

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
САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

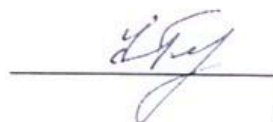
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Нестеркиной Дарьи Дмитриевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук



Е. В. Глинская

04.06.2026

Зав. кафедрой:

д-р биол. наук, доцент



Д. В. Уткин

04.06.2026

Саратов 2026

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Почва – центральное звено биосистемы, связующее биоту с литосферой, гидросферой и атмосферой. Микроорганизмы обеспечивают круговорот элементов, поддерживая химический состав атмосферы и органическое вещество почвы, что формирует её плодородие и защищает от антропогенных воздействий.

Возрастающая антропогенная нагрузка, особенно нефтяное загрязнение, угнетает защитные функции почвенного микробиома: изменяется структура микробного сообщества, нарушается круговорот элементов и снижается гумусообразование [1]. В связи с этим одной из ключевых задач микробиологии является исследование микробиологической активности почв, подвергшихся антропогенному воздействию.

Особую актуальность приобретает изучение бактерий, которые способны окислять углеводороды. Именно эти бактерии играют значительную роль в процессе биоремедиации и помогают восстановить природные экосистемы [2]. Таким образом, выделение и оценка биоремедиационного потенциала штаммов-деструкторов из антропогенно-нарушенных почв являются не только фундаментально значимым, но и практически востребованным направлением для разработки эффективных и экологически безопасных методов очистки загрязненных почв.

На основе аборигенных штаммов углеводородокисляющих бактерий Саратовской области возможно создание биопрепарата, направленного на проведение эффективных реабилитационных мероприятий нефтезагрязненных почв.

Цель и задачи исследования.

Цель работы – сравнительный анализ биоремедиационного потенциала аборигенных углеводородокисляющих бактерий (УОБ), выделенных из почв с разным уровнем антропогенной нагрузки.

Для реализации указанной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Выделить и провести количественный учет почвенных углеводородокисляющих бактерий.
2. Выявить видовой состав углеводородокисляющих бактерий.
3. Изучить субстратный спектр выделенных углеводородокисляющих бактерий.
4. Определить толерантность выделенных углеводородокисляющих бактерий к физико-химическим факторам.
5. Выявить чувствительность углеводородокисляющих бактерий к антибиотикам.
6. Исследовать факторы патогенности углеводородокисляющих бактерий.
7. Изучить способность выделенных штаммов к образованию биопленок.

Материал и методы исследования

Объектом исследования послужили пробы почв, отобранные с участков Саратовской области, среди них пробы, взятые в окрестностях антропогенно-нарушенных территорий пгт. Духовницкое, а также пробы нефтезагрязненной почвы, отобранные в 5,7 км к северо-западу от с. Новокривовка.

Численность гетеротрофных и углеводородокисляющих почвенных микроорганизмов определяли методом последовательных разведений с высевом на плотные среды. Гетеротрофы культивировали на ГРМ-агаре, углеводородокисляющие – на средах М9 и Бушнелла-Хааса с вазелиновым маслом в качестве единственного источника углерода [3].

Видовую принадлежность бактерий устанавливали по фенотипическим признакам (Bergey's Manual, 2006) с последующим контролем методом MALDI-ToF масс-спектрометрии (microflex, Bruker Daltonics) [4, 5].

Спектр субстратов оценивали по росту на дифференциально-диагностических средах: сахаролитическую активность – на среде Гисса, гидролиз крахмала – на ГРМ-агаре с 1 % крахмала, гидролиз желатины – посевом в мясопептонную желатину (12 %), азотфиксацию – на среде Эшби, редукцию нитратов – на нитратном бульоне (ГРМ + 0,1 % KNO_3) [6].

Для исследования углеводородокисляющей активности использовали сырую нефть и индивидуальные углеводороды: *n*-алканы (гексан, гептан, октан, декан, гексадекан) и ароматические (бензол, толуол, фенол, нафтол, нафталин). Деградацию нефти бактериями определяли чашечным методом Мак-Кланга.

Толерантность углеводородокисляющих бактерий оценивали при температурах +6 °С и +43 °С, значениях рН 5, 7 и 9, а также при концентрациях NaCl 1, 5, 7, 10 и 15 % [7].

Чувствительность бактерий к антибиотикам определяли диско-диффузионным методом [8].

Выявление фитопатогенных свойств проводили путем теста на мацерацию [9]. Для оценки патогенности бактериальных штаммов по отношению к животным проводили тесты на выявление гемолитической, плазмокоагуляционной, лецитиназной, желатиназной и ДНКазной активности [10].

Биопленки углеводородокисляющих бактерий получали по стандартной методике в планшетах при культивировании в бульоне [5].

Структура и объем работы. Работа, изложенная на 81 странице, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Исследование проиллюстрировано 36 рисунками и содержит 14 таблиц. Список использованных источников включает 71 наименование.

Научная новизна. Проведён микробиологический мониторинг антропогенно-нарушенных почв на территории Саратовской области, которые различаются по типу техногенной нагрузки: острое нефтяное загрязнение в с. Новокривовка (аварийный порыв нефтепровода) и загрязнение, характерное

для условий населённого пункта – пгт. Духовницкое. Осуществлён скрининг углеводородокисляющих бактерий, выделенных из образцов почв, отобранных в окрестностях пгт. Духовницкое и из нефтезагрязненной почвы с. Новокривовка. Впервые для указанных районов Саратовской области показан биоремедиационный потенциал выделенных аборигенных углеводородокисляющих бактерий, что обосновывает их перспективность в качестве эффективных агентов для очистки нефтезагрязненных почв региона.

Научная значимость. Проведённое комплексное исследование биологических свойств аборигенных штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв Саратовской области, открывает перспективы использования этих микроорганизмов в качестве основы для создания биопрепарата, направленного на эффективную реабилитацию нефтезагрязнённых почв. Широкий спектр субстратной специфичности и высокая адаптационная пластичность исследованных штаммов позволяют внедрять их в биотехнологические процессы очистки окружающей среды от углеводородных загрязнений.

Положения, выносимые на защиту.

1. Видовой состав углеводородокисляющих бактерий в почвах пгт. Духовницкое представлен 8 видами: *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halophilus*, *B. halodurans*, *B. mycoides*, *B. niacini*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces badius*; в нефтезагрязнённых почвах с. Новокривовка – 7 видами: *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. muralis*, *B. pumilus*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *P. polymyxa*, *Citrobacter freundii*.

2. Численность углеводородокисляющих бактерий в почвах пгт. Духовницкое варьирует от 1,1 до 7,2 lg КОЕ/г, в образцах с. Новокривовка – от 4,2 до 5,8 lg КОЕ/г.

3. Способностью к деградации всех исследованных углеводов и нефти обладают штаммы *B. amyloliquefaciens* 21, *B. clausii* 3, *B. clausii* 13, *B. clausii* 16, *B. mycoides* 40, *B. mycoides* 45a, *B. niacini* 20, *S. badius* 2 (пгт. Духовницкое), *P. polymуха* 6 (с. Новокривовка).

4. Толерантны к физико-химическим факторам штаммы *B. clausii* 16, *B. mycoides* 45a, *P. polymуха* 6 (пгт. Духовницкое), *C. freundii* 7 (с. Новокривовка). Чувствительны к антибиотикам: *B. clausii* 3, *S. badius* 2 и 25 (пгт. Духовницкое), *C. freundii* 7 (с. Новокривовка). Отсутствует способность к мацерации растительных тканей у штаммов *B. clausii* 13, *B. mycoides* 40, *S. badius* 25 (пгт. Духовницкое), *B. licheniformis* 2, *B. pumilus* 4, *P. glucanolyticus* 3 (с. Новокривовка). Минимальный набор факторов патогенности – у *B. halodurans* 30 (пгт. Духовницкое) и *B. circulans* 1 (с. Новокривовка). Максимальное образование биоплёнок при 37 °С (пгт. Духовницкое), при 28 °С (с. Новокривовка).

Основное содержание работы

В разделе «Антропогенное загрязнение почв, естественное самоочищение и биоремедиационные технологии» представлен анализ литературных данных о влиянии тяжёлых металлов, нефтепродуктов и пестицидов на численность, видовой состав и метаболическую активность почвенных микробных сообществ. Описаны естественные механизмы самоочищения почв (микробная деградация, гидролиз, окисление, фотолиз, выщелачивание) и методы биоремедиации (*ex situ*, *in situ*, *on site*) с анализом их преимуществ и условий эффективного применения.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты исследований, в ходе которых была определена численность гетеротрофных и углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв пгт. Духовницкое и с. Новокривовка.

Анализ показал, что численность гетеротрофных бактерий в почвах пгт. Духовницкое была максимальна в зонах активного поступления легкодоступного органического субстрата при отсутствии сильного токсического воздействия (зелёная зона, пустошь, участки у частных домов, сельхоззона, кладбище) и минимальна на природной территории с низкой антропогенной нагрузкой.

Микромицеты преобладали на участке выпаса скота, были наименее многочисленны на сельхозугодьях и на территории жилой застройки.

Углекислородфиксирующие бактерии достигали максимума в зонах активного хозяйственного использования (административная, придомовая, парк) и минимума – среди жилых построек без озеленения.

Представлены результаты исследований, в ходе которых была определена численность различных физиологических групп бактерий, выделенных из почв с хроническим нефтяным загрязнением с. Новокривовка.

Количественные показатели микроорганизмов разных физиологических групп в чистых и нефтезагрязненных образцах почв различались. В почвах, загрязненных нефтью, общее число гетеротрофных бактерий уменьшилось по сравнению с контрольными образцами. В загрязненных вариантах отмечали увеличение количества углекислородфиксирующих бактерий.

Была проведена работа по определению таксономического положения изолятов. Из почв пгт. Духовницкое выделено 8 видов углекислородфиксирующих бактерий: *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halophilus*, *B. halodurans*, *B. mycoides*, *B. niacini*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces badius*. Из почв с. Новокривовка выделено 7 видов: *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. muralis*, *B. pumilus*, *P. glucanolyticus*, *P. polymyxa*, *C. freundii*.

Максимальный индекс встречаемости среди проб пгт. Духовницкое отмечали для вида *S. badius*. Наибольшая численность зафиксирована для вида *B. halophilus*, наименьшая – для видов *S. badius* и *B. clausii*.

Среди проб с. Новокривовка максимальный индекс встречаемости зафиксирован для изолята *B. muralis*, наибольшая численность – для вида *B. circulans*, наименьшая – для *B. licheniformis*.

Представлены данные о вариабельности пищевых субстратов. Наибольшую сахаролитическую активность проявили *B. clausii* 16, *B. niacini* 20, *B. thuringiensis* 50, *B. amyloliquefaciens* 21, *S. badius* 2 (пгт. Духовницкое), *B. licheniformis* 2, *B. muralis* 3, *B. pumilus* 4, *P. polymуха* 6 и *C. freundii* 7 (с. Новокривовка). Все штаммы, за исключением *B. halodurans* 30 (пгт. Духовницкое), использовали широкий спектр источников азота. Способностью к деградации всех исследованных углеводов и нефти обладали штаммы *B. amyloliquefaciens* 21, *B. clausii* 3, *B. clausii* 13, *B. clausii* 16, *B. mycoides* 40, *B. mycoides* 45а, *B. niacini* 20, *S. badius* 2 (пгт. Духовницкое), *P. polymуха* 6 (с. Новокривовка).

Наиболее толерантными к абиотическим факторам были штаммы *B. clausii* 16, *B. mycoides* 45а (пгт. Духовницкое), *B. polymуха* 6 и *C. freundii* 7 (с. Новокривовка).

Чувствительными штаммами к антибиотикам были *B. clausii* 3, *S. badius* 2 и *S. badius* 25 (пгт. Духовницкое) – рост этих штаммов полностью подавляли все тестированные препараты. Также высокую чувствительность проявил штамм *C. freundii* 7 (с. Новокривовка): его рост подавляли 81 % препаратов.

Представлены результаты экспериментов по выявлению факторов патогенности, которые показали, что не проявляли мацерирующей активности штаммы *B. clausii* 13, *B. mycoides* 40, *S. badius* 25 (пгт. Духовницкое), *B. licheniformis* 2, *B. pumilus* 4, *P. glucanolyticus* 5 (с. Новокривовка). Минимальный набор факторов патогенности зафиксирован у штамма *B. halodurans* 30 (пгт. Духовницкое), *B. circulans* 1 (с. Новокривовка).

Изложены результаты исследования влияния температуры на образование биопленок. Согласно полученным результатам наибольшую продукцию биопленок углеводородокисляющих бактерий почв пгт. Духовницкое

наблюдали при температуре 37 °С, почв с. Новокривовка – при 28 °С. У штаммов *B. amyloliquefaciens* 21, *B. clausii* 16, *B. thuringiensis* 50 наибольшую продукцию зафиксировали в кислой среде, у штаммов *B. clausii* 3, *B. halophilus* 12, *S. badius* 2, *S. badius* 25 – в нейтральной среде, а у *B. halodurans* 30, *B. mycoides* 40, *B. mycoides* 45а, *B. niacini* 20 – в щелочной среде. Для штамма *B. thuringiensis* 50 выявили зависимость от температуры: при 28 и 37 °С оптимум биоплёнкообразования – рН 5, при 6 °С – рН 9 (пгт. Духовницкое). У штаммов *B. circulans* 1, *B. licheniformis* 2, *B. muralis* 3, *B. pumilus* 4, *P. glucanolyticus* 5 в щелочной среде, а у штаммов *C. freundii* 7 и *P. polytuxa* 6 – в нейтральной среде (с. Новокривовка).

ВЫВОДЫ

1. Из почв пгт. Духовницкое выделено 8 видов УОБ: *B. amyloliquefaciens*, *B. clausii*, *B. halophilus*, *B. halodurans*, *B. mycoides*, *B. niacini*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces badius*. Из почв с. Новокривовка выделено 7 видов: *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. muralis*, *B. pumilus*, *P. glucanolyticus*, *P. polymуха*, *C. freundii*.

2. Численность УОБ в почвенных образцах пгт. Духовницкое варьировала в диапазоне от 1,1 до 7,2 lg КОЕ/г почвы, тогда как в образцах с. Новокривовка – от 4,2 до 5,8 lg КОЕ/г почвы.

3. К деградации всех исследованных индивидуальных углеводов и нефти были способны штаммы: *B. amyloliquefaciens* 21, *B. clausii* 3, *B. clausii* 13, *B. clausii* 16, *B. mycoides* 40, *B. mycoides* 45а, *B. niacini* 20, *S. badius* 2 (пгт. Духовницкое), *P. polymуха* 6 (с. Новокривовка).

4. Толерантными к абиотическим факторам среды (температура 43 °С, рН 5 и 9, концентрации NaCl – 10–15 %) являлись штаммы: *B. clausii* 16, *B. mycoides* 45а (пгт. Духовницкое), *P. polymуха* 6, *C. freundii* 7 (с. Новокривовка).

5. Штаммы *B. clausii* 3, *S. badius* 2, *S. badius* 25 (пгт. Духовницкое) были чувствительны к 100 % исследуемых антибиотиков, штамм *C. freundii* 7 (с. Новокривовка) – к 81 % исследуемых антибиотиков.

6. Штаммы *B. clausii* 13, *B. mycoides* 40, *S. badius* 25 (пгт. Духовницкое), *B. licheniformis* 2, *B. pumilus* 4, *P. glucanolyticus* 3 (с. Новокривовка) не обладали способностью к мацерации растительных тканей тест-объектов (0 %). Штаммы *B. halodurans* 30 (пгт. Духовницкое) и *B. circulans* 1 (с. Новокривовка) характеризовались наименьшим набором факторов патогенности (0 и 17 % соответственно).

7. Наибольшую продукцию биопленок УОБ почв пгт. Духовницкое наблюдали при температуре 37 °С, почв с. Новокривовка – при 28 °С.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Куликова, А. Х. Экологические функции почвы / А. Х. Куликова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2007. – Т. 59, № 3. – С. 3–7.
- 2 The biochemical mechanisms of petroleum degradation by bacteria / A. V. Idongesit [et. al.] // International journal of scientific and engineering research. – 2020. – Vol. 11, № 7. – P. 1258–1275.
- 3 Нестеркина, Д. Д. Оценка количественных показателей углеводородокисляющих бактерий, выделенных из антропогенно-изменённых почв с. Духовницкое / Д. Д. Нестеркина // Ломоносов-2025: XXXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. Секция «Почвоведение»: сборник научных трудов. – М.: МАКС Пресс, 2025. – С. 77–78.
- 4 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2/ J. Holt [et. al.]. – New York: Springer, 2006. – 1388 p.
- 5 Голубев, Д. М. Субстратный спектр аборигенных углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв с различным уровнем антропогенного воздействия / Д. М. Голубев [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2025. – Т. 25, № 1. – С. 118–123.
- 6 Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук. – М.: Академия, 2005. 608 с.
- 7 Нестеркина, Д. Д. Эколого-физиологический потенциал аборигенных штаммов углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв с высоким уровнем нефтяного загрязнения / Д. Д. Нестеркина [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2026. – Т. 26, № 1. – С. 90–99.

8 Нестеркина, Д. Д. Анализ антибиотикорезистентности углеводородокисляющих микроорганизмов антропогенно-нарушенных почв / Д. Д. Нестеркина [и др.] // Материалы всероссийской (национальной) научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 110-летию со дня рождения Ивана Сергеевича Кауричева: сборник научных трудов. – Калуга: ИП Якунина В. А., 2024. – С. 282–286.

9 Нестеркина, Д. Д. Оценка мацерирующей активности бактерий, выделенных из почв с хроническим нефтяным загрязнением / Д. Д. Нестеркина [и др.] // I Международная научно-практическая конференция «Прикладные биотехнологии для развития сельского хозяйства и промышленности»: сборник тезисов. – Саратов: ФГБОУ ВО Вавиловский университет, 2024. – 107 с.

10 Ферменты как факторы патогенности углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв с хроническим нефтяным загрязнением / Д. Д. Нестеркина [и др.] // Геоэкология: теория и практика: сборник научных трудов. – М.: РУДН, 2023. – С. 194–196.

