

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**БИОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ
УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ПОЧВ Г. ПОКАЧИ**

Автореферат бакалаврской работы

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Сескутовой Екатерины Алексеевны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:

д.б.н., доцент

Д. В. Уткин

Саратов 2026

Введение. В процессе строительства и эксплуатации нефтяных скважин, а также транспортировки углеводородного сырья, происходит загрязнение окружающей среды [1]. Наибольшее воздействие испытывает почва, которая накапливает углеводороды, изменяющие ее физико – химические свойства и подавляющие ее биологическую активность [2]. Стремясь к созданию эффективных с точки зрения экологии и экономики способов очистки почв от нефтяных загрязнений, особое внимание следует уделить биотехнологическим методам. К ним относится биоремедиация, в которой используется потенциал углеводородоокисляющих микроорганизмов для утилизации углеводородов нефти в качестве питательного субстрата или для их трансформации в менее опасные соединения [3].

В обзорной части работы систематизированы сведения о биологии и систематике углеводородоокисляющих бактерий, их механизмах адаптации к углеводородным загрязнениям и биологических препаратах для очистки почв от токсичного воздействия углеводородов. Анализ показывает, что универсальные механизмы (специфический комплекс ферментов, усваивание гидрофобных соединений, продукция биоэмульгаторов и наличие миколовых кислот в клеточной стенке) позволяют углеводородоокисляющим бактериям утилизировать сложные углеводородные соединения, адаптироваться к неблагоприятным условиям среды и активно участвовать в биоремедиационных мероприятиях.

В экспериментальной части были смоделированы условия для изучения субстратного спектра углеводородоокисляющих бактерий, исследования влияния абиотических факторов на их рост, выявления антагонистической активности по отношению к патогенным микромицетам, антибиотикорезистентности, факторов патогенности и способности к образованию биопленок. Полученные результаты расширяют представление о углеводородоокисляющих бактериях как перспективных агентов для борьбы с углеводородными загрязнениями.

Целью данного исследования стало определение биоремедиационного потенциала углеводородокисляющих бактерий, выделенных из проб почв г. Покачи.

Для реализации указанной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Выделить и провести количественный учет углеводородокисляющих бактерий почв г. Покачи.
2. Установить видовую принадлежность выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий.
3. Изучить биологические свойства углеводородокисляющих бактерий.
4. Оценить перспективы применения выделенных штаммов бактерий для биоремедиации загрязненных территорий г. Покачи.

Структура и объем работы. Работа изложена на 56 страницах машинописного текста и включает 7 разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, заключение, выводы и список использованных источников, содержащий 38 наименований.

Научная новизна и значимость работы. 1. Впервые проведён комплексный скрининг углеводородокисляющих бактерий (УОБ) антропогенно нарушенных почв г. Покачи (Ханты – Мансийский автономный округ), охарактеризовано их таксономическое разнообразие, включающее 4 рода *Bacillus*, *Microbacterium*, *Stenotrophomonas* и *Micrococcus*.

2. Впервые для изолятов из почв г. Покачи установлены количественные диапазоны толерантности к абиотическим стрессорам (температура 10, 43 °С, рН 7, 10, NaCl до 10 %).

3. Впервые проведена сопряжённая оценка субстратного спектра (углеводы, источники азота, индивидуальные углеводороды, сырая нефть), антибиотикочувствительности, факторов зоо – и фитопатогенности и биоплёнкообразования УОБ, выделенных из почв промышленного города, что позволило выявить штаммы с оптимальным балансом деструктивной активности и биобезопасности.

4. Выделенные штаммы – нефтеструкторы (*B. amyloliquefaciens*) могут быть непосредственно использованы в качестве активных агентов для приготовления лабораторных и опытно – промышленных образцов биопрепаратов, направленных на очистку почв от углеводородного загрязнения.

5. Полученные количественные диапазоны толерантности УОБ к температуре, рН и засолению позволяют прогнозировать эффективность работы штаммов в конкретных почвенно – климатических условиях и обоснованно подбирать штаммы – кандидаты для биоремедиации техногенно трансформированных территорий с различными уровнями концентрации ионов водорода и NaCl.

6. Установленная чувствительность штаммов к антибиотикам даёт возможность использовать эти культуры как биобезопасные при их интродукции в окружающую среду, снижая риск горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности.

Основное содержание работы. В обзоре литературы представлены понятия о биологии и систематике углеводородокисляющих микроорганизмах, их механизмы адаптации к условиям нефтяного загрязнения и участие в биологических препаратах по очистке почв от углеводородов. Представлены наиболее значимые представители (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Acinetobacter*, *Microbacterium* и др.) известные своими способностями к разложению углеводородов, включая компоненты нефти, которые имеют высокую метаболическую гибкость и могут использовать широкий спектр углеводов в качестве источника энергии. Разобраны основные механизмы адаптации и разложения сложных токсичных соединений, а также ключевые преимущества биоремедиационных технологий.

Материалы и методы. Объектом исследования стали антропогенно нарушенные почвы, отобранные в черте г. Покачи, Ханты – Мансийском автономном округе. Для выделения углеводородокисляющих бактерий 0,1 мл

почвенной суспензии высевали на плотную питательную среду М9, в которой в качестве единственного источника углерода присутствовало вазелиновое масло.

Идентификацию выделенных углеводородокисляющих микроорганизмов проводили в соответствии с общепринятыми методами по определителю бактерий «Bergey's manual of determinative bacteriology» (2005) [4]. Для повышения достоверности результатов также была применена база данных ABIS и MALDI – ToF масс – спектрометрии.

Определение спектра используемых углеводородокисляющими бактериями субстратов проводили методом посева выделенных микроорганизмов на плотные дифференциально – диагностические питательные среды. В качестве субстратов использовали следующие источники углерода: моносахариды (арабиноза, глюкоза, ксилоза), олигосахариды (лактоза, сахароза), а также полисахарид крахмал.

Для выявления гидролитических ферментов (желатиназы и казеиназы), были применены мясо – пептонный желатин (МПЖ) и молочный агар Эйкмана. Способность к редукции нитратов оценивали на среде ГРМ – бульон с добавлением 0,2 % нитрата калия.

Способность микроорганизмов использовать для роста нефть и нефтепродукты определяли с помощью чашечного метода Мак – Кланга [5].

Для изучения способности углеводородокисляющих бактерий расти при различных абиотических условиях были использованы среды с заданными параметрами pH (5, 6, 9, 10), концентрацией соли (5, 7 и 10 %) и температурой (10, 43 °C). Посев исследуемых культур проводили методом штриха или укола, с последующей инкубацией [6].

При определении антагонистической активности бактерий по отношению к грибам использовали метод перпендикулярных штрихов в модификации Ю. Курочкиной.

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли диско – диффузионным методом. На поверхность агара Мюллера – Хинтона (Оболенск,

Россия) наносили 1 мл бактериальной суточной культуры в концентрации $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл, затем распределяли по поверхности. Пинцетом вносили диски с антибиотиками и располагали их на равном расстоянии друг от друга и на расстоянии 2 см от края чашки Петри. После инкубации, которую проводили в термостате при температуре $+28$ °С в течении 3 суток, сравнивали зоны ингибирования микроорганизмов [7].

Выявление фитопатогенных свойств проводили посредством определения мацерирующей активности по стандартной методике. Тест-объекты промывали и высушивали, поверхность тканей стерилизовали 96 % этанолом и вырезали диски диаметром 1 см и толщиной 0,5 см из корнеплодов моркови и свёклы, клубня картофеля, листьев капусты и плодов томата. Диски размещали в чашках Петри на смоченной физиологическим раствором фильтровальной бумаге и засеивали суточными культурами исследуемых бактериальных штаммов. Чашки инкубировали в термостате при 28 °С в течение 1–3 суток, после чего оценивали степень мацерации. Наличие или отсутствие мацерации определяли визуально при прикосновении к дискам бактериологической петлей [8].

Для оценки патогенности бактериальных штаммов по отношению к животным проводили выявление их гемолитической, плазмокоагуляционной, лецитиназной и желатиназной активности. Способность разрушать клетки крови определяли путем посева культур на кровяной агар (ГРМ – агар с добавлением 5 % стерильной дефибринированной крови) с последующей инкубацией при 36 °С в течение суток. Для выявления фермента плазмокоагулазы проводили инкубационный тест с использованием суточных культур бактерий и плазмы крови. Наличие ферментов лецитиназы и желатиназы определяли на желточном ГРМ – агаре (ГРМ – агар с добавлением яичного желтка) и на ГРМ – бульоне с добавлением 12 % желатины [9].

Для получения биопленок выделенных углеводородокисляющих бактерий использовали культуральные планшеты [10].

Результаты исследования. На первом этапе работы стояла задача определить количественные показатели углеводородокисляющих бактерий в антропогенно нарушенных почвах на территории г. Покачи. Высокие показатели численности углеводородокисляющих бактерий были выявлены в пробах 10, 13 и 21, которые были отобраны на территории многоэтажных и общественных зданиях, а также усадебных застройках. Минимальные значения наблюдались в пробах 14 и 20 в лесных массивах. Из образцов почв, отобранных в черте г. Покачи, выделено и идентифицировано 7 видов культивируемых углеводородокисляющих бактерий. Выявленный микробный комплекс включал грамположительные спорообразующие палочки *Bacillus. alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, грамположительную неспорообразующую палочку *Microbacterium. maritypicum*, грамположительные кокки *Micrococcus. aloeverae*.

Наибольшее количество выделенных бактерий принадлежала к роду *Bacillus* (57 %), остальные – к роду *Microbacterium* (15 %), *Stenotrophomonas* (14 %) и *Micrococcus* (14 %).

В результате анализа в почвенных образцах были выявлены максимальные численные показатели для видов *B. pumilus* и *B. alcalophilus*, достигающие 8,3 и 7,0 IgКОЕ/г. Количество бактерий *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *M. aloeverae* и *S. maltophilia* составляло около 6,8 IgКОЕ/г. Минимальные показатели были зафиксированы для *M. maritypicum* (6,1 IgКОЕ/г). Наибольшим процентом индекса встречаемости в пробах почв обладал вид *B. pumilus*, составивший 25 %, наименьшие показатели имели виды *M. maritypicum* и *S. maltophilia* (4,17 %).

Гликолитическая активность (глюкоза, сахароза, арабиноза) обнаружена у штаммов *B. amyloliquefaciens* ВА02, *B. pumilus* ВР24 и *M. maritypicum* ММ24.

В ходе серии экспериментов было выявлено, что штаммы *B. thuringiensis* ВТ04 и *M. maritypicum* ММ24 продемонстрировали

способность к разложению желатина, казеина и фиксации свободного азота. Ни один из исследованных штаммов не обладал способностью к редукции нитратов. Желатин были способны использовать все исследуемые штаммы углеводородокисляющих бактерий.

Максимальная эффективность окисления углеводов зафиксирована для штаммов *B. amyloliquefaciens* BA02, *B. thuringiensis* BT04, *M. aloeverae* ML08 и *S. maltophilia* SM01.

Высокой толерантностью к экстремальным абиотическим факторам обладали штаммы *B. amyloliquefaciens* BA02 и *B. pumilus* BP24, которые сохраняли жизнеспособность при температурах 10 и 43 °С, значениях pH от 5 до 10, концентрации хлорида натрия в среде до 10 %.

Штамм *B. amyloliquefaciens* BA02 проявил наибольшую антагонистическую активность по отношению к микромицетам, за исключением *P. varotii*.

Далее был проведён эксперимент, направленный на оценку устойчивости выделенных штаммов бактерий к ряду антибиотиков. В результате опыта было установлено, что наиболее чувствительным штаммом был *B. pumilus* BP24.

Результаты экспериментов по выявлению факторов фитопатогенности показали, что штаммы *B. alcalophilus* BA10, *B. amyloliquefaciens* BA02, *B. pumilus* BP24 и *M. aloeverae* ML08 обладали наименьшим процентом мацерирующей активности.

Гемолитическая и лецитиназная активности не выявлены ни у одного из исследованных штаммов. Плазмокоагулазная активность отсутствовала у всех культур, за исключением *B. alcalophilus* BA10 и *B. pumilus* BP24. Все выделенные штаммы углеводородокисляющих бактерий были способны к гидролизу желатин.

Результаты исследования на образование биопленок показали, что максимальная продукция среди всех исследуемых штаммов была выявлена у

M. maritypicum MM24, что соответствует умеренному значению биопленкообразования.

Выводы. Анализ полученных результатов в данной работе позволяет сделать следующие выводы.

1. Из образцов почв, отобранных в черте г. Покачи, выделено и идентифицировано 7 видов культивируемых углеводородокисляющих бактерий. Выявленный микробный комплекс включал грамположительные спорообразующие палочки *B. alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, грамположительную неспорообразующую палочку *M. maritypicum*, грамположительные кокки *M. aloeverae*.

2. Наибольшая численность отмечена для видов *B. pumilus* и *B. alcalophilus* – 8,3 и 7,0 lg КОЕ/г соответственно. Умеренные количественные показатели (порядка 6,8 lg КОЕ/г) зафиксированы для штаммов *B. amyloliquefaciens*, *B. thuringiensis*, *M. aloeverae* и *S. maltophilia*, минимальное значение (6,1 lg КОЕ/г) – для *M. maritypicum*.

3. Гликолитическая активность (глюкоза, сахароза, арабиноза) обнаружена у штаммов *B. amyloliquefaciens* BA02, *B. pumilus* BP24 и *M. maritypicum* MM24. Протеолитическая и diazotрофная способности свойственны *B. thuringiensis* BT04 и *M. maritypicum* MM24. Максимальная эффективность окисления углеводов зафиксирована для штаммов *B. amyloliquefaciens* BA02, *B. thuringiensis* BT04, *M. aloeverae* ML08 и *S. maltophilia* SM01.

4. Высокой толерантностью к экстремальным абиотическим факторам обладали штаммы *B. amyloliquefaciens* BA02 и *B. pumilus* BP24, которые сохраняли жизнеспособность при температурах 10 и 43 °С, значениях pH от 5 до 10, концентрации хлорида натрия в среде до 10 %. Высокую антагонистическую активность по отношению ко всем исследуемым микромицетам, за исключением *P. varotii*, проявил штамм *B. amyloliquefaciens* BA02.

5. Наибольшую чувствительность к антибактериальным препаратам продемонстрировал штамм *B. pumilus* ВР24. Минимальная мацерирующая активность зафиксирована у штаммов *B. alcalophilus* ВА10, *B. amyloliquefaciens* ВА02, *B. pumilus* ВР24 и *M. aloeverae* ML08. Гемолитическая и лецитиназная активности не выявлены ни у одного из исследованных штаммов. Плазмокоагулазная активность отсутствовала у всех культур, за исключением *B. alcalophilus* ВА10 и *B. pumilus* ВР24.

6. Максимальная продукция биопленок среди всей коллекции штаммов отмечена у *M. maritypicum* ММ24 и соответствует умеренному уровню.

Штамм *B. amyloliquefaciens* ВА02, выделенный из почв г. Покачи, характеризуется умеренной численностью (6,8 lg КОЕ/г), широкой гликолитической и максимальной углеводородокисляющей активностью, высокой политолерантностью к температурным, рН – и солевым стрессорам, выраженным антагонизмом в отношении большинства тестируемых микромицетов. Профиль биобезопасности штамма (отсутствие гемолитической, лецитиназной и плазмокоагулазной активностей при минимальной мацерирующей активности) свидетельствует о его потенциальной пригодности для биотехнологического применения в целях биоремедиации и биоконтроля.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Союзина, И. Д. Микробиологическая ремедиация нефтезагрязненных почв / И. Д. Союзина, А. С. Данилов // Записки горного института. – 2023. – Т. 260, № 1. – С. 297 – 312.
- 2 Перспективные штаммы псевдомонад, окисляющих углеводороды, с устойчивостью к гербицидам и свойствами, стимулирующими рост растений, для биоремедиации загрязненных нефтью сельскохозяйственных почв / Т. Коршунова [и др.] // Сельское хозяйство. – 2023. – Т. 13, № 6. – С. 1109 – 1111.
- 3 Перспективы использования консорциумов микроорганизмов и высших растений в восстановлении нефтезагрязненных земель / И. Л. Бухарина [и др.] // Лесной вестник. – 2022. – Т. 26, № 6. – С. 14 – 23.
- 4 Brenner, D. J. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology : Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha -, Beta -, Delta -, and Epsilonproteobacteria / D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley. – 2nd ed. – New York : Springer, 2005. – 1388 p.
- 5 Беляков, А. Ю. Скрининг микроорганизмов – деструкторов компонентов буровых растворов / А. Ю. Беляков, Е. В. Плешакова // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. – 2013. – Т. 13, Вып. 1. – С. 34 – 42.
- 6 Аветов, Н. А. Загрязнение нефтью почв таежной зоны Западной Сибири / Н. А. Аветов, Е. А. Шишконокова // Бюллетень Почвенного института им. В. В. Докучаева. – 2011. – № 68. – С. 44 – 55.
- 7 Шепелин, А. П. Диско – диффузионный метод для определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам / А. П. Шепелин, Л. В. Домотенко // Поликлиника. – 2019. – № 4. – С. 2 – 5.
- 8 Оценка ферментативной активности и способности к мацерации бактерий *Bacillus velezensis* / Д. Л. Басалаева [и др.] // Экобиотех 2021: сборник научных трудов. – Уфа, 2021. – С. 8 – 11.

9 Егоров, Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Практическое пособие / Н. С. Егоров – М.: Московский государственный университет, 1983. – 251 с.

10 Марданова, А. М. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования / А. М. Марданова, Д. А. Кабанов. – Казань: К(П)ФУ, 2016. – 42 с.