенный в 1884 году Гансом Кристианом Грамом, позволяет дифференцировать бактерии на две группы по различию в структуре бактериальной клеточной стенки.

2.2.1 Процедура окрашивания по Граму галофильных микроорганизмов

Бактериальные мазки готовят как из жидкой культуры, так и из клеток, взятых из колоний с поверхности твердой среды, суспендированных в солевом растворе. Поскольку высокие концентрации

NaCl мешают процессу окрашивания по Граму, то для галофилов этот метод проводят в модификации в соответствии с [6]. Высушенный на воздухе фиксированный мазок перед окрашиванием заливают на 5 мин 2% уксусной кислотой (об./об.) Уксусную кислоту удаляют, и мазок окрашивают 1% водно-кристаллическим фиолетовым (мас./об.), затем обрабатывают в течение 1 мин раствором йода. После удаления йода мазок промывают 95% этанолом. Грамположительные клетки в отличие от грамотрицательных сохраняют окраску. Чтобы сделать это очевидным, препарат контрастируют красным красителем, например, 1% водного сафранина (мас./об.), так что грамотрицательные клетки легко видны (рисунок 7).

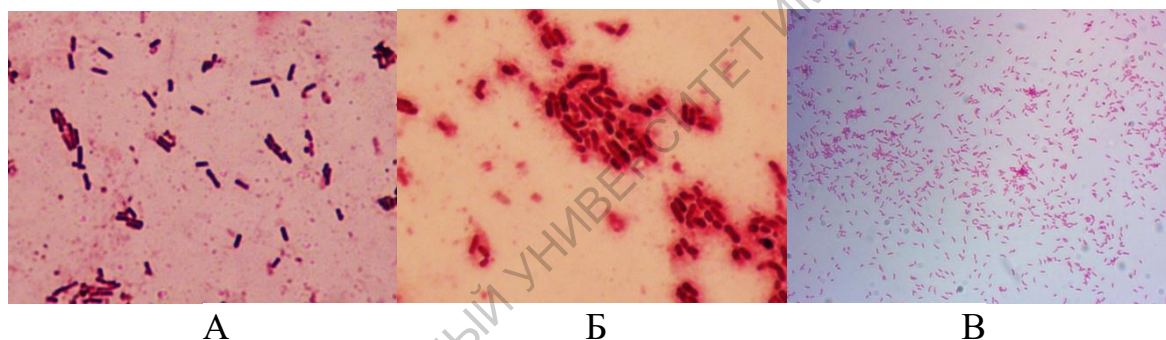


Рисунок 7 – Микрофотографии клеток бактерий после окрашивания по Граму: А – грамположительные; Б, В – грамотрицательные бактерии ($\times 10^3$).

2.2.2 Дифференциация бактерий тестом с КОН

С учетом специфики анализа галофильных бактерий метод окрашивания по Граму часто дополняют «тестом с КОН», который также позволяет дифференцировать грамположительные и грамотрицательные бактерии.

Биомассу (одну петлю) каждого галофильного изолята на предметном стекле суспендируют в капле 3% раствора КОН (масс./об.) с добавлением 5, 10, 15 и 25% NaCl (масс./об.). В качестве контроля грамотрицательных и

грамположительных микроорганизмов обычно используют суспензии клеток *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*, соответственно.

После воздействия щелочи на грамотрицательные клетки они легко лизируют и формируют вязкую жидкость, из которой петлей от капли вытягивается «нить» в несколько сантиметров (см. рисунок 8). При тех же условиях клеточная суспензия грамположительных бактерий не образует вязкого лизата.



Рисунок 8 – Фотография, демонстрирующая воздействие щелочи на клетки грамотрицательных бактерий.

2.3 Окрашивание спор изолятов

Споры (эндоспоры, или внутренние споры) – особые внутриклеточные образования овальной или округлой формы, наблюдаемые в цикле развития преимущественно палочковидных бактерий. Способность к спорообразованию и его характер, имеющий большое значение при диагностике бактерий, часто выявляют методом Шеффера-Фултона в соответствии с [7].

Мазок микроорганизмов, зафиксированный обычным способом на предметном стекле нагреванием, покрывают фильтровальной бумагой, пропитанной 0,5% раствором малахитового зеленого (мас./об.), и прогревают на кипящей водяной бане в течение 5 мин. После этого предметное стекло промывают проточной водой. Затем мазок заливают раствором карболового фуксина на 30 с, после чего промывают и высушивают, а далее исследуют под микроскопом. Эндоспоры выглядят

ярко-зелеными, а вегетативные клетки – коричневато-красными (рисунок 9).

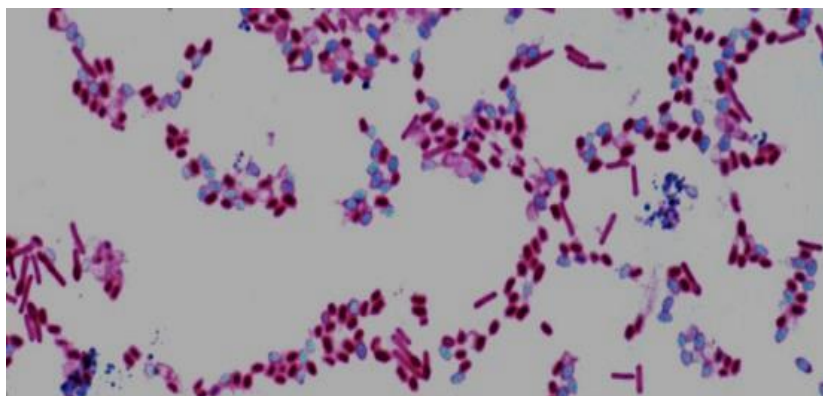


Рисунок 9 – Микрофотография бактерий, окрашенных по Шефферу-Фултону ($\times 10^3$).

2.4 Определение уровня термостойкости бактерий

Для выявления термостойкости микроорганизмов жидкие культуры изолятов пастеризуют при 80°C в течение 10 мин, затем инокулируют в среду S-G, с добавлением NaCl, в оптимальных для данных изолятов концентрациях, и инкубируют при определенной температуре для каждого штамма от 3 до 14 дней. Уровень термостойкости определяют по выживаемости изолятов.

2.5 Характеристика устойчивости к NaCl в среде выращивания

Как указывалось выше, по способности к росту при различных концентрациях соли изоляты разделяют на 4 группы. Изоляты, способные расти при концентрации соли 25%, относят к экстремальным галофилам. Пограничные экстремальным галофилами объединяют культуры, способные расти при концентрации соли 15%. К умеренным и слабым галофилам относят бактерии, растущие при концентрации соли в среде 10% и 5%, соответственно. Однако для каждой культуры бактерий помимо диапазона выдерживаемых концентраций рекомендуется выявлять оптимальные для

роста концентрации NaCl, при которых наблюдается максимальное накопление биомассы.

Тестирование изолированных культур микроорганизмов осуществляют, высевая на плотные среды S-G с различным содержанием NaCl – 0, 5, 10, 15 и 25% (мас./об.).

Для примера, на рисунке 10 представлен анализ 5 изолятов по устойчивости к соли, из которого следует, что изоляты 1 и 3 демонстрируют активный рост в отсутствие соли в среде, но устойчивы при этом к концентрациям соли 5 и 10% соответственно.

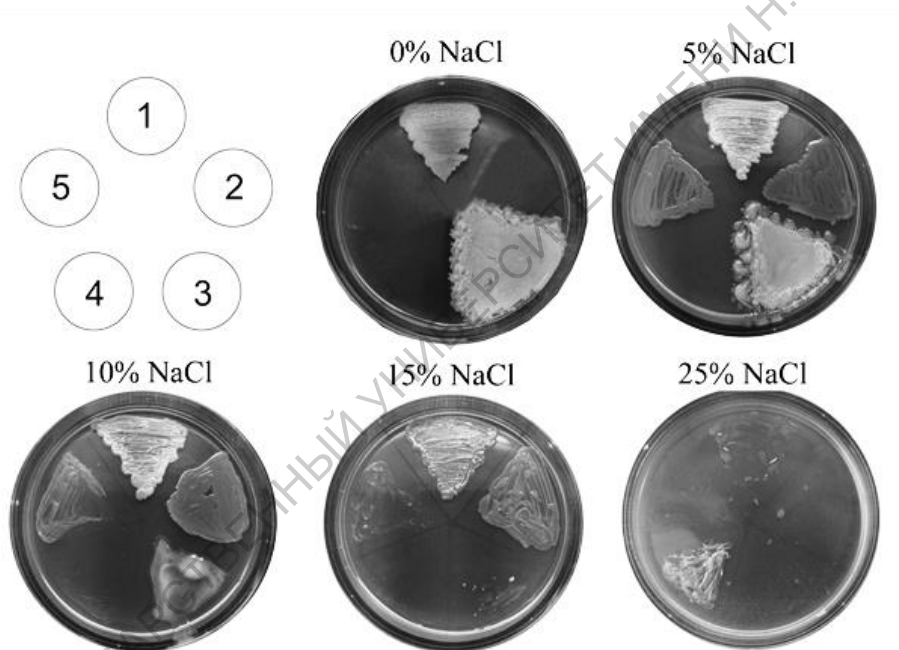


Рисунок 10 – Результаты исследования солетолерантности пяти галофильных изолятов.

2.6 Изучение антибиотикорезистентности микроорганизмов

Для тестирования устойчивости изолятов к различным антибиотикам готовят чашки Петри с плотной средой S-G с добавлением соли в различных концентрациях. Инокулируют чашки с агаром, равномерно распределяя 72-часовую культуру по поверхности твердой среды, а затем

поверх инокулята размещают диагностические диски с антибиотиками. Чашки инкубируют при оптимальной для роста микроорганизмов температуре в течение 3 и 7 дней. Стандартный набор используемых антибиотиков и их концентраций представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Устойчивость различных штаммов бактерий к различным антибиотикам

№ п/п	антибиотик	концентрации, мкг	диаметр зоны отсутствия роста (мм)		
			Штамм АВ		
1	стрептомицин	10	12		
2	хлорамфеникол	30	32		
3	пенициллин	10*	10		
4	ампициллин	10	40		
5	эритромицин	10	50		
6	торбамицин	10	35		
7	клиндамицин	30	30		
8	колистин сульфат	10	20		
9	неомицин	30	18		
10	гарамицин	10	7		
11	карбенициллин	100	35		
12	офлоксацин	10	25		
13	цефоперазон	75	30		
14	рифампицин	30	21		
15	фузидовая кислота	10	30		
16	новобиоцин	5	20		
17	бацитрацин	10*	22		
18	тетрациклин	30	-		
19	наликсидовая кислота	30	-		

Пример исследования представлен на рисунке 11. Уровень чувствительности определяют по диаметру кольца отсутствия роста вокруг диска с антибиотиком.

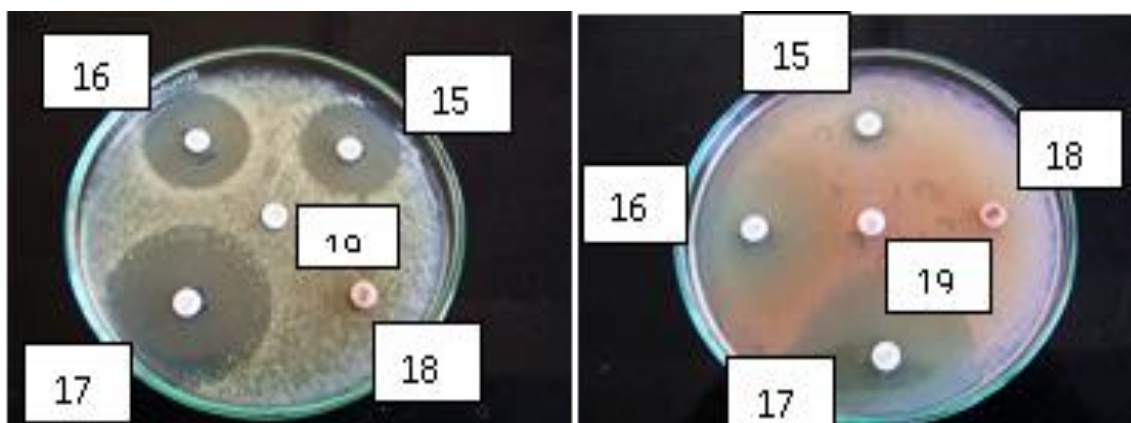


Рисунок 11 – Исследование чувствительности изолятов штаммов к некоторым антибиотикам. 15 – фузидовая кислота, 16 – новобиоцин, 17 – бацитрацин, 18 – тетрациклин, 19 – наликсидовая кислота.

Из примера, приведенного в таблице 2, следует, что полная резистентность (устойчивость) у штамма АВ выявлена только по отношению к тетрациклину и наликсидовой кислоте.

2.7 Выявление у изолятов оксидазной активности

Для этого анализа используют тест-полоски Bactident-oxidase test strips («Merck», Германия). Микробиологической петлей высевают единичную колонию на реакционную полоску, содержащую «NaDi-реагент» (α -нафтол и N,N-диметил-1,4-фенилендиаммоний хлорид).

В присутствии фермента из класса оксидоредуктаз реагент окисляется, о чем свидетельствует появление синего цвета в течение нескольких минут. Если изменений цвета полоски не наблюдается, то это указывает на отсутствие оксидазной реакции (рисунок 12).



Рисунок 12 – Внешний вид тест-полосок Bactident-oxidase с положительным (+) и отрицательным (-) результатом оксидазного теста.

2.8 Анализ наличия каталазной активности

Среди биохимических характеристик каталазная активность, выявляемая только у аэробных или факультативно анаэробных микроорганизмов, является чрезвычайно важной для таксономической дифференциации бактерий.

Для выявления каталазной активности в 3% раствор перекиси водорода (об./об.) (Bactident®-Catalase, «Merck», Германия) опускают исследуемую колонию на предметном стекле. О наличии каталазной активности свидетельствует образование пузырьков вокруг колонии (рисунок 13).



Рисунок 13 – Фотографии результатов теста на наличие каталазной активности.

2.9 Анализ активности изолятов в отношении различных субстратов

Для быстрой идентификации отобранных изолятов галофильных микроорганизмов быстрым и удобным методом является использование тест-систем API20E и API50CH («Bio Mérieux», Франция). Все биохимические реакции выполняют в присутствии NaCl в среде с концентрацией, оптимальной для каждого изолята.

API20E полоски

Полоска API 20E состоит из 20 микротрубок, содержащих различные субстраты (пример на рисунке 14). Бактериальную суспензию вносят в лунки стрипов API20E, а затем инкубируют при оптимальной температуре

для каждого штамма. Результат регистрируют через 24-48 ч для всех штаммов, за исключением архей, анализ которых проводят через 96 часов. Во время инкубации ферменты микроорганизмов метаболизируют субстраты, что проявляется изменением цвета среды самопроизвольно или при добавлении дополнительных реагентов. Для анализа результата теста используется приложенная производителем таблица.

API50CH полоски

Набор API50CH для изучения ферментации углеводов и их производных состоит из 50 микро튜브, содержащих необходимые реагенты. После внесения инокулята в микро튜브 с предварительно растворенными субстратами проводят инкубацию при оптимальной температуре для каждой культуры. Наличие брожения, т.е. ассимиляции субстрата, выявляется по изменению цвета в пробирке, вызванному выработкой кислоты, и определяется индикатором pH, присутствующим в выбранной среде (рисунок 15). Первая пробирка, без внесения инокулята, является отрицательным контролем. Анализ теста проводят согласно инструкции по применению системы API.

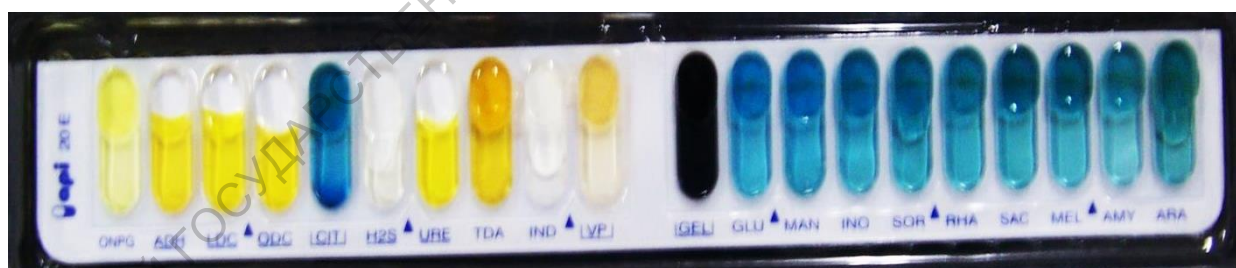


Рисунок 14 – Пример результатов исследования ферментативной активности изолята галофильных бактерий (ТЕСТ – субстрат): ONPG – нитрофенил-D-галактопиранозид, ADH – L-аргинин, LDC – L-лизин, ODC – L-орнитин, CIT – тринатрийцитрат, H₂S – тиосульфат натрия, URE – мочевины, TDA – L-триптофан, IND – L-триптофан, VP – пируват натрия, GEL – желатин, GLU – D-глюкоза, MAN – D-маннит, INO – инозит, SOR – D-сорбит, RHA – L-рамноза, SAC – D-сахароза, MEL – D-мелибиоза, AMY – амигдалин, ARA – L-арабиноза.



Рисунок 15 – Результаты исследования способности изолятов утилизировать сахара и их производные, которые обозначены цифрами, расшифровка которых представлена в приложении к набору реактивов.

2.9.1 Изучение нитратредуцирующих свойств изолятов

Среда для определения нитратредуцирующей активности. Состав в г/л: экстракт говядины – 3,0; пептон – 5,0; NaCl – 5,0; KNO_3 – 1,0. Наличие нитратредуцирующей активности определяют после 5 дней инкубации путем добавления 0,1 мл реактива А и 0,1 мл реактива Б к посевам культуры уколom в среду. Контрольный эксперимент проводится в тех же условиях с использованием стерильной питательной среды. Реактив А: 0,8% раствор сульфаниловой кислоты в 5 н уксусной кислоте (растворять при осторожном нагревании); реактив Б: 0,6% раствор диметил-*N*-нафтиламина в 5 н уксусной кислоте.

Появление четкого розового или красного окрашивания указывает на наличие нитрита, т.е. на способность изолята превращать нитрат в нитрит. К среде с изолятом, проявляющим отрицательную реакцию, добавляют порошок цинка, при этом появление красного окрашивания среды указывает на присутствие нитрата, т.е. на то, что изолят не обладает нитратредуцирующей активностью. Если окраска раствор не меняется, бактерия восстанавливает нитрат через нитрит до газообразного азота.

2.9.2 Исследование способности у изолятов утилизировать лимонную кислоту с использованием Simmons цитратного агара (SCA)

Состав среды в г/л: $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,2; $NH_4H_2PO_4$ – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; цитрат натрия – 2,0; NaCl – 5,0; бромтимоловый синий – 0,08; агар – 15,0. Ингредиенты растворяют и среду стерилизуют при 121°C 15 мин.

Чашки с SCA засевают культурой изолята и инкубируют при 37°C в течение 48 ч, после чего проверяют наличие роста микроорганизмов на среде, который сопровождается повышением pH, что приводит к изменению цвета среды от ее исходного зеленого цвета к темно-синему.

2.9.3 Исследование способности изолятов к гидролизу крахмала

Состав в г/л: экстракт говядины – 3,0; растворимый крахмал – 10,0; агар – 12,0. Ингредиенты растворяют в водном растворе NaCl в оптимальной для изолята концентрации и стерилизуют среду при 121°C в течение 15 мин. Далее наносят каждый исследуемый изолят на поверхность плотной среды в чашки Петри, инкубируют при 37°C в течение 48 ч и для визуализации эффекта покрывают поверхность раствором йода.

Йод, вступая во взаимодействие с крахмалом, придает среде синее окрашивание. Культуры, гидролизующие крахмал вследствие проявляемой амилазной активности, характеризуются наличием неокрашенной зоны вокруг образованных колоний или штриха (рисунок 16).

Раствор йода готовят следующим образом: йод – 5 г; иодида калия – 10 г; дистиллированная вода – 100 мл. Растворить иодид калия и йод в 10 мл воды и далее добавить остальную воду. При использовании разводить реактив 1:10 дистиллированной водой.



А

Б

Рисунок 16 – Результаты визуализации теста изолятов на наличие амилазной активности А – до окрашивания и Б- после окрашивания агара йодом.

2.9.4 Изучение способности изолята гидролизовать желатину

Состав среды в г/л: желатина – 30,0; агар – 15,0; панкреатический гидролизат казеина – 10,0; NaCl – 10,0.

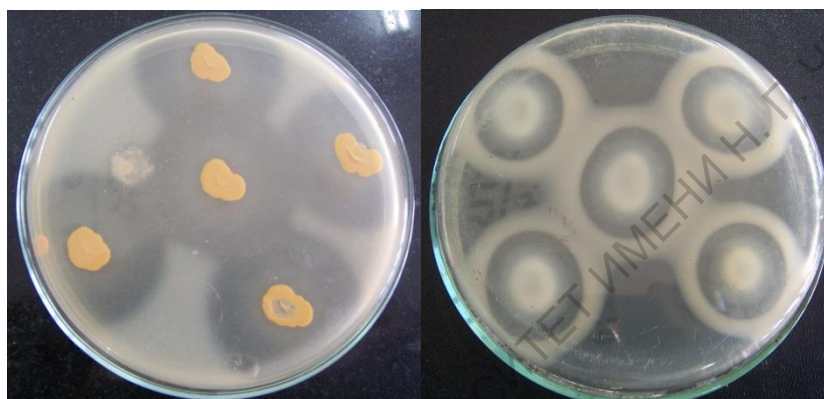
После полного растворения ингредиентов среду автоклавируют в течение 15 мин при 121°C. Далее в чашки Петри делают высевы по одной петле каждого изолята по поверхности желатиново-агаровой среды. Инкубируют чашки при 37°C в течение 4-7 сут, после инкубации заливают поверхность агара раствором хлорида ртути и выдерживают в течение 5-10 мин. В присутствии раствора хлорида ртути может наблюдаться чистая зона вокруг колоний культуры, что показывает наличие протеолитического гидролиза желатина.

2.9.5 Выявление у изолятов казеиназной и эстеразной активностей

Солевой состав базовой среды в г/л: NaCl – 250,0; KCl – 2,0; MgSO₄×7H₂O – 5,0; дрожжевой экстракт – 1,0. Ингредиенты растворяют и среду стерилизуют при 120°C 15 мин. К основному составу добавляют 1% раствор обезжиренного молока (мас./об.) и 0,2% Твин 80 (об./об.). Молоко

предварительно автоклавируют отдельно при 115°C и объединяют с основным составом при температуре около 60°C.

Гидролиз казеина в среде, содержащей обезжиренное молоко, обнаруживают по наличию прозрачной зоны вокруг штрихового посева культуры. На активность эстеразы указывает образование ореолов, вызванных формированием осадков лаурата, пальмитата или олеата кальция вокруг зон роста на среде, содержащей Твин 80 (рисунок 17).



казеиназа

эстераза

Рисунок 17 – Результаты исследования казеиназной и эстеразной активностей изолятов галофильных микроорганизмов.

2.9.6 Исследование способности к ферментации углеводов

Состав в г/л: трипсинизированный пептон – 10,0; глюкоза (и другие тестируемые сахара) – 5,0; NaCl – 5,0; феноловый красный – 0,018.

Растворяют ингредиенты при нагревании и разливают по пробиркам, стерилизуют при 115°C в течение 15 мин, вносят в каждую пробирку со средой по одной петле культуры изолята, инкубируют в течение 24-48 ч при 37°C. Затем исследуют пробирки на предмет роста (+), образования кислоты (А – изменение окраски фенолового красного в желтый цвет) и газообразования (G – детекция в среде пузырьков газа).

2.9.7 Тестирование продукции индола в среде

Состав среды в г/л: триптон – 10,0; экстракт (бульон) говядины – 3,0; NaCl – оптимальная концентрация для каждого изолята. Среду стерилизуют автоклавированием при 121°C в течение 15 мин. Инокулируют среду культурой изолята и инкубируют в течение 48 ч при 37°C. Далее добавляют по 1 мл реагента Ковача и анализируют результат: ярко-розовый цвет в верхнем слое среды указывает на наличие индола.

Реагент на индол готовят следующим образом: растворяют *n*-диметиламинобензальдегид (5,0 г) в этиловом спирте (75 мл), осторожно нагревая на водяной бане при 50-55°C, охлаждают, добавляют HCl_{конц} (25 мл), хранят при 4°C в темной склянке.

2.9.8. Тест Фогеса-Проскауэра (VP)

Метод обнаружения бактерий семейства Enterobacteriaceae и Vibrionaceae, а также спорообразующих аэробных бактерий, основанный на том, что при их культивировании на среде Кларка накапливается ацетоин (ацетил-метилкарбинол – продукт анаэробного превращения глюкозы), обнаруживаемый по розовому окрашиванию среды после добавления раствора α -нафтола и едкого калия.

Состав в г/л пептон – 10,0; глюкоза – 5,0; NaCl – в оптимальных концентрациях для каждого изолята. Ингредиенты растворяют при нагревании и распределяют по пробиркам, стерилизуют при 115°C в течение 15 мин. Готовят раствор А: α -нафтол – 5,0 г; C₂H₅ОН_{абс} – 100 мл. Раствор Б: КОН – 40,0 г; H₂O_{дист} – 100 мл.

Разливают по 1 мл 48-часовой культуры в пробирки и добавляют по 0,6 мл раствора А и 0,2 мл раствора Б, встряхивают после добавления каждого раствора и инкубируют в течение 4 ч при 37°C. Развитие розового окрашивания является положительным результатом теста.

2.9.9 Уреазный тест

Способность к биосинтезу уреазы исследуют на среде следующего состава, г/л: мочевины – 20,0; дрожжевой экстракт – 0,1; Na_2HPO_4 – 9,5; K_2HPO_4 – 9,1; феноловый красный – 0,01; NaCl – в оптимальных концентрациях для каждого изолята.

Все компоненты среды растворяют в $\text{H}_2\text{O}_{\text{дист}}$, стерилизуют фильтрацией через бактериальный фильтр (\varnothing пор 0,45 мкм), асептически разделяют на порции по 1,5 – 3 мл в стерильные тест пробирки (13×100 мм) и инокулируют исследуемыми микроорганизмами. После инкубации до 48 ч пробирок при 37°C анализируют изменение цвета среды. Красное или вишнёвое окрашивание указывают на наличие, а желтый – на отсутствие у культуры уреазной активности.

2.9.10 Рост на трехсахарном железосодержащем агаре

Состав в г/л: экстракт говядины – 3,0; дрожжевой экстракт – 3,0; пептон – 2,0; глюкоза – 1,0; лактоза – 10,0; сахароза – 10,0; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; NaCl – 5,0; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ – 0,3; феноловый красный – 0,03; цитрат железа – 0,3; агар – 12,0.

Растворяют все ингредиенты, добавляют агар и доводят до кипения, после чего охлаждают до 50-60°C. Заполняют пробирку агаризованной средой на одну треть стерилизуют при 121°C в течение 15 мин. Высевы проводят уколом петлей и инкубируют при 37°C в течение 24 ч.

Для считывания результатов тестирования следует помнить, что каждый из компонентов среды выполняет свои важные функции. Хлорид натрия поддерживает изотоничность раствора. Лактоза и сахароза – ферментируемые углеводы для дифференциации представителей *Enterobacteriaceae*. Тиосульфат натрия используют для идентификации

сульфатредуцирующих микроорганизмов с выделением сероводорода в ходе ферментации. Феноловый красный – индикатор изменения pH (при подкислении, изменяющий цвет с красного на зелёный). Подкисление среды наблюдают при утилизации сахаров с выделением кислых продуктов метаболизма. Таким образом, щелочной (красный) скоп и кислый (желтый) столбик указывают, что микроорганизм ферментирует глюкозу, но не использует лактозу и/или сахарозу. Бактерии, ферментирующие помимо глюкозы лактозу и/или сахарозу, образуют большое количество кислот, которое может быть нейтрализовано аминами, поэтому скоп и столбик будут желтыми (кислыми).

Образование газа (CO_2) определяют по появлению трещин или пузырей в столбике среды. Тиосульфат восстанавливается до сероводорода, который взаимодействует с ионами солей трехвалентного железа, с появлением нерастворимого черного осадка сульфида трехвалентного железа. Эта реакция может протекать только в кислой среде, поэтому почернение обычно бывает в зоне столбика.

ТЕМА 3. ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОДУЦИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМАМИ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДОВ

Бактерии культивируют на жидкой питательной среде до стационарной фазы роста, осаждают клетки центрифугированием (4400 об/мин, 40 мин). Культуральную жидкость концентрируют (~ в 10 раз) на вакуумном роторном испарителе. ЭПС выделяют из концентрата культуральной жидкости осаждением двумя объемами охлажденного 95% этанола (4°C, 16 ч). Осадок ЭПС, полученный центрифугированием, дважды промывают 95% этанолом, перерастворяют в деионизованной воде и диализуют (48 ч) против дистиллированной воды через мембрану с пределом исключения 14 кДа («Orange Scientific», Бельгия).

3.1 Определение количества продуцируемых микроорганизмами полисахаридов

Концентрацию углеводов в ЭПС определяют колориметрическим методом с фенолом и серной кислотой с использованием глюкозы в качестве стандарта. Этот метод адаптирован для проведения в микропланшете с объемом ячеек 300 мкл.

Измерение проводят в 3-5 повторностях. В лунки планшета помещают по 40 мкл исследуемого раствора с концентрацией углеводов 10-200 мкг/мл. В контрольную лунку – 40 мкл дистиллированной воды. Многоканальной пипеткой добавляют в каждую лунку по 40 мкл 5% раствора фенола, а затем по 200 мкл концентрированной серной кислоты. Осторожно перемешивают смесь растворов в лунках пипетированием. Через 15 мин измеряют оптическую плотность на микропланшетном ридере при $\lambda=492$ нм.

Для построения калибровочного графика используют раствор глюкозы с концентрацией 200 мкг/мл. При помощи серии двукратных разведений в микропланшете получают растворы с концентрациями 200, 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг/мл: в первую лунку вносят 80 мкл раствора глюкозы, в лунки 2-6 – по 40 мкл дистиллированной воды. Из первой лунки отбирают 40 мкл раствора и переносят во вторую лунку, тщательно перемешивают пипетированием и так далее до последней лунки, из которой оставшиеся 40 мкл сливают в сброс. Проводят со стандартными растворами реакцию с фенолом и серной кислотой (см. выше). Сканируют оптическую плотность продуктов реакции на планшетном ридере, результаты заносят в таблицу MS Excel и строят график зависимости оптической плотности реакционной среды от концентрации глюкозы, находят уравнение кривой для расчета опытных значений.

3.2 Методы оптимизации условий роста микроорганизмов по продукции экзополисахаридов

Для оптимизации варьируют ряд факторов, среди них – продолжительность ферментации до 96 ч для галофильных бактерий и до 7 сут для архей; температура ферментации (10, 25, 30, 35, 40 и 55°C); уровень начального значения рН среды (5,0, 7,0, 8,0 и 10,0); различные источники углерода: глюкоза, фруктоза, манноза, лактоза, сахароза и

глюкоза с сахарозой в конечных концентрациях (10 г/л); влияние концентрации NaCl (0, 5, 10, 15 и 25% мас./об.). Культивирование во всех вариантах проводят на базовой среде S-G (см. раздел 1.2).

Динамику накопления биомассы бактерий определяют путем измерения оптической плотности OD клеточной суспензии при $\lambda=540$ нм на спектрофотометре.

Продукцию экзополисахаридов в этих условиях контролируют по следующей схеме:

- 1) клетки от культуральной среды отделяют центрифугированием (4400 об./мин 20 мин);
- 2) к супернатанту добавляют три объема охлажденного 95% этанола и оставляют 16 ч при 4°C. Образовавшийся осадок осаждают центрифугированием (12000 об./мин 20 мин), дважды промывают спиртом, каждый раз осаждая центрифугированием (12000 об./мин 20 мин);
- 3) осадок подсушивают на воздухе, взвешивают и растворяют в минимальном количестве воды. Концентрацию полисахарида определяют колориметрическим методом в реакции с фенолом и серной кислотой с использованием глюкозы в качестве стандарта (см. раздел 3.1).

3.3 Определение содержания белков в препаратах полисахаридов

Измерения проводят в 3-5 повторностях. В лунку планшета помещают 100 мкл исследуемого раствора с концентрацией белков 10-200 мкг/мл. Добавляют 100 мкл раствора Кумасси G-250 в 3% HClO₄. Через 30 мин измеряют OD на микропланшетном ридере при $\lambda=620$ нм. В качестве стандарта используют реакционную смесь с добавлением дистиллированной воды, вместо раствора белка.

Для построения калибровочной кривой используют раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) с концентрацией 200 мкг/мл. При помощи серии двукратных разведений в микропланшете получают

растворы с концентрациями 200, 100, 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг/мл: в первую лунку вносят 200 мкл раствора БСА, в лунки 2-6 вносят 100 мкл дистиллированной воды. Из первой лунки отбирают 100 мкл раствора и переносят во вторую лунку, тщательно перемешивают пипетированием и так далее до последней лунки – шестой, оставшиеся 100 мкл сливают в сброс. В качестве контроля используют дистиллированную воду. Отнимают от полученных значений оптической плотности фоновые величины, строят в MS Excel график зависимости оптической плотности от концентрации белка, находят уравнение кривой для расчета опытных значений.

САРАТОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО

ТЕМА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ГАЛОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ И ИХ ПОЛИСАХАРИДОВ

4.1. Анализ деструктивной активности микроорганизмов по отношению к фракциям нефти

Тестирование деструктивной активности микроорганизмов по отношению к нефти возможно чашечным методом и в жидкой культуре в среде Бушнелла-Хааса. *Все исследования деструктивной активности выполняют в присутствии в среде NaCl в концентрациях, оптимальных для каждого изолята.*

Состав среды Бушнелла – Хааса: г/л:

CuSO_4 – 0,2; CaCl_2 – 0,2; KH_2PO_4 – 1,0; K_2HPO_4 – 1,0; NH_4NO_3 – 1,0; FeCl_3 – 0,05. Конечное значение pH 7,0. Стерилизуют среду в автоклаве при 121°C 30 мин.

При чашечном методе тестирования готовят чашки с плотной средой Бушнелла-Хааса, на поверхность среды наносят по 2 капли (по 5 мкл) культуры микроорганизмов, подсушивают чашки в термостате и поверх культуры добавляют по 5 мкл сырой нефти. Помещают чашки в термостат при оптимальных температурах для каждой культуры на 4-7 сут (в

зависимости от скорости роста). Тестируют культуры по появлению роста микроорганизмов в/на капле нефти.

При исследовании активности в жидкой среде Бушнела-Хааса культивирование проводят в колбах Эрленмейера объемом 250 мл со 100 мл среды, содержащей 1% нефти в качестве единственного источника углерода. Посев в среду осуществляют, используя накопительную микробную культуру до конечной оптической плотности (OD) 0,5 при $\lambda=440$. В качестве контроля используют колбу с неинокулированной средой, содержащей 1 % нефти.

Деструктивную активность штаммов определяют по убыли нефти в среде после культивирования. Фракционный анализ нефти до и по результатам культивирования бактерий проводят гравиметрическим методом после жидкостной колоночной хроматографии с экстракцией различных классов углеводов селективными растворителями [8].

Для этого остаточные количества сырой нефти из инокулированных и не инокулированных колб экстрагируют 20 мл хлороформа (из 100 мл среды). Из каждого экстракта хлороформ упаривают с помощью роторного испарителя и разбавляют гексаном.

Далее материал фракционируют на колонке (1,8×48 см) с Al_2O_3 , активированным 3% H_2O .

Парафины, нафтены, моно- и бициклические ароматические углеводороды, полициклические ароматические углеводороды и спиртобензольные смолы элюируют последовательно следующими растворителями: 1)100 мл н-гексана; 2)100 мл 15% бензола в гексане; 3)100 мл бензола и 80 мл этанол:бензол (об.:об., 1:1). Каждую фракцию собирают отдельно, растворители упаривают при пониженном давлении на роторном испарителе, а вес фракций определяют гравиметрически. Вычисляют убыль каждой фракции в процентах по сравнению с неинокулированным бактериями контролем, вес которого принимают за 100%.

4.2 Методы исследования толерантности микроорганизмов к тяжелым металлам

Для определения устойчивости микробных изолятов к присутствию тяжелых металлов клетки культивируют до логарифмической фазы роста в средах S-G или LB с добавлением солей оптимальной для культуры концентрации соли, а также добавлением металлов: $ZnSO_4 \times 7H_2O$; $Cd(CH_3COO)_2 \times 2H_2O$; $CuSO_4 \times 5H_2O$; $Pb(CH_3COO)_2 \times 3H_2O$; $NiCl_2 \times 6H_2O$ в концентрациях 0,0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 мМ.

Готовят сток-растворы солей в деионизированной воде до конечной концентрации 100 мМ. Растворы стерилизуют фильтрацией через бактериальный фильтр (\varnothing пор 0,22 мкм).

Из сток-растворов готовят разбавлением в трех повторностях для каждой концентрации солей тяжелых металлов пробирки с 10 мл среды, в которые засевают по 0,1 мл клеточной суспензии (10^8 клеток/мл). Пробирки инкубируют при 28°C при встряхивании на шейкере при 150 об./мин. Выращивание культур осуществляют 48-72 ч, что соответствует времени выхода на логарифмическую фазу роста. Для каждого экспериментального варианта регистрируют оптическую плотность бактериальных суспензий при $\lambda=540$ нм на спектрофотометре, а после осаждения бактериальных клеток центрифугированием в культуральной среде определяют содержание ЭПС (см. раздел 3.1.).

Устойчивость микроорганизмов к тяжелым металлам оценивают по минимальной ингибирующей концентрации (МИК) – минимальная концентрация токсиканта, при которой происходит полное угнетение роста бактерий.

4.3 Определение кинематической вязкости водных растворов полисахаридов

Исследование реологических свойств растворов полисахаридов чрезвычайно важно для выявления перспектив их практического использования. Для определения кинематической вязкости водных растворов полисахаридов используют стеклянный вискозиметр проточный жидкостной (ВПЖ-2). Вискозиметр ВПЖ-2 представляет собой U-образную трубку, в колено которой впаян капилляр (1 на рисунке 18). Измерение вязкости основано на определении времени истечения через капилляр определенного объема из измерительного резервуара.

Для определения кинематической вязкости исследуемого раствора подбирают вискозиметр с таким расчётом, чтобы время истечения через его капилляр было не менее 200 с. Перед началом анализа вискозиметр тщательно промывают бензином, затем петролейным эфиром и дистиллированной водой и высушивают в сушильном шкафу. При сильном загрязнении вискозиметр промывают хромовой смесью (60 г $K_2Cr_2O_7$ на 1 л $H_2SO_{4\text{конц}}$). Для ускорения процесса высушивания вискозиметр промывают спиртом или ацетоном.

Измерение вязкости проводят в термостате при постоянной температуре. Исследуемый раствор (1% раствор полисахарида) наливают в стеклянный стаканчик и, перевернув вискозиметр коленом вверх, опускают в него конец колена вискозиметра с капилляром. Отверстие другого конца вискозиметра зажимают пальцем и через резиновую трубку, надетую на отводную стеклянную трубку (2 на рисунке 18), резиновой грушей засасывают исследуемый раствор в вискозиметр до метки М2, следя за тем, чтобы в жидкости не образовалось пузырьков воздуха. После заполнения обоих расширений вискозиметра следует вынуть его из стакана и быстро перевернуть в первоначальное положение. С внешней стороны

конца колена снимают избыток испытуемого продукта и надевают на него резиновую трубку.

Вискозиметр устанавливают в термостат и выдерживают не менее 15 мин, засасывают жидкость в колено примерно до одной трети резервуара (3 рисунок 18). Затем сообщают колено вискозиметра с атмосферой и определяют время опускания мениска жидкости от отметки M_1 до отметки M_2 (рисунок 18).

Вязкость измеряют по формуле $V = T \times K \times g / 9,807$, где

K – постоянная вискозиметра, $\text{мм}^2/\text{с}^2$ (указана в паспорте вискозиметра); T – время истечения жидкости, с; V – кинематическая вязкости жидкости, $\text{мм}^2/\text{с}$; g – ускорение свободного падения в месте измерения, $\text{м}/\text{с}^2$.

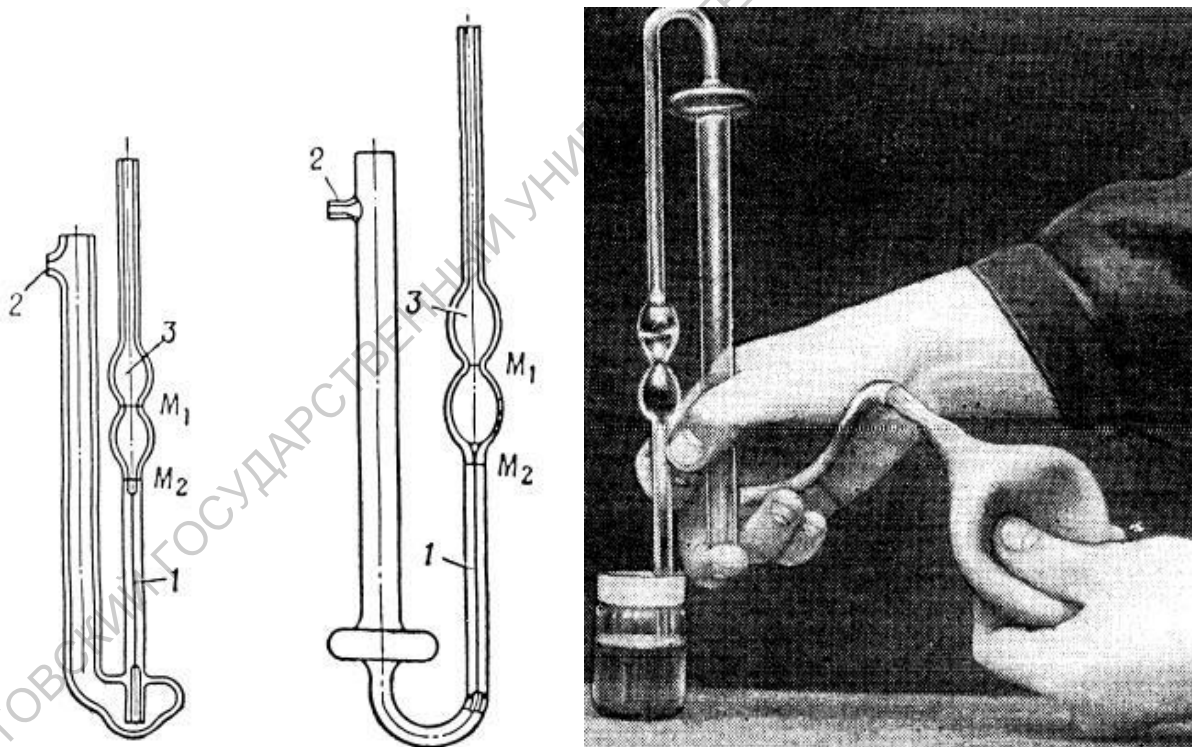


Рисунок 18 – Внешний вид вискозиметра стеклянного типа ВПЖ-2: 1 – капилляр; 2 – отводная стеклянная трубка; 3 – резервуар; M_1 , M_2 – кольцевые метки.

4.4 Анализ эмульгирующей активности экзополисахаридов микроорганизмов по отношению к гидрофобным соединениям

Эмульгирующую активность ЭПС в отношении гидрофобных соединений определяют с использованием метода [9] с некоторыми модификациями.

Эксперимент проводят в стеклянных пробирках с диаметром 10 мм. Для анализа к 3 мл гидрофобного соединения (подсолнечное масло, *n*-гексадекан и *o*-ксилол 3 мл) добавляют по 2 мл 1% водного раствора ЭПС и активно встряхивают в течение 3 минут на вортексе. Оставляют пробирки в штативе при комнатной температуре. Через 24 и 48 ч вычисляют индекс эмульгирования (E24 и E48, %) по формуле

$$E = h_e / h_T \times 100, \text{ где}$$

h_e – высота слоя эмульсии (мм), h_T – общая высота смеси (мм). Эксперименты выполняют в пяти повторностях при 25°C.

Затем эмульсии оставляют на продолжительный срок, еженедельно оценивая их стойкость.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sehgal S.N., Gibbons N.E. Effect of some metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum* // Can. J. Microbiol. 1960. Vol. 6(2). P. 165–169.
2. Manual of methods for general bacteriology. Eds P. Gerhardt, R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, G.B. Phillips. American Society for Microbiology. 1981. p. 524.
3. Hezayen F.F., Tindall B.J., Steinbüchel A., Rehm B.H. Characterization of a novel halophilic archaeon, *Halobiforma haloterrestris* gen. nov., sp. nov., and transfer of *Natronobacterium nitratireducens* to *Halobiforma nitratireducens* comb. nov. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2002. Vol. 52(6). P. 2271–2280.
4. Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study // J. Bacteriol. 1991. Vol. 173(2). P. 697–703.
5. Шелудько А.В., Борисов И.В., Крестиненко В.А., Панасенко В.И., Кацы Е.И. Влияние конго красного на подвижность бактерий *Azospirillum brasilense* // Микробиология. 2006. Т. 75. № 1. С. 62–69.
6. Dussault H.P. An improved technique for staining red halophilic bacteria // J. Bacteriol. 1955. Vol. 70(4). P. 484–485.
7. Gerhardt Ph., Wood W.A. Methods for general and molecular bacteriology. American society for microbiology. 1994. Washington, DC. P. 607–654.
8. Уланова Т.С., Макарова Ю.М. Методы определения содержания нефтепродуктов в водной среде // Научные исследования и инновации. 2010. Т. 4, №4. С. 120–127.
9. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species // Appl. Environ. Microbiol. 1987. Vol. 53(1). P. 224–229.

СОДЕРЖАНИЕ

Тема 1. Особенности работы с микроорганизмами из гиперсоленых сред		3
1.1	Отбор образцов микроорганизмов из природной среды	4
1.2	Питательная среда для выделения галофилов	6
1.3	Приготовление накопительной культуры	7
Тема 2. Исследование культурально-морфологических свойств изолятов галофильных микроорганизмов		11
2.1	Таксономические исследования отобранных изолятов микроорганизмов	14
2.1.1	Исследование микроорганизмов световой микроскопией	15
2.2	Дифференциация бактерий по способности к окраске по Граму	15
2.2.1	Процедура окрашивания по Граму галофильных микроорганизмов	15
2.2.2	Дифференциация бактерий тестом с КОН	16
2.3	Окрашивание спор изолятов	17
2.4	Определение уровня термостойкости бактерий	18
2.5	Характеристика устойчивости к NaCl в среде выращивания	18
2.6	Изучение антибиотикорезистентности микроорганизмов	19
2.7	Выявление у изолятов оксидазной активности	21
2.8	Анализ наличия каталазной активности	22
2.9	Анализ активности изолятов в отношении различных субстратов	22
2.9.1	Изучение нитратредуцирующих свойств изолятов	24
2.9.2	Исследование способности у изолятов утилизировать лимонную кислоту с использованием Simmons цитратного агара (SCA)	25
2.9.3	Исследование способности изолятов к гидролизу крахмала	25
2.9.4	Изучение способности изолята гидролизовать желатину	26
2.9.5	Выявление у изолятов казеиназной и эстеразной активностей	26
2.9.6	Исследование способности к ферментации углеводов	27
2.9.7	Тестирование продукции индола в среде	28
2.9.8	Тест-среда Фогеса-Проскауэра (VP)	28
2.9.9	Уреазный тест	29
2.9.10	Выращивание на трехсахарном железосодержащем агаре	29
Тема 3. Характеристика продуцируемых микроорганизмами экзополисахаридов		31
3.1	Определение количества продуцируемых микроорганизмами ЭПС	31
3.2	Методы оптимизации условий роста микроорганизмов по продукции экзополисахаридов	32
3.3	Определение содержания белков в препаратах полисахаридов	33
Тема 4. Исследование биотехнологического потенциала галофильных бактерий и их полисахаридов		35
4.1	Анализ деструктивной активности микроорганизмов по отношению к фракциям нефти	35
4.2	Исследование устойчивости микроорганизмов к присутствию тяжелых металлов	37
4.3	Определение кинематической вязкости водных растворов полисахаридов	38
4.4	Анализ эмульгирующей активности ЭПС микроорганизмов по отношению к гидрофобным соединениям	40
Список используемых источников		41
Содержание		42