

УДК 579.66
МРНТИ 62.09.39

DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108704>

Получена: 18.01.2024.

Одобрена: 01.03.2024.

Опубликована: 31.03.2024.

Оригинальное исследование

Приемы консервации перспективных в нефтяной промышленности бактерий для сохранения биологических свойств

Г.К. Кайырманова, А.Е. Асылбек, А.Р. Исламова, А.К. Ерназарова,

А.У. Абитбекова, У.Т. Шаймерденова

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Сохранение ценных штаммов бактерий имеет решающее значение для различного научного, промышленного и экологического применения. Нефтеэмульгирующие и нефтewытесняющие свойства микроорганизмов являются потенциально значимыми для биотехнологий, применяющихся в нефтяной отрасли, в частности, в таких направлениях, как биоремедиация, третичное повышение нефтеотдачи. Для снабжения предприятий чистыми культурами микроорганизмов необходимо постоянно поддерживать их в условиях коллекции в активном состоянии, отслеживая сохранность биотехнологических свойств, в связи с чем поддержание штаммов микроорганизмов в рабочем состоянии и сохранение их ценных свойств являются важными условиями практически любой работы с микроорганизмами от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов.

Цель. Статья посвящена изучению приема консервации перспективных в нефтяной промышленности бактерий – модификации метода микрокапсулирования клеток микроорганизмов в альгинатный гель с добавлением глицерина, где глицерин использован в качестве вещества с биостатическим действием.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования использованы 8 углеводородокисляющих культур микроорганизмов из коллекции кафедры биотехнологии Казахского Национального Университета им. аль-Фараби: 4 спороносные и 4 неспороносные культуры бактерий. В работе использованы микробиологические методы культивирования и хранения микроорганизмов (в твердых, жидких средах в аэробных условиях), физико-химический метод Купера (определение индекса нефтеэмульгирования), статистические методы.

Результаты. Установлено, что добавление в качестве биостатика глицерина (15% об.) в гелеобразующую матрицу альгината натрия обеспечивает для исследованных бактерий долгосрочную (в течение 6 мес.) жизнеспособность клеток в пределах 88–96% с сохранением функциональности иммобилизованных клеток. Значения индекса нефтеэмульгирования бактерий сохранились на уровне значений до консервации, тогда как при классических методах хранения в течение 6 мес. количество жизнеспособных клеток ниже. Следует отметить, что после шестимесячного хранения в капсулированном виде с глицерином жизнеспособность неспороносных культур – псевдомонад – ниже (88–91%), чем спорообразующих бацилл (95–98%), и такая корреляция наблюдается и для классических методов.

Заключение. Предложенный модифицированный метод консервации на основе микрокапсулирования клеток в альгинатный гель с добавлением глицерина позволил обеспечить долгосрочное хранение бактерий, поддерживая их функциональность и жизнеспособность.

Ключевые слова: микроорганизмы, консервация, микрокапсулирование, субкультивирование, биосурфактанты, биостатик.

Как цитировать:

Кайырманова Г.К., Асылбек А.Е., Исламова А.Р., Ерназарова А.К., Абитбекова А.У., Шаймерденова У.Т. Приемы консервации перспективных в нефтяной промышленности бактерий для сохранения биологических свойств // *Вестник нефтегазовой отрасли Казахстана*. 2024. Том 6, №1. С. 110–119. DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108704>.

UDC 579.66
CSCSTI 62.09.39

DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108704>

Received: 18.01.2024.

Accepted: 01.03.2024.

Published: 31.03.2024.

Original article

Conservation techniques for promising bacteria in the oil industry to preserve biological properties

Gulzhan K. Kaiyrmanova, Alisher Ye. Asylbek, Aida R. Islamova, Aliya K. Yernazarova, Aelina U. Abitbekova, Ulzhan T. Shaimerdenova
Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

ABSTRACT

Background: The conservation of valuable bacterial strains is crucial for various scientific, industrial, and environmental applications. Microorganisms with oil-emulsifying and oil-displacing properties are potentially significant for biotechnologies applied in the oil industry, particularly in such areas as bioremediation and tertiary enhanced oil recovery. To supply enterprises with pure cultures of microorganisms, they should be constantly maintained in the collection conditions in an active state while monitoring the preservation of their biotechnological properties. Therefore, keeping microorganism strains in working conditions and preserving their valuable properties are important for almost any work with microorganisms, ranging from primary research to their use in the production of various biopreparations.

Aim: The article focuses on studying a method for preserving bacteria that are useful in the oil industry. This method involves modifying the technique of microencapsulating microorganism cells in alginate gel by adding glycerin, which is used as an agent with biostatic action.

Materials and methods: The subject of research are eight hydrocarbon-oxidizing cultures of microorganisms that were sourced from the Department of Biotechnology of the Al-Farabi Kazakh National University. Of these, four cultures were spore-bearing, while the other four were non-spore-bearing. The research employed microbiological methods of cultivation and storage of microorganisms in both solid and liquid media under aerobic conditions. In addition, Cooper's method was used to determine oil emulsification index and statistical methods for data analysis.

Results: It has been found that adding glycerin (15% vol.) as a biostatic to the gel-forming matrix of sodium alginate can ensure long-term (up to 6 months) cell viability for the studied bacteria in the range of 88-96% while maintaining functionality of immobilized cells. The values of the bacteria's oil emulsification remained at the pre-conservation levels, whereas traditional storage methods result in a lower number of viable cells after six months. It should be noted that after six months of being stored in encapsulated form with glycerin, the viability of non-spore-forming *Pseudomonas* cultures is lower (88-91%) than spore-forming *Bacillus* (95-98%). This correlation is also observed for traditional methods.

Conclusion: The modern method of preserving bacteria allows for their long-term storage while maintaining functionality and viability.

Keywords: *microorganisms; conservation; microencapsulation; subcultivation; biosurfactants; biostatics.*

To cite this article:

Kaiyrmanova GK, Asylbek AY, Islamova AR, Yernazarova AK, Abitbekova AU, Shaimerdenova UT. Conservation techniques for promising bacteria in the oil industry to preserve biological properties. *Kazakhstan journal for oil & gas industry*. 2024;6(1):110–119. DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108704>.

ӨОЖ 579.66
FTAХР 62.09.39

DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108704>

Қабылданды: 18.01.2024.

Мақұлданды: 01.03.2024.

Жарияланды: 31.03.2024.

Түпнұсқа зерттеу

Биологиялық қасиеттерін сақтау үшін мұнай өнеркәсібінде перспективалы бактерияларды сақтау әдістері

Г.Қ. Қайырманова, Ә.Е. Асылбек, А.Р. Исламова, Ә.Қ. Ерназарова,
А.Ұ. Әбітбекова, Ұ.Т. Шәймерденова

әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университеті, Алматы қаласы, Қазақстан

АННОТАЦИЯ

Негіздеу. Бактериялардың құнды штамдарын сақтау әртүрлі ғылыми, өндірістік және экологиялық қолданбалар үшін өте маңызды. Микроорганизмдердің мұнайды эмульсиялау және ығыстыру қасиеттері мұнай саласында, атап айтқанда, биоремедиация, мұнай шығаруды жоғарылатудың үшіншілік әдісі сияқты бағыттарда қолданылатын биотехнологиялар үшін әлеуетті маңызды болып табылады. Кәсіпорындарды микроорганизмдердің таза дақылдарымен қамтамасыз ету үшін биотехнологиялық қасиеттердің сақталуын қадағалай отырып, оларды коллекция жағдайында үнемі белсенді күйде ұстау қажет. Осыған байланысты, микроорганизмдердің штамдарын жұмыс күйінде ұстау, олардың құнды қасиеттерін сақтау бастапқы зерттеуден бастап оларды әртүрлі биологиялық өнімдер өндірісінде қолдануға дейін микроорганизмдермен кез-келген жұмыстың маңызды шарттары болып табылады.

Мақсаты. Мақала мұнай өнеркәсібіндегі перспективалы бактериялардың сақталуын қабылдауды зерттеуге арналған - глицерин қосылған альгинатты гельге микроорганизмдердің жасушаларын микрокапсуляциялау әдісін модификациялау, мұнда глицерин биостатикалық әсер ететін зат ретінде қолданылады.

Материалдар мен әдістер. Зерттеу нысандары ретінде әл-Фараби атындағы Қазақ Ұлттық Университетінің Биотехнология кафедрасының коллекциясынан микроорганизмдердің 8 коллекциялық көмірсутекті тотықтырғыш дақылдары пайдаланылды: бактериялардың 4 спора түзетін және 4 спора түзбейтін дақылдары. Жұмыста микроорганизмдерді өсіру мен сақтаудың микробиологиялық әдістері (аэробты жағдайда қатты, сұйық ортада); физика-химиялық әдіс – Купер әдісі (мұнайды эмульсиялау индексін анықтау), статистикалық әдістер қолданылды.

Нәтижелері. Глицерин биостатигі ретінде қосу (15% к-лем.) натрий альгинатының гель түзетін матрицасында зерттелген бактериялар үшін ұзақ мерзімді (6 ай ішінде.) иммобилизацияланған жасушалардың функционалдығын сақтай отырып, 88-96% шегінде жасушалардың өміршеңдігі. Мұнай индексінің мәндері бактериялардың эмульсиясы консервацияға дейінгі мәндер деңгейінде сақталды, ал классикалық сақтау әдістерінде 6 ай бойы өміршең жасушалар саны аз. Айта кету керек, глицеринмен капсулаланған алты айлық сақтаудан кейін спора түзетін бациллаларға (95-98%) қарағанда споралы емес дақылдардың – псевдомонасттардың өміршеңдігі төмен (88-91%) және бұл корреляция классикалық әдістер үшін де байқалады.

Қорытынды. Глицерин қосылған альгинатты гельге жасушаларды микрокапсуляциялау негізінде ұсынылған өзгертілген консервілеу әдісі бактериялардың функционалдығы мен өміршеңдігін сақтай отырып, олардың ұзақ мерзімді сақталуын қамтамасыз етті.

Негізгі сөздер: микроорганизмдер, сақтау, микрокапсуляция, субкультивация, биосурфактанттар, биостатик.

Дәйексөз келтіру үшін:

Қайырманова Г.Қ., Асылбек Ә.Е., Исламова А.Р., Ерназарова Ә.Қ., Әбітбекова А.Ұ., Шаймерденова Ұ.Т. Биологиялық қасиеттерін сақтау үшін мұнай өнеркәсібінде перспективалы бактерияларды сақтау әдістері // *Қазақстанның мұнай-газ саласының хабаршысы*. 2024. 6 том, №1, 110–119 б. DOI: <https://doi.org/10.54859/kjogi108704>.

Введение

Сохранение ценных штаммов бактерий имеет решающее значение для различных научных, промышленных и экологических применений. Нефтеэмульгирующие и нефтевытесняющие свойства микроорганизмов являются потенциально значимыми для биотехнологий, применяющихся в нефтяной отрасли, в частности, в таких направлениях, как биоремедиация, третичное повышение нефтеотдачи, производство биодизеля [1–3]. Эти свойства основаны на способности микроорганизмов продуцировать различные биосурфактанты, которые способствуют диспергированию и вытеснению нефти. В частности, нефтеэмульгирующая способность микроорганизмов основывается на выделении высокомолекулярных биосурфактантов, которые образуют мельчайшие нефтеэмульсии, что повышает эффективность контакта бактерий с нефтью [4–5].

Биосурфактанты, образуемые микроорганизмами, по эффективности к эмульгированию не уступают синтетическим сурфактантам. Однако в отличие от синтетических сурфактантов, они обладают такими преимуществами, как биodeградеability и отсутствие токсичности, а также получение из возобновляемых источников, что делает их перспективными для разработки новых экологически безопасных технологий [6].

Для различного использования перспективных штаммов микроорганизмов необходимо постоянно поддерживать их в условиях коллекции в активном состоянии, отслеживая сохранность ценных свойств, в связи с чем поддержание штаммов микроорганизмов в рабочем состоянии, сохранение их ценных свойств являются важными условиями любой работы с микроорганизмами – от первичного изучения до использования их в производстве различных биопрепаратов.

Традиционно используемые методы хранения, такие как субкультивирование, хранение под минеральным маслом имеют ограничения с точки зрения стабильности промышленно важных свойств и жизнеспособности клеток микроорганизмов [7–8].

Современные методы хранения бактерий, такие как микрокапсулирование в гели, криоконсервация и лиофилизация, эффективны, однако часто возникают проблемы из-за чувствительности бактерий к колебаниям температуры, воздействию кислорода и стрессу обезвоживания. Эти ограничения могут привести к снижению жизнеспособности, изменению метаболической активности и потере специфических свойств, которые делают бактерии ценными [8–10].

Иммобилизация микроорганизмов в натуральный альгинатный полимер имеет ряд

преимуществ при микрокапсуляции: биосовместимость, нетоксичность и способность образовывать стабильные гелевые структуры. Несмотря на перечисленные преимущества, крайне важно учитывать потенциальные недостатки, которые могут ограничить его применимость в определенных случаях, таких как возможность механического повреждения и ограниченная диффузия питательных веществ, чувствительность конкретного штамма [10–12]. В связи с этим разработка более надежных и универсальных методов хранения, обеспечивающих повышенную стабильность, жизнеспособность и адаптируемость к более широкому спектру бактериальных штаммов, актуальна.

Материалы и методы исследования

В работе использованы 8 углеводородокисляющих культур микроорганизмов из коллекции кафедры биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби, обладающие биотехнологическим потенциалом в нефтяной отрасли: 4 штамма – *Pseudomonas aeruginosa* (D4, T1, T2, T4), 2 штамма – *B.licheniformis* (A3, PW2) и по одному штамму *B.safensis ssp. safensis* A2, *B.paralicheniformis* R4.

Бактерии периодически пересеивались и активировались (раз в 2–3 мес.) на мясопептонном агаре (далее – МПА), затем переносились в мясопептонный бульон (далее – МПБ) и культивировались при 40°C в течение 24–48 ч.

В работе использованы питательные среды: МПА, МПБ, MSS (англ. Mineral Salt Solution) [13]. МПА и МПБ – основные среды для поддержания жизнедеятельности, хранения, активации, проверки чистоты и получения биомассы культур микроорганизмов; минеральная среда (MSS) – синтетическая питательная среда, где в качестве единственного источника углерода использовали глицерин для определения эмульгирующих свойств бактерий. Синтетический глицерин – многоатомный спирт, продукт переработки нефти при производстве биотоплива [14].

При определении нефтеэмульгирующих свойств микроорганизмов использовали сырую нефть месторождения Арыском со следующими свойствами: легкая – с плотностью до 854 кг/м³, малосернистая – до 0,46%, парафинистая – 9,7–27,2% [15].

В работе использованы традиционные микробиологические методы культивирования микроорганизмов, иммобилизация бактерий в альгинатный гель, метод Купера (определение индекса нефтеэмульгирования), метод Морикавы (определение нефтевытеснения).

Для определения индекса нефтеэмульгирования бактерий, использованы трёх-

суточные культуры, выращенные на жидкой минеральной среде MSS с добавлением 2% об. глицерина. Далее культуральную среду с бактериальными клетками смешивали с нефтью в соотношении 3 : 2 и интенсивно перемешивали на лабораторном встряхивателе при 1000 об/мин в течение 1 мин для получения стабильной эмульсии. После этого пробирки оставляли в вертикальном положении при комнатной температуре. Через 24 ч измеряют высоту стабильного слоя эмульсии, и рассчитывают индекс эмульгирования (E24), как отношение высоты слоя эмульсии к общей высоте жидкости (1):

$$E_{24}(\%) = (V_e/V_n) * 100 \quad (1)$$

где V_e – объем эмульсии, V_n – полный объем жидкости, включающий в себя объем водной фазы (суспензия клеток микроорганизмов) с добавлением объема углеводородной фазы – нефти – и объема образовавшейся эмульсии [16].

Способность бактерий к вытеснению нефти проводили по Морикава (oil spreading assay). В чашку Петри помещают 50 мл дистиллированной воды, поверхность которой покрывают слоем гидрофобного вещества (10 мл сырой нефти). Для обнаружения биосурфактантов наносят 10 мкл образца бактериальной суспензии в центр гидрофобного слоя. При наличии биосурфактантов нефть вытесняется, и образуется очищенная зона, диаметр которой коррелирует с активностью биосурфактантов, также называемой активностью вытеснения нефти [17].

Для оптимизации способов хранения микробных культур проведена модификация метода хранения бактерий – микрокапсулирование клеток в альгинатный гель с дополнением в качестве биостатика глицерина. Известно, что при хранении микроорганизмов в растворе глицерина их метаболическая активность значительно замедляется или прекращается [18, 19].

Для микрокапсулирования в 3% альгинатный гель использовали двухсуточные культуры бактерий. Альгинатные гранулы с включенными бактериальными клетками стабилизировались в 0,2 М (молярная концентрация) растворе хлорида кальция. Хранение проводилось при температуре +4°C. Определение жизнеспособности и ценных свойств микроорганизмов проводили через 6 мес. хранения в инкапсулированном виде; в качестве контроля использовали классические методы хранения – субкультивирование и инкапсуляция клеток в альгинатный гель без глицерина.

Для хранения использованы культуры бактерий, выращенные на МПБ с pH 7 при 40°C в стационарном режиме, в течение суток – псевдомонады (жизнеспособность 10^8 КОЕ/мл), двухсуточные (для перевода в покоящееся состояние) – бациллы (10^6 – 10^7 КОЕ/мл).

Результаты исследования и обсуждение

Главным критерием при поддержании штаммов микроорганизмов в рабочем состоянии является сохранение их ценных свойств, в связи с чем к ценным свойствам микроорганизмов относятся нефтеэмульгирующая (E_{24}) и нефтewытесняющая (O_s) активности микроорганизмов [8–10].

В табл. 1 представлены результаты изучения нефтеэмульгирующей и нефтewытесняющих свойств коллекционных микроорганизмов, культивируемых на средах MSS, где в качестве единственного источника углерода использовали глицерин до закладки на хранение. Известно, что культуры, имеющие индекс эмульгирования выше 50%, считаются перспективными продуцентами биосурфактантов для разработки биотехнологий, используемых в нефтяной промышленности [20]. Как видно, все 8 культур микроорганизмов являются активными биоэмульгаторами нефти: E_{24} выше 50%, максимальная способность к вытеснению нефти (O_s более 3 см).

Таблица 1. Изучение нефтеэмульсионных, нефтewытесняющих свойств микроорганизмов
Table 1. The study of oil-emulsion and oil-displacing properties of microorganisms

№	Микроорганизмы Microorganisms	Индекс эмульгирования (E24), % Emulsification index (E24), %	Вытеснения нефти (Os), см Oil displacement (Os), sm
1	<i>P.aeruginosa D4</i>	51±2,3	4,6±0,3
2	<i>P.aeruginosa T1</i>	73,1±3,2	5,3±0,3
3	<i>P.aeruginosa T4</i>	64±3,2	4,3±0,3
4	<i>P.aeruginosa T2</i>	54,2±2,5	4,4±0,3
5	<i>B.safensis subsp.safensis A2</i>	60,9±3,3	4,2±0,3
6	<i>B.licheniformis PW2</i>	51,6±3,3	3,7±0,2
7	<i>B.licheniformis A3</i>	68,5±1,8	4,2±0,3
8	<i>B.paralicheniformis R4</i>	62,1±2,9	4,5±0,2

Для максимального сохранения биотехнологических свойств микроорганизмов проведена модификация метода хранения бактерий в альгинатный гель с добавлением глицерина (15% об.), в качестве контроля использовали классические методы – субкультивирование и микрокапсулирование в альгинат натрия.

На рис. 1 представлены микрокапсулы, полученные иммобилизацией клеток бактерий в альгинатный гель с добавлением 15% глицерина. Микрокапсулы представляют собой сферические частицы белого цвета с гладкой поверхностью. По внешнему виду капсулы без глицерина и с глицерином не отличались друг от друга.

В табл. 2 представлены результаты определения жизнеспособности клеток бактерий после их шестимесячной консервации в микрокапсулах с глицерином. В качестве контроля использовали варианты хранения субкультивированием и микрокапсулированием без биостатика.

Выявлено, что после шестимесячного хранения 8 споро- и неспороносных бактерий микрокапсулированием с добавлением глицерина жизнеспособность клеток высокая (88–98%), тогда как без добавления биостатика этот показатель составляет 76–94%; при субкультивировании этот показатель составил 74–93%. Следует отметить, что жизнеспособность неспороносных культур – псевдомонад – после шестимесячного хранения находится в пределах 88–91%, тогда как для спорообразующих бацилл этот показатель составляет 95–98%. Такая корреляция наблюдается и для классических методов хранения – субкультивирования и микрокапсулирования в альгинатный гель.

В качестве ценных свойств микроорганизмов, используемых как в биоре-

медиаии, так и для повышения микробной нефтеотдачи «старых» месторождений, является способность микроорганизмов к нефтеэмульгированию [21–22].

В табл. 3 представлены результаты определения нефтеэмульгирования иммобилизованных в гель с добавлением глицерина клеток микроорганизмов после их шестимесячного хранения при +40°C, в качестве контроля – клетки бактерий, консервированные субкультивированием и микрокапсулированием в альгинатный гель.

Установлено, что способность микроорганизмов к нефтеэмульгированию (исх. E24 – 51–76%) после шестимесячного хранения микрокапсулированием клеток в альгинатный гель без глицерина и с глицерином осталась без изменений и составила 51–75% и 51–78%, соответственно. Следует отметить, при хранении методом субкультивирования исследованных бактерий наблюдается тенденция в сторону уменьшения способности к нефтеэмульгированию (44–68 %).

Выявлено, что из 8 культур бактерий, обладающих биотехнологическим потенциалом в нефтяной отрасли, после шестимесячной консервации тремя методами (субкультивирование, микрокапсулирование клеток в альгинатный гель и микрокапсулирование в альгинатный гель с добавлением глицерина (15%)) следующие 3 культуры микроорганизмов обладают индексом нефтеэмульгирования выше 60%: P.aeruginosa T1, P.aeruginosa T4, B.licheniformis A3.

Заключение

Результаты, полученные в данной статье дают возможность сделать следующие выводы:

Добавление в качестве биостатика глицерина (15% об.) при микрокапсулировании споро- и неспороносных бактерий

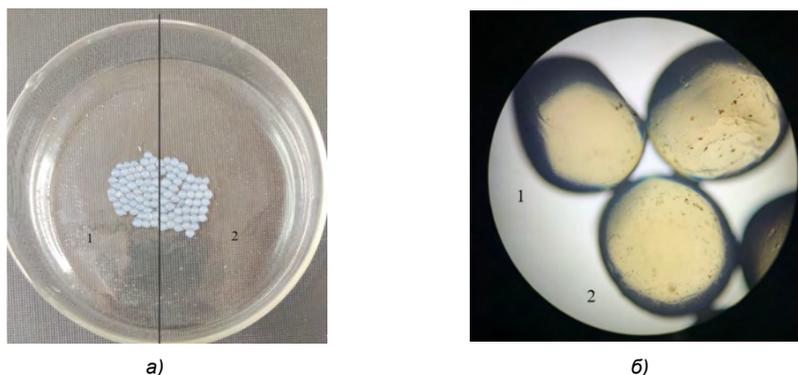


Рисунок 1. Внешний вид микрокапсул на основе альгината
Figure 1. Appearance of alginate microcapsules

а) без увеличения / without magnification; б) при увеличении $\times 400$ / at magnification $\times 400$

1 – альгинатные гранулы без добавления глицерина / alginate granules without added glycerin; 2 – альгинатные гранулы с добавлением глицерина / alginate granules with added glycerin

Таблица 2. Определение жизнеспособности микроорганизмов после шестимесячного хранения микрокапсулированных с глицерином клеток бактерий
Table 2. Determination of the viability of microorganisms after 6 months of storage of of bacterial cells microencapsulated with glycerin

№	Микроорганизмы Microorganisms	Жизнеспособность перед консервацией, КОЕ/мл Viability before conservation, CFU/ml	Субкультивирование Subculturing		Микрокапсулирование клеток Cell microencapsulation		Микрокапсулирование с глицерином Microencapsulation with glycerin	
			КОЕ/мл CFU/ml	%	КОЕ/мл CFU/ml	%	КОЕ/мл CFU/ml	%
1	<i>P.aeruginosa D4</i>	(2,3±0,1) x 108	(1,7±0,1) x 108	74	(1,7±0,2) x 108	80	(2,1±0,2) x 108	91
2	<i>P.aeruginosa T1</i>	(2,1±0,1) x 108	(1,6±0,2) x 108	76	(1,7±0,1) x 108	76	(1,9±0,1) x 108	91
3	<i>P.aeruginosa T2</i>	(4,7±0,2) x 108	(3,4±0,3) x 108	72	(4,0±0,2) x 108	85	(4,3±0,2) x 108	91
4	<i>P.aeruginosa T4</i>	(3,3±0,2) x 108	(2,4±0,2) x 108	73	(2,5±0,2) x 108	76	(2,9±0,2) x 108	88
5	<i>B.safensis subsp. safensis A2</i>	(4,6±0,2) x 107	(3,4±0,2) x 107	74	(4,2±0,3) x 107	96	(4,5±0,3) x 107	98
6	<i>B.licheniformis PW2</i>	(2,2±0,1) x 107	(1,8±0,2) x 107	82	(1,9±0,1) x 107	86	(2,1±0,1) x 107	96
7	<i>B.paralicheniformis R4</i>	(8,1±0,3) x 106	(7,5±0,3) x 106	93	(7,7±0,4) x 106	94	(7,8±0,4) x 106	96
8	<i>B.licheniformis A3</i>	(9,5±0,5) x 106	(7,5±0,5) x 106	79	(8,8±0,4) x 106	92	(9,0±0,4) x 106	95

Таблица 3. Определение нефтеэмульгирования микроорганизмов после шестимесячного хранения в микрокапсулах с глицерином
Table 3. Determination of petroleum emulsification of microorganisms after six months of storage in microcapsules with glycerin

№	Микроорганизмы Microorganisms	Нефтеэмульгирование до консервации (E24), % Oil emulsification before conservation (E24), %	После шестимесячного хранения, (E24), % After six months storage (E24), %		
			периодический пересев periodic reinoculation	микрокапсулирование клеток cell microencapsulation	микрокапсулирование с глицерином microencapsulation with glycerin
1	<i>P.aeruginosa D4</i>	51±2,3	44±2,3	51±2,3	51±2,3
2	<i>P.aeruginosa T1</i>	73,1±3,2	68±3,0	75±3,2	78±3,2
3	<i>P.aeruginosa T2</i>	54,2±2,5	54,2±2,5	54±2,5	53±2,5
4	<i>P.aeruginosa T4</i>	64±3,2	66±3,2	62±3,1	61±3,1
5	<i>B.safensis subsp. safensis A2</i>	60,9±3,3	55±3,3	61,5±3,3	60,5±3,3
6	<i>B.licheniformis PW2</i>	51,6±2,3	50,5±2,3	51±3,3	51,1±2,3
7	<i>B.paralicheniformis R4</i>	62,1±2,9	54,4±2,9	58,9±2,9	58±2,9
8	<i>B.licheniformis A3</i>	68,5±1,8	65±1,7	67±1,8	69±1,8

после их шестимесячного хранения при +40°C обеспечивает высокую жизнеспособность клеток (88–98%) с сохранением функциональности иммобилизованных клеток. Индекс нефтеэмульгирования бактерий сохранился на уровне значений до консервации, тогда как при классических методах хранения в течение 6 мес. количество жизнеспособных клеток ниже. Так, при субкультивировании этот показатель для псевдомонад составил 72–76%, для бацилл – 79–93%, при микрокапсулировании в альгинатный гель без глицерина для псевдомонад жизнеспособность клеток равна 76–85%, бацилл – 86–96%. Следует отметить, что после шестимесячного хранения в капсулированном виде с глицери-

ном жизнеспособность неспорозных культур – псевдомонад – находится в пределах 88–91%, тогда как для спорообразующих бацилл этот показатель составляет 95–98%. Такая корреляция наблюдается и для классических методов хранения – субкультивирования и микрокапсулирования в альгинатный гель.

Выявлено, что из исследованных 8 культур бактерий после шестимесячной консервации тремя методами (субкультивирование, микрокапсулирование клеток и микрокапсулирование с глицерином) следующие 3 культуры при всех методах хранения обладают индексом нефтеэмульгирования выше 60%: *P.aeruginosa T1*, *P.aeruginosa T4*, *B. licheniformis A3*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Источник финансирования. Данное исследование выполнено в рамках финансирования Комитетом науки Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан (ИРН BR18574066).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Кайырманова Г.К. – анализ и проверка результатов, предоставление консультаций, валидация, редактирование рукописи, Асылбек А.Е. – сбор, обработка и анализ экспериментальных данных, проведение исследования, визуализация материала, Исламова А.Р. – написание рукописи, проведение исследования, редактирование рукописи, Ерназарова А.К. – разработка методологических подходов, предоставление консультаций, Абитбекова А.У. – сбор, обработка и анализ экспериментальных данных,

Шаймерденова У.Т. – анализ результатов, предоставление консультаций.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This research has been funded by the Science Committee of the Ministry of Science and Higher Education of the Republic of Kazakhstan (URN BR18574066).

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. The greatest contribution is distributed as follows: Gulzhan K. Kaiyrmanova – analysis and verification of results, provision of consultations, validation, editing the manuscript; Alisher E. Asylbek – collection, processing and analysis of experimental data, conducting the study, visualization of material; Aida R. Islamova – writing the manuscript, conducting the study, editing the manuscript; Aliya K. Yernazarova – development of methodological approaches, provision of consultations; Aelina U. Abitbekova – collection, processing and analysis of experimental data; Ulzhan T. Shaimerdenova – analysis of results, provision of consultations.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cui K., Zhang Z., Zhang Z., et al. Stimulation of indigenous microbes by optimizing the water cut in low permeability reservoirs for green and enhanced oil recovery // *Sci Rep.* 2019. Vol. 9, N 1. doi:10.1038/s41598-019-52330-2.
2. Singh N.K., Choudhary S. Bacterial and archaeal diversity in oil fields and reservoirs and their potential role in hydrocarbon recovery and bioprospecting // *Environ Sci Pollut Res.* 2021. Vol. 42. P. 58819–58836. doi:10.1007/s11356-020-11705-z.
3. Al-Kaabi N., Disi Z.A., Al-Ghouti M.A., et al. Interaction between indigenous hydrocarbon-degrading bacteria in reconstituted mixtures for remediation of weathered oil in soil // *Biotechnol Rep.* 2022. Vol. 36. doi:10.1016/j.btre.2022.e00767.
4. Smyth T., Perfumo A., McClean S., et al. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin : Springer Berlin Heidelberg, 2010. 4200 p.
5. Prakash O., Nimonkar Y., Desai D. A Recent Overview of Microbes and Microbiome Preservation // *Indian J Microbiol.* 2020. Vol. 60, N 3. P. 297–309. doi:10.1007/s12088-020-00880-9.
6. Alonso S. Novel preservation techniques for microbial cultures. Ojha K., Tiwari S., Brijesh K., editors. *Novel Food Fermentation Technologies.* Cham : Springer, 2016. P. 7–33.
7. She R.C., Butler-Wu S.M. Procedures for the Storage of Microorganisms. Ledebner N., Karlowsky J., Carrel C.K., Pfaller A.M., editors. *Manual of Clinical Microbiology*, 13th ed. 2023. Washington : ASM Press. P. 1–6.
8. Кайырманова Г.К., Сайранбекова Н.Р., Ерназарова А.К., и др. Исследование нефтеэмульгирующих бактерий с длительным хранением // *Biological Sciences journal.* 2023. Том 1, № 1. С. 30–38. doi:10.52081/BSJ.2023.v01.i1.004.
9. Bircher L., Geirmaert A., Hammes F., et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes // *Microb Biotechnol.* 2018. Vol. 11, N 4. P. 721–733. doi:10.1111/1751-7915.13265.
10. Bassani J.C., Queiroz Santos V.A., Barbosa-Dekker A.M., et al. Microbial cell encapsulation as a strategy for the maintenance of stock cultures // *LWT.* 2019. Vol. 102. P. 411–417. doi:10.1016/j.lwt.2018.12.058.

11. Gbassi G.K., Vandamme T., Ennahar S., Marchioni E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins // International Journal of Food Microbiology. 2009. Vol. 129, N 1. P. 103–105. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.012.
12. microbeonline.com [Internet]. Bacteriology: Maintenance and Preservation of Organisms [дата обращения 13.12.2023]. Доступ по ссылке: <https://microbeonline.com/maintenance-and-preservation-of-pure-cultures-of-bacteria/>.
13. Gudina E.J., Pereira J.F.B., Costa R., et al. Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns// Journal of Hazardous Materials. 2013. Vol. 261. P. 106–113. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.06.071.
14. Волков А.И., Жарский И.М. Большой химический справочник. Москва : Современная школа, 2005. 608 с.
15. Казахстан. Национальная энциклопедия / под ред. Буркитбай А. Арысқумское нефтегазоконденсатное месторождение. Алматы: Қазақ энциклопедиясы, 2004. С. 266.
16. Cooper D.G., Goldenberg B.G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species // Applied and Environmental Microbiology. 1987. Vol. 53, N 2. P. 224–229. doi:10.1128/aem.53.2.224-229.1987.
17. Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. A study on the structurefunction relationship of lipopeptide biosurfactants // Biochim Biophys Acta. 2000. Vol. 1488, N 3. P. 211–218. doi:10.1016/s1388-1981(00)00124-4.
18. Prakash O., Nimonkar Y., Shouche Y.S. Practice and prospects of microbial preservation // FEMS Microbiology Letters. Vol. 339, N 1. P. 1-9 doi: 10.1111/1574-6968.12034.
19. Boothby T.C., Tapia H., Brozema A.H., et al. Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation // Molecular Cell. 2017. Vol. 65, N 6. P. 975–984. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.018.
20. Szulc A., Ambrozewicz D., Sydow M., et al. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies // J. Environ. Manage. 2014. Vol. 132. P. 121–128. doi:10.1016/j.jenvman.2013.11.006.
21. Кайырманова Г.К., Тапешова Ш.Ж., Шаймерденова У.Т., и др. Идентификация микроорганизмов, выделенных из нефтепластовых вод нефтяного месторождения Акинген, Казахстан // Вестник КазНУ. Серия Биологическая. 2022. Том 90, № 1. С. 126–136. doi:10.26577/eb.2022.v90.i1.11.
22. Samara D.A., Sousa S.B., Neto E.B., Oliveira C.A. Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR) // J. Pet. Explor. Prod. Technol. 2019. Vol. 9, N 3. P. 2333–2341. doi:10.1007/s13202-019-0633-x.

REFERENCES

1. Cui K, Zhang Z, Zhang Z, et al. Stimulation of indigenous microbes by optimizing the water cut in low permeability reservoirs for green and enhanced oil recovery. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-52330-2.
2. Singh NK, Choudhary S. Bacterial and archaeal diversity in oil fields and reservoirs and their potential role in hydrocarbon recovery and bioprospecting. *Environ Sci Pollut Res.* 2021;42:58819–58836. doi:10.1007/s11356-020-11705-z.
3. Al-Kaabi N, Disi ZA, Al-Ghouti MA, et al. Interaction between indigenous hydrocarbon-degrading bacteria in reconstituted mixtures for remediation of weathered oil in soil. *Biotechnol Rep.* 2022;36. doi:10.1016/j.btre.2022.e00767.
4. Smyth T, Perfumo A, McClean S, et al. Isolation and Analysis of Lipopeptides and High Molecular Weight Biosurfactants in Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Berlin: Springer Berlin Heidelberg; 2010. 4200 p.
5. Prakash O, Nimonkar Y, Desai D. A Recent Overview of Microbes and Microbiome Preservation. *Indian J Microbiol.* 2020;60(3):297–309. doi:10.1007/s12088-020-00880-9.
6. Alonso S. Novel preservation techniques for microbial cultures. Ojha K, Tiwari S, Brijesh K, editors. *Novel Food Fermentation Technologies.* Cham: Springer; 2016. P. 7–33.
7. She RC, Butler-Wu SM. *Procedures for the Storage of Microorganisms.* Ledebner N, Karlowsky J, Carrel CK, Pfaller AM, editors. *Manual of Clinical Microbiology, 13th ed.* 2023. Washington : ASM Press. P. 1–6.
8. Kaiyrmanova GK, Sairanbekova NR, Yernazarova AK, et al. Study of oil-emulsing bacteria with long-term storage. *Biological Sciences journal.* 2023;1(01):30–38. doi:10.52081/BSJ.2023.v01.i1.004.
9. Bircher L, Geirnaert A, Hammes F, et al. Effect of cryopreservation and lyophilization on viability and growth of strict anaerobic human gut microbes. *Microb Biotechnol.* 2018;11(4):721-733. doi:10.1111/1751-7915.13265.
10. Bassani JC, Queiroz Santos VA, Barbosa-Dekker AM, et al. Microbial cell encapsulation as a strategy for the maintenance of stock cultures. *LWT.* 2019;102:411–417. doi:10.1016/j.lwt.2018.12.058.

11. Gbassi GK, Vandamme T, Ennahar S, Marchioni E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*. 2009;129(1):103–105. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.11.012.
12. *microbeonline.com* [Internet]. Bacteriology: Maintenance and Preservation of Organisms [cited 2023 Dec 12]. Available from: <https://microbeonline.com/maintenance-and-preservation-of-pure-cultures-of-bacteria/>.
13. Gudina EJ, Pereira JFB, Costa R, et al. Biosurfactant-producing and oil-degrading *Bacillus subtilis* strains enhance oil recovery in laboratory sand-pack columns. *Journal of Hazardous Materials*. 2013;261:106–113. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.06.071.
14. Volkov AI, Zharskiy IM. Bol'shoy himicheskiy spravochnik. Moscow: Sovremennaya shkola; 2005. 608 p.
15. Burkitbay A. editor. Kazakhstan. *Natsional'naya entsiklopediya*. Aryskskoye neftegazokondensatnoye mestorozhdeniye. Almaty: Kazak entsiklopediyasy; 2004. P. 266. (In Russ).
16. Cooper DG, Goldenberg BG. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987;53(2.):224–229. doi:10.1128/aem.53.2.224-229.1987.
17. Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T. A study on the structurefunction relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1488(3):211–218. doi:10.1016/s1388-1981(00)00124-4.
18. Prakash O, Nimonkar Y, Shouche YS. Practice and prospects of microbial preservation // *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 339, N 1. P. 1-9 doi: 10.1111/1574-6968.12034.
19. Boothby TC, Tapia H, Brozena AH, et al. Tardigrades Use Intrinsically Disordered Proteins to Survive Desiccation. *Molecular Cell*. 2017;65(6):975–984. doi:10.1016/j.molcel.2017.02.018.
20. Szulc A, Ambrozewicz D, Sydow M, et al. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: feasibility during field studies. *J. Environ. Manage*. 2014;132:121–128. doi:10.1016/j.jenvman.2013.11.006.
21. Kaiymanova GK, Tapesheva SZ, Shaimerdenova UT, et al. Identification of microorganisms isolated from oil reservoir water of the Akingen field, Kazakhstan. *Experimental Biology*. 2022;1(90):126–136. doi:10.26577/eb.2022.v90.i1.11.
22. Camara DA, Sousa SB, Neto EB, Oliveira CA. Application of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* in microbial-enhanced oil recovery (MEOR). *J. Pet. Explor. Prod. Technol*. 2019;9(3):2333–2341. doi:10.1007/s13202-019-0633-x.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кайырманова Гульжан Кайыржановна

канд. биол. наук
ORCID 0000-0001-8486-0566
e-mail: kaiyrman@mail.ru.

Асылбек Әлішер Ерланұлы

ORCID 0009-0004-0991-5474
e-mail: alisherasilbek162@gmail.com.

***Исламова Аида Руслановна**

ORCID 0009-0004-6923-4160
e-mail: aida.islamovaa@gmail.com.

Ерназарова Алия Кулахметовна

канд. биол. наук
ORCID 0000-0001-5195-1795
e-mail: aliya.yernazarova@kaznu.edu.kz.

Абитбекова Аэлина Улановна

ORCID 0009-0002-1180-2570
e-mail: aelinaabitbekova@gmail.com.

Шаймерденова Ұлжан Тұрғанбекқызы

ORCID 0000-0001-7399-7639
e-mail: shaimerdenovau@gmail.com.

AUTHORS' INFO

Gulzhan K. Kaiyrmanova

Cand. Sc. (Biology)
ORCID 0000-0001-8486-0566
e-mail: a.beken@kmge.kz.

Alisher E. Asylbek

ORCID 0009-0004-0991-5474
e-mail: alisherasilbek162@gmail.com.

***Aida R. Islamova**

ORCID 0009-0004-6923-4160
e-mail: aida.islamovaa@gmail.com.

Aliya K. Yernazarova

Cand. Sc. (Biology)
ORCID 0000-0001-5195-1795
e-mail: aliya.yernazarova@kaznu.edu.kz.

Aelina U. Abitbekova

ORCID 0009-0002-1180-2570
e-mail: aelinaabitbekova@gmail.com.

Ulzhan T. Shaimerdenova

ORCID 0000-0001-7399-7639
e-mail: shaimerdenovau@gmail.com.

*Автор, ответственный за переписку/Corresponding Author