

Учащ. А. Э. Дубинец (ГУО «Чашникская гимназия»)  
Науч.рук. И. А. Русских, заведующий лабораторией  
(УО «Республиканский центр экологии и краеведения»)

## СОЗДАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БАКТЕРИЙ *АСЕТОВАСТЕР* *XYLINUM* И ОЦЕНКА ИХ СПОСОБНОСТИ ПРОДУЦИРОВАТЬ ЦЕЛЛЮЛОЗУ

*Acetobacter xylinum* – это грамотрицательная почвенная бактерия, которая синтезирует и выделяет целлюлозу в процессе метаболизма глюкозы и других источников энергии. Целлюлоза - это самый распространенный природный полимер на Земле и основная составляющая клеточной стенки растений. Целлюлоза, продуцируемая *A. xylinum*, структурно и химически идентична целлюлозе высших растений, но не загрязнена лигнинами или другими производными целлюлозы. По этой причине *A. xylinum* служит потенциальным модельным организмом для изучения биосинтеза целлюлозы, а также источником для промышленного получения целлюлозы. При этом бактериальная или микробная целлюлоза имеет свойства, отличные от растительной целлюлозы, и характеризуется высокой чистотой, прочностью и повышенной способностью удерживать воду. Контролируя методы синтеза, полученная микробная целлюлоза может быть адаптирована для получения определенных желаемых свойств. Например, из-за уникальных механических свойств целлюлозы, образуемой *A. xylinum*, нашла широкое применение в биотехнологии, микробиологии, медицине. Пищевой промышленности и материаловедении. Именно по причине роста интереса к микробной целлюлозе во всем мире, мы решили заняться исследованием *A. xylinum*. Кроме того, мой интерес к бактериальной целлюлозе продиктован идеями сохранения и рационального использования природных ресурсов, а именно лесов. Ведь в настоящее время именно деревья являются основным источником целлюлозы для промышленности. Но есть и еще одна причина, по которой я заинтересовалась этим микроорганизмом. Он является основой такого симбиотического организма как *Medusomyces gisevii* или чайный гриб. И в моей семье, и в семьях моих друзей выращивают *Medusomyces gisevii* для получения, как считается, полезного и вкусного напитка. Как и у других организмов, будь то животные или растения, в мире микробов существует огромное внутривидовое разнообразие по ряду признаков, и, вероятно, в том числе по способности к образованию целлюлозы у *A. xylinum*. Мы предположили, что, как и любое другое биологическое свойство, контролируемое генетически,

количество целлюлозы может изменяться от штамма к штамму. И отбор штаммов с высоким уровнем продукции целлюлозы при одинаковых условиях культивирования, позволит повысить эффективность производства бактериальной целлюлозы без увеличения ее стоимости, а, напротив, будет способствовать удешевлению полученного продукта. Исходя из этого, целью данной работы было отбор штаммов *A. xylinum*, способных к синтезу целлюлозы, для создания коллекции, и выделение наиболее активных штаммов.

Для выполнения работы мы использовали ряд стандартных микробиологических методов, таких как посев, шпателем, петлей, шпилькой на плотные и жидкие питательные среды. Источниками для выделения *A. xylinum* служили пробы чайного гриба и домашнего уксуса, предоставленные семьями моих друзей, учителями нашей школы, а также моей семьей. Для выделения *A. xylinum* мы использовали рекомендуемую среду для *A. xylinum*, по составу схожую со средой MRS. Для визуализации выделения кислоты в указанную среду мы добавляли мел в количестве 5 г на 1 л среды. Поскольку предлагаемая среда для культивирования *A. xylinum* является довольно дорогостоящей, мы решили подобрать другую, более доступную среду. Для этого мы испытывали ряд богатых питательными веществами сред, таких как молочно-дрожжевой агар, вишневый агар, картофельно-глюкозный агар и капустный агар. Оказалось, что капустный агар является наиболее оптимальным для поддержания роста *A. xylinum*. При этом если в качестве исходного сырья для приготовления капустного агара использовать краснокочанную капусту, то выделение кислоты бактериями визуализируется в виде изменения окраски среды с грязновато-синей на ярко-розовую. Чем больше кислоты выделяется, тем более интенсивной и яркой становится окраска. Первичный посев образцов чайного гриба на среду с мелом и последующее культивирование чашек Петри в термостате при 28 °С показал, что чайный гриб содержит в своем составе множество разнообразных микроорганизмов. Микроскопирование на световом микроскопе Микромед показал, что все образцы чайного гриба характеризовались высоким содержанием дрожжей. Напротив, уксус из калины с частичками *Medusomyces gisevii* практически не содержал дрожжей, а его основу составляли *A. xylinum*. Возможно, это связано с низким содержанием сахаров в соке калины, его повышенной кислотностью и добавлением в сок калины небольшого количества этилового спирта согласно рецептуре приготовления уксуса из калины. Для эффективного отбора штаммов уксусных бактерий, продуцирующих целлюлозу, мы отбирали специфические колонии, представляющие из себя небольшие образования с

сухой поверхностью и слегка кожистой структурой. Такая необычная морфология колоний связана со способностью *A. xylinum* формировать целлюлозу также и на плотных питательных средах. Каждая колония высевалась отдельно на среду с мелом и культивировалась для последующего контроля чистоты изолята и его принадлежности к целлюлозу-синтезирующим уксусным бактериям путем, как оценки образования кислоты, так и микроскопически. При обнаружении неоднородности изолята он рассеивался методом истощающего штриха для получения изолированных колоний.

В результате нам удалось создать коллекцию из 48 штаммов бактерий, предположительно относящихся к *A. xylinum*. Дальнейшая наша работа заключалась в сравнительной оценке способности коллекционных штаммов продуцировать целлюлозу. Для этого мы использовали показатель накопления сухой массы в слоевище, образуемом при выращивании *A. xylinum* в жидкой питательной капустной среде. Основываясь на характеристиках полученных слоевищ можно сделать выводы, что собранная коллекция различается по характеру и динамике нарастания слоевищ, содержащего целлюлозу. Количественная оценка сухой массы слоевища позволила нам охарактеризовать 16 штаммов *A. xylinum* по накоплению сухой массы слоевища. В результате мы определили, что наибольшую массу накапливает штамм Ац5. Другие штаммы *A. xylinum* по накоплению сухой массы статистически не различаются. Но, как я уже отметила, они все различаются по характеру нарастания слоевища и штамм Ац 5 является наиболее предпочтительным, так как у него не только наблюдается максимальное накопление массы слоевища, но также оно характеризуется высокой плотностью и не оседает на дно.

Таким образом, штаммы рабочей коллекции различаются по динамике и характеру нарастания слоевища, содержащего целлюлозу, что свидетельствует о наличии генетического разнообразия в собранной коллекции и предпосылках к отбору наиболее эффективного штамма.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Kroon-Batenburg, L.M.J., Kroon, J., 1997. The crystal and molecular structures of cellulose I and II. *Glycoconjugate J.* 14, 677–690.