

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

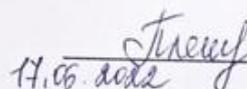
Кафедра биохимии и биофизики

ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ МАРГАНЕЦОКИСЛЯЮЩИХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВЫСОКОМАГНИТНОЙ  
ПОЧВЫ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы  
направления 06.03.01 Биология  
Биологического факультета  
Касаткиной Милены Александровны

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

 Е.В. Плешакова  
17.06.2022

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

 С.А. Коннова  
17.06.2022

Саратов 2022

**Введение.** Многие водные объекты различных урбоэкосистем постоянно подвергаются сильной техногенной нагрузке, в них нередко наблюдается превышение ПДК тяжёлых металлов, в том числе, марганца. Марганец входит в перечень приоритетных поллютантов, поступающих в организм человека с питьевой водой. Известно, что при экзогенном поступлении марганца в организм человека при его избытке в питьевой воде проявляется общерезорбтивное и специфическое повреждающее действие марганца на ЦНС, желудочно-кишечный тракт, почки, иммунную, кровяную и костную систему, снижается активность антиоксидантной системы и обменных процессов.

В условиях антропогенеза предъявляются повышенные требования к качеству воды и содержанию в ней допустимых концентраций ТМ, что требует модернизации уже существующих или поиска новых экологически безопасных и экономически выгодных способов очистки. Необходимо отметить, что большая часть солей ТМ хорошо растворима в воде, из этого следует, что их удаление с помощью физико-химических методов является не выгодным, когда речь идет о невысоких концентрациях металла в среде. ТМ в растворимой форме не задерживаются большинством песчаных фильтров, которые установлены на очистных сооружениях. Хорошей альтернативой физико-химическим способам очистки воды от ТМ являются более доступные и инновационные биологические методы, например, биосорбция и биоаккумуляция [1].

Цель настоящей работы состояла в оценке уровня устойчивости микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы, к марганцу (II) для выявления микробных штаммов с максимальной устойчивостью и ростом в присутствии повышенных концентраций металла и способностью к его удалению из водной среды.

Для реализации поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определить максимальную толерантную концентрацию (МТК) и минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) Mn(II) для

микроорганизмов, выделенных из высокомагнитной почвы, при их культивировании на плотной среде и в жидких средах.

2. У микробных штаммов, отобранных по результатам оценки уровня устойчивости к Mn (II), изучить показатели роста в условиях периодического культивирования в жидкой среде, содержащей Mn (II).

3. Произвести количественную оценку убыли Mn (II) из среды культивирования отобранных микробных штаммов и выявить взаимосвязь между данным показателем и ростовыми характеристиками штаммов.

В качестве объекта исследования использовались марганцеоокисляющие микроорганизмы (9 штаммов) и два штамма железooksисляющих микроорганизмов (*Bacillus megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5), выделенные ранее из почвенных микробсообществ г. Медногорска (Оренбургская область, Россия) [2]. Два штамма железooksисляющих микроорганизмов *B. megaterium* 69.3 и *B. megaterium* 69.5 были идентифицированы по совокупности изученных культурально-морфологических, физиолого-биохимических признаков и результатов молекулярного типирования [3], последовательности 16S рРНК данных штаммов приняты в GenBank NCBI под регистрационными номерами MK764545 и MK764687, соответственно.

Марганцеоокисляющие микроорганизмы изолировали на селективной среде следующего состава, г/л:  $MnSO_4 \times 5H_2O$  – 4,72;  $(NH_4)_2SO_4$  – 0,5;  $NaNO_3$  – 0,5;  $K_2HPO_4$  – 0,5;  $MgSO_4 \times 7H_2O$  – 0,5; лимонная кислота – 10,0; сахароза – 2,0; пептон – 1,0; pH 7,0 [4]. Микроорганизмы хранились при 4 °С на столбиках 6 %-ной агаризованной селективной среды под стерильным вазелиновым маслом с регулярными пересевами.

Для определения максимальной толерантной концентрации (МТК) и минимальной ингибирующей концентрации (МИК) Mn (II) для исследуемых микроорганизмов (11 штаммов) оценивали их способность к росту на агаризованной LB-среде, содержащей Mn (II) в диапазоне концентраций: 0; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0; 100,0;

150,0; 200,0; 250 ммоль/л. Для двух штаммов (55.2 и *B. megaterium* 69.5), которые показали положительный рост на ранее используемых концентрациях, концентрационный ряд был продолжен: 300,0; 350,0; 400,0; 450,0; 500,0.

У отобранных по результатам оценки МИК и МТК микробных штаммов (55.2 и *B. megaterium* 69.5) изучали динамику роста в жидких средах: питательной LB-среде и селективной среде для марганцеоксиляющих микроорганизмов, содержащих возрастающие концентрации Mn (II): 0,5; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 ммоль/л.

Для измерения массовой концентрации общего марганца в культуральной среде использовали метод с использованием окисления до перманганат-ионов согласно ГОСТ 4974-2014 [5]. Сущность метода заключается в каталитическом окислении соединений марганца персульфатом калия или персульфатом натрия до перманганат-ионов с последующим измерением оптической плотности раствора и расчётом массовой концентрации марганца в пробе воды.

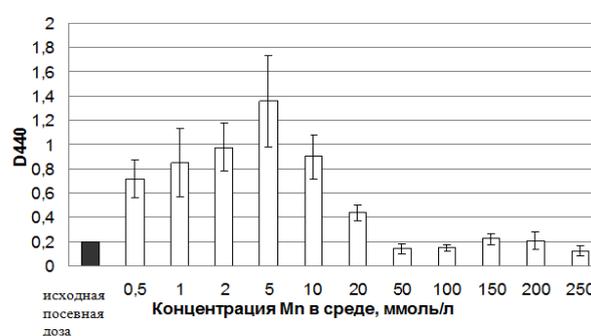
Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 48 источников на русском и английском языках. Работа изложена на 60 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 12 рисунками и 5 таблицами.

**Основное содержание работы.** В ходе проведённых экспериментов мы определили устойчивость 11 микробных штаммов, выделенных из высокомагнитной почвы города Медногорска, к действию диапазона концентраций Mn (II) по способности исследуемых микроорганизмов к росту на агаризованной LB-среде, содержащей Mn (II): от 0 до 500 ммоль/л. Результаты показаны в таблице 1.

Таблица 1 – МТК и МИК микробных штаммов

Показатели	Микробные штаммы										
	55.1	55.2	55.7	55.5	55.8	13.1	13.2	13.3	13.4	69.3	69.5
МТК, ммоль/л	150,0	300,0	3,0	1,5	0,2	20,0	200,0	15,0	200,0	200,0	350,0
МИК, ммоль/л	200,0	350,0	4,0	2,0	0,5	25,0	250,0	20,0	250,0	250,0	400,0

По результатам оценки МТК и МИК микробных штаммов были отобраны два штамма с максимальной резистентностью к марганцу: 55.2 и *V. megaterium* 69.5. Результаты изучения роста микробного штамма 55.2 в жидкой питательной LB-среде и в селективной среде, содержащей возрастающие концентрации Mn (II) от 0,5 до 250,0 ммоль/л, представлены на рисунке 1. Наиболее активный рост штамма 55.2 происходил в LB-среде при концентрации Mn (II) 5,0 ммоль/л, в селективной среде для марганецоксилирующих микроорганизмов – 10,0 ммоль/л. Значение оптической плотности культуральной среды увеличилось в 6,8 и 8,2 раза соответственно.



А



Б

Рисунок 1 – Абсолютный прирост биомассы микробного штамма 55.2 при культивировании в жидкой среде с Mn (II): А – в LB-среде; Б – в селективной среде

Наиболее активный рост *B. megaterium* 69.5 в LB-среде обнаруживался при концентрации Mn (II) 0,5 ммоль/л (рисунок 2А). Оптическая плотность культуральной среды увеличилась в этом варианте в 10,4 раза.



А



Б

Рисунок 2 – Абсолютный прирост биомассы *B. megaterium* 69.5 при культивировании в жидкой среде с Mn (II): А – в LB-среде; Б – в селективной среде

При культивировании *B. megaterium* 69.5 в селективной среде максимальный рост обнаруживался при концентрации Mn (II) 10,0 ммоль/л.

Определение прироста биомассы микроорганизмов осуществлялось через 1, 3 и 7 сут. культивирования. Нами была выбрана концентрация Mn (II) в среде культивирования – 2 ммоль/л.

Согласно весовому методу микробный штамм 55.2 продемонстрировал хороший рост в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II) (рисунок 3). Вес сырой биомассы через сутки культивирования составил 1,6 г/л.

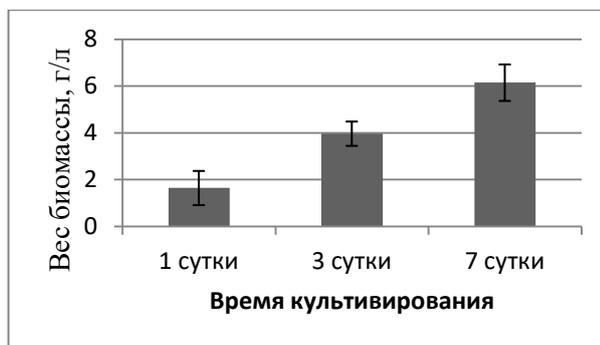


Рисунок 3 – Прирост биомассы по сырому весу у штамма 55.2, культивируемого в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II)

Через трое суток культивирования в жидкой селективной среде с ионами марганца вес биомассы штамма 55.2 увеличился в 2,4 раза по сравнению с первыми сутками культивирования в таких же условиях. Через 7 сут. культивирования вес биомассы у данного штамма по сравнению с первыми сутками культивирования увеличился в 3,7 раза и составил 6,1 г/л.

Изменение оптической плотности через сутки культивирования штамма 55.2 произошло незначительно – на 18 % относительно исходной посевной дозы, которая была равна 1 ед. Через трое сут. культивирования оптическая плотность культуральной среды изменилась в 1,55 раза. Через 7 сут. роста микроорганизма оптическая плотность культуральной среды увеличилась примерно в 2 раза по сравнению с исходной посевной дозой (рисунок 4).



Рисунок 4 – Абсолютный прирост биомассы у штамма 55.2, культивируемого в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II)

Согласно весовому методу микроорганизм *B. megaterium* 69.5 продемонстрировал значительный рост в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II) (рисунок 5). Вес сырой биомассы через сутки культивирования составил 4,88 г/л, что было в 3 раза выше, чем вес сырой биомассы у штамма 55.2.

Через 3 сут. культивирования в жидкой селективной среде с ионами марганца вес биомассы штамма *B. megaterium* 69.5 увеличился в 3,9 раза по сравнению с первыми сутками культивирования в таких же условиях. Через 7 сут. культивирования прирост биомассы увеличился в 5,5 раза и составил 26,8 г/л. При сравнении роста микробного штамма 55.2 и *B. megaterium* 69.5 через 7 сут. культивирования видно, что прирост биомассы по сырому весу у штамма *B. megaterium* 69.5 был в 4,4 раз выше, чем данный показатель у микробного штамма 55.2.

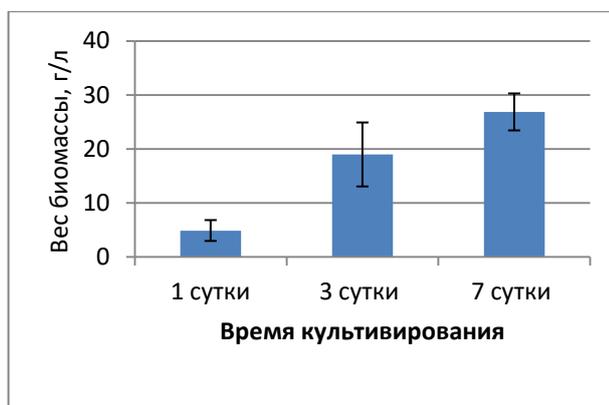


Рисунок 5 – Прирост биомассы по сырому весу у штамма *B. megaterium* 69.5, культивируемого в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II)

Тенденция активного роста *B. megaterium* 69.5 в течение 7 сут. сохранялась, но увеличение абсолютного прироста биомассы было не таким выраженным. Оптическая плотность через сутки культивирования *B. megaterium* 69.5 увеличилась в 1,57 раза относительно исходной посевной дозы, которая была равна 1 ед. (рисунок 6).



Рисунок 6 – Абсолютный прирост биомассы у штамма *V. megaterium* 69.5, культивируемого в селективной среде, содержащей 2 ммоль/л Mn (II)

Через 3 сут. культивирования оптическая плотность культуральной среды увеличилась в 2,55 раза. Через 7 сут. роста микроорганизма оптическая плотность культуральной среды возросла в 4 раза.

Результаты оценки убыли марганца (II) в жидкой селективной среде при культивировании изучаемых нами микроорганизмов представлены на рисунке 7. Согласно полученным результатам убыль марганца (II) в среде составила около 20 % через трое сут. культивирования двух исследуемых нами микробных штаммов. Через неделю культивирования данный показатель существенно увеличился. Убыль металла в среде, в которой культивировался штамм 55.2, составила 66 % относительно абиотического контроля. Убыль марганца (II) при культивировании *V. megaterium* 69.5 составила 50 %.

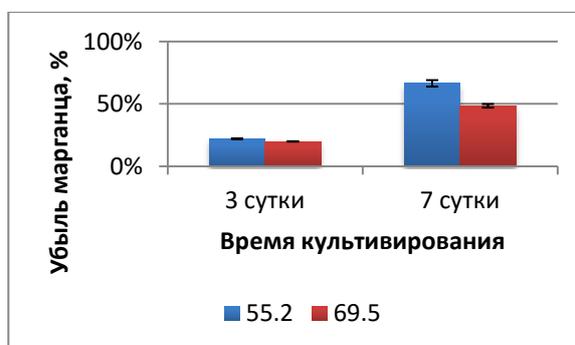


Рисунок 7 – Убыль марганца (II) при культивировании исследованных микроорганизмов

После проведенных нами исследований прироста биомассы бактерий и расчёта по весовому и фотометрическому методам нами была рассчитана удельная скорость роста  $\mu$ , по каждому из данных методов.

Удельные скорости роста бактериальных культур рассчитывались по данным концентрации биомассы по формуле:

$$\mu = \frac{\ln X_1 - \ln X_2}{T_1 - T_0},$$

где  $X_1$  и  $X_2$  – значения биомассы, соответствующие времени роста  $T_0$  и  $T_1$ .

Результаты расчётов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Удельные скорости роста исследованных микроорганизмов

Микроорганизмы	Скорость роста, усл. ед./ч, по результатам метода:			
	Весового		Фотометрического	
	3 сут.	7 сут.	3 сут.	7 сут.
Штамм 55.2	0,0219	0,0110	0,0066	0,0043
<i>B. megaterium</i> 69.5	0,0467	0,0196	0,0148	0,0082

Основываясь на полученных данных, мы видим, что при весовом методе оценивания удельная скорость роста микробного штамма *B. megaterium* 69.5 примерно в 2 раза выше, чем у штамма 55.2 через трое сут. культивирования. По данным фотометрического метода видно, что удельная скорость роста микробного штамма *B. megaterium* 69.5 в 2,2 раза выше, чем у штамма 55.2 через трое сут. культивирования. Через 7 сут. культивирования удельная скорость роста микробного штамма *B. megaterium* 69.5 выше, чем у штамма 55.2 в 1,8 раза (по данным весового метода) и в 1,9 раза (согласно фотометрическому анализу).

**Заключение:** Проведённые нами скрининговые исследования помогли выявить два штамма микроорганизмов, показавшие наибольшую устойчивость к воздействию ионов марганца в среде, это штамм 55.2 и *B. megaterium* 69.5. Также данные микроорганизмы показали высокие

показатели удельной скорости роста, прироста биомассы и процентной убыли  $Mn^{2+}$  из водной среды. Основываясь на полученных данных, мы можем говорить о перспективах использования изученных марганецоксилирующих микроорганизмов в биотехнологии очистки сточных вод от избыточного содержания в ней ТМ.

**Выводы:** 1. Показано, что 9 из 11 исследованных микробных штаммов, изолированных из высокомагнитной почвы, проявили высокую устойчивость к ионам марганца (II) при культивировании на плотной среде. Максимальная устойчивость к Mn (II) обнаружена у микробных штаммов 55.2 и *V. megaterium* 69.5. МТК Mn (II) для данных микроорганизмов составила 300,0 и 350,0 ммоль/л, МИК – 350,0 и 450,0 ммоль/л соответственно.

2. Продемонстрирована высокая резистентность микробных штаммов 55.2 и *V. megaterium* 69.5 к диапазону концентраций Mn (II): от 0,5 до 250,0 ммоль/л при их культивировании в питательной и селективной жидкой среде. Максимальный рост обоих штаммов наблюдался при концентрации марганца в среде культивирования 10 ммоль/л.

3. Вес биомассы штамма 55.2 через 3 сут. культивирования в жидкой среде с 2 ммоль/л Mn (II) увеличился в 2,4 раза, у *V. megaterium* 69.5 – в 3,9 раза; через 7 сут. культивирования у штамма 55.2 вес биомассы увеличился в 3,7 раза, у *V. megaterium* 69.5 – в 5,5 раза по сравнению с показателями через 1 сут. Оптическая плотность культуральной среды штамма 55.2 через 3 сут. культивирования увеличилась в 1,6 раза, у *V. megaterium* 69.5 – в 2,6 раза; через 7 сут. культивирования у штамма 55.2 оптическая плотность культуральной среды увеличилась в 2 раза, у *V. megaterium* 69.5 – в 4 раза по сравнению с показателями через 1 сут.

4. Обнаружено, что показатели роста у *V. megaterium* 69.5 выше, чем у микробного штамма 55.2. Через 7 сут. культивирования в среде с 2 ммоль/л Mn (II) прирост биомассы по сырому весу у *V. megaterium* 69.5 был в 4,4 раза выше, оптическая плотность культуральной среды и удельная скорость роста примерно в 2 раза выше, чем данные показатели у микробного штамма 55.2.

5. Установлено, что исследованные микробные штаммы: 55.2 и *B. megaterium* 69.5 снижали содержание Mn (II) в среде культивирования на 66 и 50 % за 7 суток. Выявлена сильная обратная зависимость между убылью марганца из среды и приростом биомассы по сырому весу: у штамма 55.2 ( $r=-0,9426$ , при  $p=0,00004$ ), у *B. megaterium* 69.5 ( $r=-0,8916$ , при  $p=0,0005$ ); между убылью марганца из среды и абсолютным приростом биомассы: у штамма 55.2 ( $r=0,9633$ , при  $p=0,000008$ ), у *B. megaterium* 69.5 ( $r=-0,9518$ , при  $p=0,00002$ ).

#### Список использованных источников

- 1 Wang, J.L.; Chen, C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review / J.L. Wang, C. Chen // *Biotechnol. Adv.* – 2006. – V. 24. – P. 427–451.
- 2 Микробиологическая и биохимическая индикация почв города Медногорска / Е. В. Плешакова [и др.] // *Агрохимия*. – 2016. – № 1. – С. 66-73.
- 3 Evaluation of the ecological potential of microorganisms for purifying water with high iron content / E. V. Pleshakova [et al.] // *Water*. – 2021. – V. 13: Article ID 901.
- 4 Assessment of heavy metal pollution from a Fe-smelting plant in urban river sediments using environmental magnetic and geochemical methods / C. Zhang [et al.] // *Environ. Pollut.* – 2011. – V. 159. – P. 3057-3070.
- 5 ГОСТ 4974-2014. Вода питьевая. Определение содержания марганца фотометрическими методами. – Москва: Стандартинформ, 2015. – 23 с.

