

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

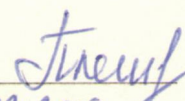
Кафедра биохимии и биофизики

СКРИНИНГ ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ,
ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ
ОЧИСТКИ ВОДЫ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студента 4 курса 421 группы
направления 06.03.01 - Биология
биологического факультета
Романова Ильи Евгеньевича

Научный руководитель:
профессор кафедры биохимии
и биофизики, д.б.н.


10.06.2019

Е.В. Плешакова

Научный консультант:
ассистент кафедры биохимии
и биофизики


10.06.2019

К.Т. Нгун

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,
д.б.н., профессор


10.06.2019

С.А. Коннова

Саратов 2019

Введение. Загрязнение окружающей среды – одна из наиболее острых проблем современности. Большой вклад в загрязнение окружающей среды вносят побочные продукты предприятий металлургической, нефтеперерабатывающей, машиностроительной, приборостроительной, автомобильной промышленности, в состав которых входит значительное количество спиртов, кислот, щелочей и тяжёлых металлов (ТМ). При хроническом воздействии большинство ТМ накапливаются в организме на протяжении всей жизни человека, и их биологический эффект способствует сокращению естественной продолжительности жизни [1]. Железо относится к третьему классу опасности [2]. Избыток железа в организме отрицательно влияет на состояние здоровья человека. Возникают дерматиты, аллергические реакции, происходит увеличение размера печени, изменение морфологического состава крови, утрата веса, наблюдаются: высокая утомляемость, слабость, нарушения нормального сердечного ритма, ухудшение памяти, частые расстройства желудка, воспаления органов пищеварительной системы, проблемы со щитовидной железой [3]. При систематическом употреблении питьевой воды с высоким содержанием железа, этот элемент аккумулируется в почках, печени, сердце, легких, кишечнике и поджелудочной железе. Крайним проявлением избытка железа является гемохроматоз – поражение системы кроветворения, печени и селезенки.

Антропогенными источниками железа являются: сточные воды и шламы металлургического, химического, нефтехимического, фармацевтического, лакокрасочного, текстильного производств, коррозия металлических труб. Предельно допустимая концентрация (ПДК) суммарного железа в питьевой воде, согласно СанПиН, составляет 0,3 мг/л [2]. По данным Роспотребнадзора на территории Саратовской области в 2018 г. 38,4 % поверхностных источников питьевого водоснабжения не соответствовало санитарно-эпидемиологическим правилам и нормативам.

Используемые водоочистные сооружения основываются на применении аэрации, сильных окислителей и коагулянтов, фильтров. В основном, на водоподъемных станциях применяются песчаные фильтры, которые малоэффективны, так как, к сожалению, не могут сорбировать растворимые формы железа и марганца, которые доминируют в грунтовой воде. Одним из современных направлений в этой отрасли является применение биотехнологических способов очистки питьевых и сточных вод с использованием микроорганизмов.

В связи с этим большой научно-прикладной интерес представляет использование железобактерий для удаления железа из питьевой воды путем трансформации его в нерастворимую форму, которая эффективно задерживается фильтрами очистных сооружений.

Цель настоящей работы: изучить способность микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы г. Медногорска, к окислению Fe (II) при периодическом культивировании в жидкой среде и идентифицировать микроорганизмы с наилучшими показателями.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить максимальную толерантную и минимальную ингибирующую концентрацию Fe (II) для микроорганизмов.
2. Изучить показатели роста микроорганизмов в жидкой среде, содержащей Fe (II), в условиях периодического культивирования.
3. Произвести количественную оценку железобактериальной активности у микроорганизмов при культивировании их в жидкой среде.
4. Исследовать культурально-морфологические и физиолого-биохимические свойства микробных штаммов, наиболее перспективных для использования в биотехнологии очистки воды от повышенного содержания железа.

В качестве объектов исследования использовали бактериальные штаммы, изолированные Нгуном К.Т. из высокомагнитной почвы,

находящейся под сильным техногенным влиянии промышленными выбросами медно-серного комбината г. Медногорска Оренбургской области.

Для культивирования микроорганизмов использовали среды: мясопептонный агар (МПА) и жидкую селективную среду с добавлением $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Показатели роста железooksисляющих бактерий определяли через 7 и 14 суток культивирования в условиях аэрации при температуре 22-24 °С двумя методами: весовой метод – оценка прироста биомассы по сырому весу (г/л); анализ абсолютного прироста биомассы путем измерения оптической плотности культуральной жидкости. По полученным результатам рассчитывали удельную скорость роста бактерий. Для измерения массовой концентрации общего железа в культуральной среде использовали метод с сульфосалициловой кислотой согласно ГОСТу 4011-72. После регистрации данных определяли массовую концентрацию железа, используя предварительно построенный градуировочный график.

Для определения минимально-ингибирующих и максимально-толерантных концентраций (МИК и МТК) $\text{Fe}(\text{II})$ микроорганизмы культивировали в жидкой селективной среде с добавлением $\text{Fe}(\text{II})$ в диапазоне концентраций от 0 до 1800 мг/л, оценивая рост микроорганизмов через 2 сут инкубации в термостате при 28°С.

Идентификацию микроорганизмов проводили по результатам изучения совокупности морфолого-культуральных и физиолого-биохимических признаков согласно определителю бактерий Берджи, а также на основе принципов молекулярного типирования по последовательности гена 16S рРНК в ФГБНУ ВНИИСБ (г. Москва).

Бакалаврская работа состоит из введения, трех глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего пятьдесят один источник.

Основное содержание работы. Проведены исследования устойчивости исследуемых микробных штаммов к действию диапазона концентраций Fe (II) при культивировании их в селективной среде с добавлением $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Были определены МТК и МИК Fe (II) для бактериальных штаммов 69.3 и 69.5. В ходе экспериментов было определено, что МТК Fe (II) для микробных штаммов 69.3 и 69.5 составила 1200 мг/л, МИК – 1800 мг/л.

Для оценки железоокисляющей активности 8 микробных штаммов культивировали в жидкой селективной среде, содержащей Fe (II) (0,1 %), в качестве источников углерода: сахарозу (0,2 %) и пептон (0,1 %). Как видно из рисунка 1, наибольший прирост биомассы через 7 суток культивирования продемонстрировали микробные штаммы с лабораторными шифрами 69.5 и 32.3. Вес сырой биомассы составил 5,4 и 3,2 г/л соответственно. Остальные изученные штаммы росли менее интенсивно. Через 14 сут культивирования вес сырой биомассы штамма 69.3 был максимальным, составляя 15,3 г/л. Близкое значение наблюдалось также у микробного штамма 69.5 – 14,7 г/л.

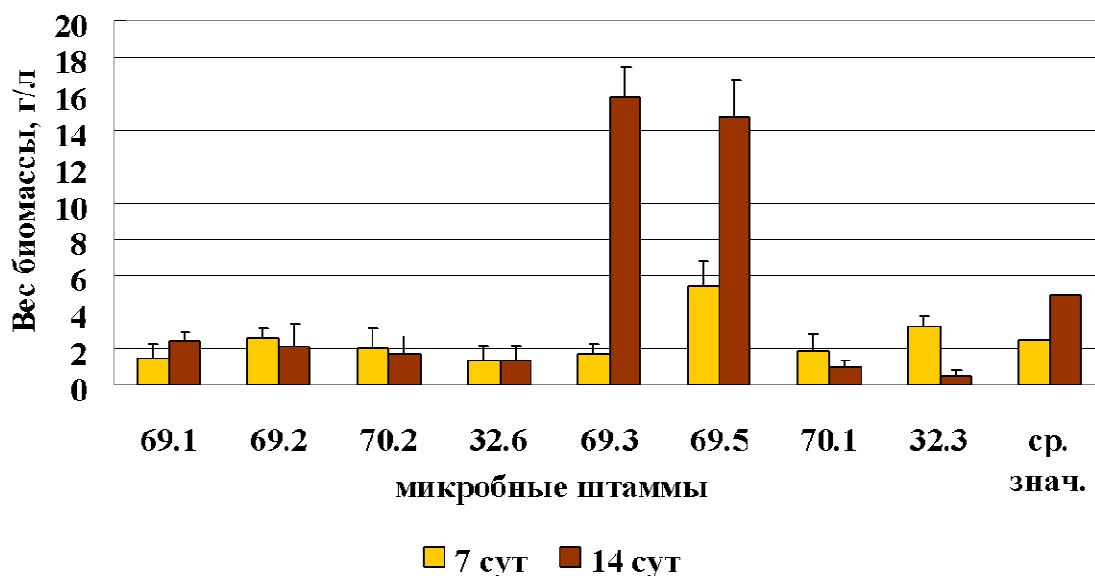


Рисунок 1 – Прирост биомассы по сырому весу у бактерий

Результаты определения прироста активной части биомассы с помощью фотометрического метода показали увеличение оптической плотности культуральной жидкости штаммов 69.3 и 69.5 в 8,7 и 6,9 раз соответственно по сравнению с исходной посевной дозой через 14 сут культивирования (рисунок 2). Было выявлено, что через 7 сут культивирования активным ростом отличались и другие микробные штаммы: 69.1, 32.6, 70.1 и 70.2.

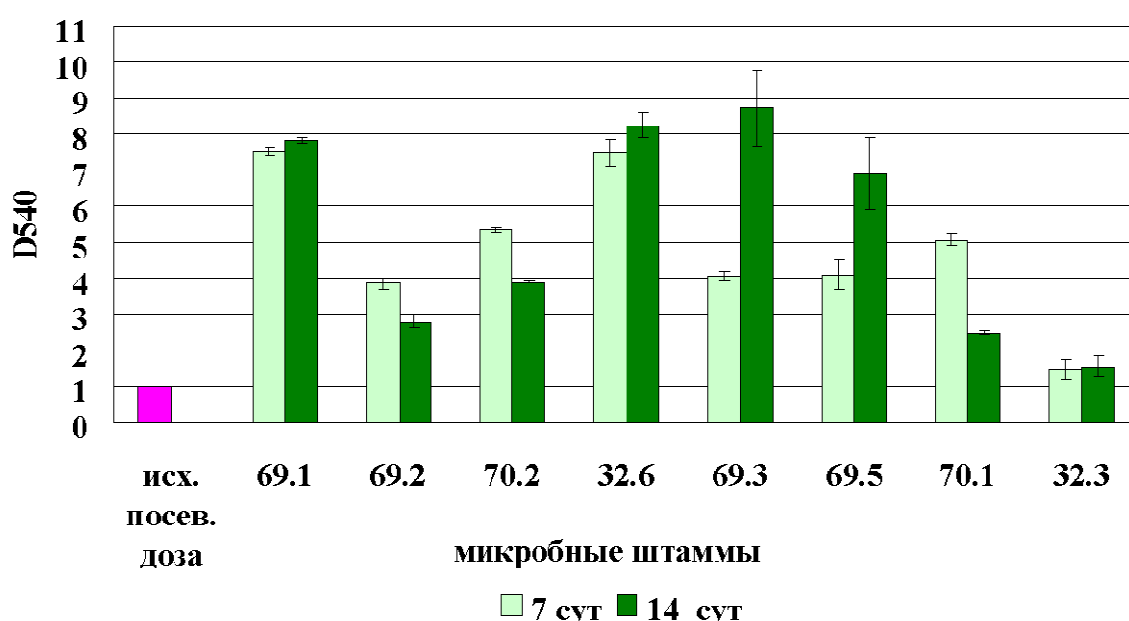


Рисунок 2 – Абсолютный прирост биомассы у бактерий

Таким образом, при определении суммарного прироста биомассы весовым методом, который позволяет оценивать и размеры, и количество микробных клеток, максимальные показатели роста обнаружены у культур 69.3 и 69.5. По результатам определения прироста активной части биомассы с помощью фотометрического метода можно выделить аналогичные микробные штаммы: 69.3 и 69.5, и, в дополнение к ним, штаммы 69.1 и 32.6.

При сравнении рассчитанной удельной скорости роста исследованных микроорганизмов было установлено (таблица 1), что через 14 сут

культивирования у ряда микроорганизмов наблюдалась фаза отмирания или значительное снижение скорости роста, за исключением штаммов 69.3 и 69.5, которые характеризовались максимальными значениями удельной скорости роста.

Таблица 1 – Удельные скорости роста исследованных микроорганизмов

Лабораторный шифр штаммов	Скорость роста, усл. ед./ч, по результатам метода:			
	весового		фотометрического	
	7 суток	14 суток	7 суток	14 суток
69.1	0,0023	-0,0006	0,0120	-0,0071
69.2	0,0055	ФО	0,0080	ФО
70.2	0,0042	ФО	0,0100	ФО
32.6	0,0019	ФО	0,0120	-0,0017
69.3	0,0031	0,0157	0,0083	0,0092
69.5	0,0100	0,0133	0,0084	0,0061
70.1	0,0037	ФО	0,0096	ФО
32.3	0,0069	ФО	0,0023	ФО

Примечание – ФО – фаза отмирания бактериальной культуры.

Убыль железа при культивировании исследуемых бактерий рассчитывали в процентах по отношению к абиотическому контролю. Концентрация Fe (II) в среде культивирования исследованных нами микроорганизмов составляла 1200 мг/л, эта концентрация соответствовала содержанию Fe (II) в селективной среде, с помощью которой данные

бактерии были изолированы из почвы, и была значительно выше, чем ПДК железа в природных водоемах. Выбор концентрации Fe (II) был основан также на результатах эксперимента, по определению МТК Fe (II) для микробных штаммов 69.3 и 69.5.

Через 7 сут культивирования у большинства исследованных микробных штаммов происходила убыль железа на 8-10 %, через 14 сут – на 11-15 %. Убыль железа при культивировании штамма 69.3 составила 21 и 33 % за 7 и 14 сут, при культивировании штамма 69.5 – 34 и 39 % соответственно (рисунок 3).

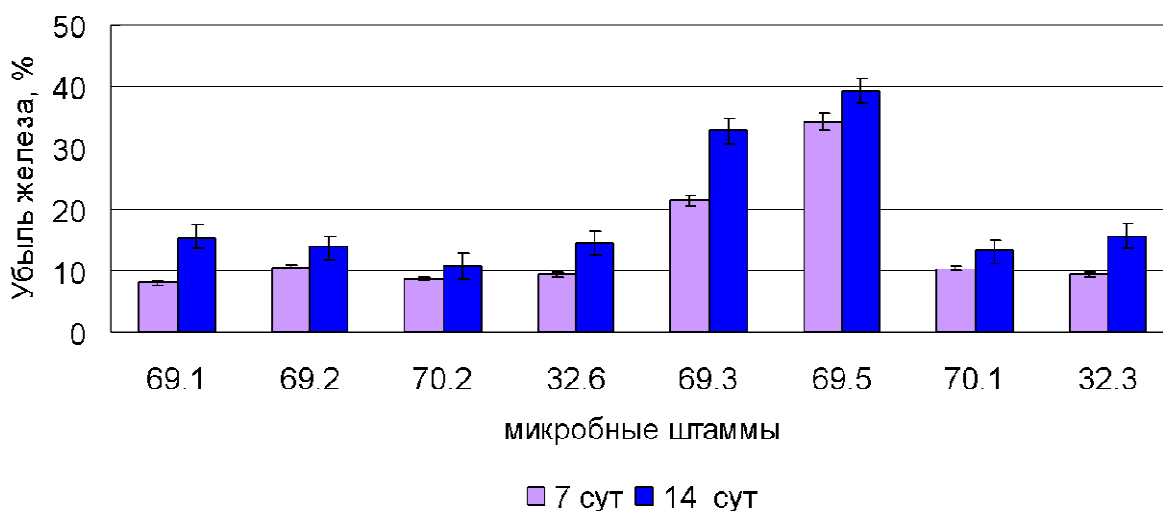


Рисунок 3 – Убыль железа при культивировании бактерий

У двух перспективных на наш взгляд микробных штаммов: 69.5 и 69.3 мы изучили культурально-морфологические и физиолого-биохимические признаки. Исследованные штаммы окрашивались по Граму положительно. В мазках клетки располагались как цепочками, так и попарно в виде палочек и одиночно. Выявлены эллипсоидальные эндоспоры, расположенные по центру.

У штаммов наблюдался хороший рост на МПА через 24 ч инкубации при 28 °С. Диаметр колоний около 2 мм. Колонии непрозрачные, круглые,

выпуклые, обладали беловато-кремовым оттенком, гладкой блестящей поверхностью. По характеру краёв – слегка фестончатые. Консистенция маслообразная.

Установлено, что изучаемые бактерии являются факультативными анаэробами. При их росте в МПБ в течение 24-48 ч без встряхивания наблюдалось равномерное помутнение среды, образование пленки, осадка; Бактерии не росли при 42 °С, слабый рост микробного штамма 69.3 наблюдался при 10 °С.

При изучении физиолого-биохимических признаков были получены сходные результаты по ряду признаков для 69.3 и 69.5. Оба штамма были кислотоустойчивы, подвижны. Не продуцировали аммиак, аргинингидролазу, лизиндекарбоксилазу, орнитиндекарбоксилазу, индол, липазу, уреазу. Не утилизировали цитрат на среде Симмонса. Не продуцировали оксидазу и каталазу. Гидролизировали крахмал, казеин, разжижали желатину. Штаммы были отнесены к факультативным анаэробам. Окисляли и ферментировали глюкозу, лактозу, сахарозу, фруктозу, мальтозу, маннит. Реакция Фогес-Проскауэра была отрицательной.

У штаммов 69.3 и 69.5 наблюдались некоторые отличия. Для микробного штамма 69.3 были характерны следующие признаки: он не продуцировал сероводород, фенилаланиндезаминазу и уреазу. Продуцировал нитратредуктазу и лецитиназу. Ферментировал арабинозу. Для микробного штамма 69.5 характерны: продукция сероводорода, фенилаланиндезаминазы и уреазы. Микроорганизм не продуцировал нитратредуктазу и лецитиназу. Окислял и ферментировал арабинозу и окислял ксилозу.

У изучаемых микроорганизмов был также осуществлен анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК. На основании сравнительного анализа изученных культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков, а также согласно принципам молекулярного типирования клеток прокариот отобранные нами

микроорганизмы были идентифицированы как *Bacillus megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5.

Заключение. Во всём мире достаточно остро стоит проблема качества питьевой воды, загрязнение в основном происходит из-за антропогенных факторов. Железо является одним из основных загрязнителей воды среди тяжелых металлов, главным образом потому, что его техногенное накопление в окружающей среде идет высокими темпами. Железо, при высоких концентрациях, токсично, вследствие загрязнения воды оно проникает во все организмы. Однако в природе существуют механизмы защиты от пагубного действия тяжелых металлов, в том числе, и железа.

Несмотря на наличие множества химических, физических, электрохимических методов очистки воды, наиболее эффективным, экономичным и экологичным решением является микробиологическая очистка. В настоящее время спектр бактерий, окисляющих железо, расширяется благодаря активным исследованиям в этой области. Однако поиск более перспективных железобактерий на сегодняшний день остается актуальным. Поиск тех бактерий, которые будут активно окислять железо в различных условиях. Исследование механизмов окисления соединений железа имеет в этом свете не только фундаментальное, но и прикладное значение. Таким образом, очевидна важность изучения железобактерий.

На основе проведенных скрининговых исследований нами выявлено 2 бактериальных штамма *Bacillus megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5, которые могут послужить основой для технологии очистки природных и сточных вод от повышенного содержания железа.

Выводы:

1. Установлено, что максимальная толерантная концентрация Fe (II) для микробных штаммов 69.3 и 69.5 составила 1200 мг/л, минимальная ингибирующая концентрация – 1800 мг/л.

2. По результатам изучения показателей роста у 8 микробных штаммов при культивировании их в жидкой среде, содержащей Fe (II), выявлены штаммы с наилучшими показателями. Суммарный прирост биомассы у штаммов 69.3 и 69.5 составил 15,3 и 14,7 г/л за 14 сут культивирования, оптическая плотность культуральной жидкости штаммов увеличилась в 8,7 и 6,9 раз по сравнению с исходной посевной дозой.

3. Установлено, что микробные штаммы 69.3 и 69.5 отличались от других исследованных микроорганизмов максимальными значениями удельной скорости роста в жидкой среде с Fe (II), снижая его содержание на 33 и 39 % за 14 сут культивирования.

4. По результатам проведенных исследований культурально-морфологических и физиолого-биохимических признаков двух отобранных микробных штаммов, а также согласно анализу нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК, бактерии были идентифицированы как *Bacillus megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5.

Список использованных источников

1. Постановление № 1 от 17.02.2017 г. Об обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения области в период паводка в 2017 г. Саратов: Управление федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Саратовской области. - 2017. - 106 с.
2. Микроэлементозы человека: этиология, классификация, органопатология / А. П. Авцын [и др.]. - М.: Медицина, 1991. - 496 с.
3. Токсикологическая химия: учебник для вузов / под ред. Т. В. Плетеневой. 2-е изд., испр. - М.: ГЭОТАР Медиа, 2005. - 512 с.

Результаты данной работы опубликованы:

1. Романов И.Е., Плешакова Е.В., Нгун К.Е, Решетников М.В. Изучение микроорганизмов, окисляющих железо, для возможного использования в биотехнологии очистки воды / Ртуть и тяжелые металлы в экосистемах. Современные методы исследования содержания тяжелых металлов в окружающей среде: Тезисы Всероссийской научной конференции и школы-семинара для молодых ученых, аспирантов и студентов. // Отв. ред. Е.С. Иванова. Череповец: Череповецкий гос. ун-т, 2018. С. 55–56.

2. Плешакова Е.В., Нгун К.Т., Романов И.Е., Решетников М.В. Выявление и идентификация микроорганизмов, перспективных для очистки воды от повышенного содержания железа // Сб. науч. трудов «Экологические проблемы промышленных городов» по материалам 9-й Международной научно-практической конференции; под ред. проф. Е.И. Тихомировой. Саратов: Сарат. гос. техн. ун-т., 2019. С. 397-400.


10.06.2019