

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. ЛАНГЕПАС**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 2 курса 241 группы

Направления подготовки 06.04.01 Биология

Биологического факультета

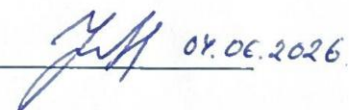
Брызгуна Владислава Евгеньевича

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук


4.08.26

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:
д-р биол. наук, доцент


01.06.2026

Д. В. Уткин

Саратов 2026

Введение

Актуальность темы. Город Лангепас расположен в Ханты-Мансийском автономном округе – Югре (зона средней тайги, правый берег р. Лямин) и является одним из крупнейших центров нефтедобывающей промышленности Западной Сибири. В радиусе 50 км от города находятся крупные месторождения: Лянторское, Покамасовское и Урьевское. Согласно данным экологического мониторинга ООО «Лангепаснефтегаз», на 100 км трубопроводов ежегодно фиксируется до 15 аварийных разливов нефти, что приводит к локальным загрязнениям площадью до 607 тыс. м². Основными загрязнителями выступают сырая нефть и её компоненты – насыщенные углеводороды (гексан, гептан, октан, декан, гексадекан) и ароматические соединения (фенол, бензол, толуол, α-нафтол, нафталин), многие из которых обладают высокой токсичностью и устойчивостью к разложению.

Почвенный покров г. Лангепас представлен подзолистыми (рН 4,5–5,2, гумус 1,5–2,5 %), болотными торфяно-глеевыми (мощность торфа 0,5–3 м) и техногенно-нарушенными почвами на участках нефтедобычи (уплотнение, накопление тяжёлых металлов: свинец до 45 мг/кг, цинк до 120 мг/кг). Согласно данным химического состава, кислотность почв низкая (рН 5,2 для аллювиальных кислых почв), урботехнозёмы характеризуются среднекислой реакцией (4,6–5,0), обеспеченность гумусом – низкая и очень низкая, фосфором – повышенная и высокая, калием – низкая и очень низкая. Регион отличается резко континентальным климатом (средняя температура января –22 °С, июля +17 °С), многолетней мерзлотой островного типа и высокой заболоченностью (до 40 % территории). Эти абиотические факторы – низкие температуры, избыточное увлажнение, кислая среда – резко замедляют естественные процессы самоочищения почв: скорость микробиологической деградаци углеводородов в криолитозоне в 5–10 раз ниже, чем в умеренном климате.

В сложившихся условиях традиционные методы рекультивации (механическое удаление загрязнённого слоя, сжигание, химическое окисление)

часто малоэффективны, дорогостоящи и могут наносить дополнительный ущерб экосистемам. Наиболее перспективным и экологически безопасным подходом является биоремедиация с использованием аборигенных углеводородокисляющих бактерий (УОБ), которые обладают природной способностью утилизировать нефтяные загрязнители до нетоксичных продуктов (CO_2 и H_2O). Однако эффективность биоремедиации в суровых условиях севера напрямую зависит от применения штаммов, адаптированных к местным климатическим и почвенным условиям.

Несмотря на очевидную актуальность, биоремедиационный потенциал УОБ, выделенных непосредственно из антропогенно нарушенных почв г. Лангепас, ранее комплексно не изучался. Отсутствуют данные о видовом составе культивируемых форм, их численности и встречаемости, способности утилизировать широкий спектр углеводов (включая ароматические и высокомолекулярные насыщенные соединения), а также о таких значимых для практического применения свойствах, как антибиотикорезистентность, фито- и зоопатогенность, способность к образованию биоплёнок. Без этих сведений невозможно создание безопасных и эффективных биопрепаратов для восстановления нефтезагрязнённых земель в регионе.

Цель работы. Оценка биоремедиационного потенциала углеводородокисляющих бактерий, выделенных из антропогенно нарушенных почв г. Лангепас.

Задачи:

1. Провести сравнительный анализ численности бактерий и микромицетов в пробах почв.
2. Определить видовой состав и экологические показатели УОБ.
3. Исследовать биологические свойства УОБ.

Материал и методы исследования. Образцы почвы (20 проб) отобраны на территории г. Лангепас. Выделение микроорганизмов проводили на средах ГРМ-агар, Сабуро и М9 с нефтью/углеводородами. Идентификацию бактерий

проводили на основании изучения фенотипических свойств по определителю бактерий «Bergey's manual of determinative bacteriology» (2006). Контроль видовой идентификации осуществляли с использованием метода MALDI-ToF масс-спектрометрии, который осуществляли на приборе MALDI масс-спектрометре серии microflex (Bruker Daltonics GmbH, Германия) на базе ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора.

Для оценки способности микроорганизмов использовать циклические (фенол, бензол, толуол, α -нафтол, нафталин), насыщенные (гексан, гептан, октан, декан, гексадекан) углеводороды, а также сырой нефти в качестве единственного источника углерода и энергии применяли метод посева на среду среду M9. В состав такой среды вносят 0,4 мл индивидуального.

Для определения антибиотикорезистентности использовали диско-диффузионный метод (метод Кирби-Бауэра), принцип которого заключается в диффузии антибиотика из бумажного диска в толщу агара Мюллера-Хинтона, предварительно засеянного стандартизированной суспензией исследуемой культуры.

Целлюлазную активность выявляли качественным чашечным методом. Для выявления пектолитических ферментов применяли посев на плотную питательную среду, содержащую пектин.

Фитопатогенность оценивали по мацерации тканей картофеля и моркови. Зоопатогенные маркеры (гемолизин, липаза, плазмокоагулаза, фибринолизин, желатиназа) – стандартными пробирочными и чашечными тестами. Биоплёнкообразование – планшетным методом с окрашиванием кристаллическим фиолетовым (OD 595). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2007 (for Windows 10), для записи использовали форму выражения $M \pm m$, где M – среднее арифметическое значение, а m – доверительный интервал. При проверке статистических гипотез критический уровень показателя достоверности p принимали равным 0,05. Различия считали статистически

значимыми при $p \leq 0,05$. Статистический анализ степени образования биопленок осуществляли с использованием программы StatTech v. 4.9.5 (ООО «Статтех», Россия).

Структура и объем работы. Магистерская диссертация изложена на 63 страницах, содержит введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников (61 наименование), иллюстрирована 13 рисунками и 7 таблицами.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное фенотипическое и функциональное исследование углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв именно г. Лангепас – одного из наиболее нефтенагруженных городов ХМАО. Установлен видовой состав культивируемых УОБ, выявлены штаммы с широким спектром деградации углеводов, оценены антибиотикорезистентность и отсутствие значимой фито- и зоопатогенности. впервые изучена их способность образовывать биопленки.

Научная значимость. Выделенные и охарактеризованные штаммы с высоким деструкционным потенциалом и низкими факторами вирулентности могут быть рекомендованы для создания биопрепаратов для очистки антропогенно нарушенных почв в условиях средней тайги Западной Сибири. Полученные данные о численности и встречаемости УОБ служат основой для экологического мониторинга и прогнозирования самоочищающей способности почв региона.

Положения, выносимые на защиту.

1. В антропогенно нарушенных почвах г. Лангепас доминируют грамположительные бактерии семейства Bacillaceae (*Bacillus amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. simplex*, *Lysinibacillus fusiformis*), а также выявлены *Kocuria varians* и *Micrococcus luteus*. Наибольшая встречаемость (30 % проб) у *B. safensis* и *B. pumilus*; их количество варьирует от 2,3 до 4,9 lg КОЕ/г.

2. Изоляты различаются по способности утилизировать ароматические и насыщенные углеводороды как единственный источник углерода. Широкий деструкционный потенциал показали штаммы *B. megaterium* C8, *B. simplex* C2 и *M. luteus* H21, что делает их пригодными для очистки почв от разных классов нефтяных загрязнителей.

3. Исследуемые бактерии не проявляют выраженной фитопатогенности (мацерация тканей картофеля и моркови $\leq 3,5$ %). Среди зоопатогенных маркеров: 10 % штаммов не проявляли плазмокоагулязной активности, гемолитической – 50 %, желатиназной – 70 %, липазная и фибринолитическая активности отсутствуют; облигатных патогенов не обнаружено, что обосновывает биологическую безопасность при применении в открытых экосистемах.

4. 80 % изученных культур образуют биоплёнки, повышая толерантность и эффективность деградации углеводородов. Штаммы *B. amyloliquefaciens* H14, *B. atrophaeus* H16, *B. cereus* C21, *B. pumilus* H19 отличаются низкой антибиотикорезистентностью, а *K. varians* C10 – высокой активностью образования биопленок

Основное содержание работы

В главе «Современные методы изучения УОБ» приведён обзор современных подходов: от классического культивирования и фенотипической идентификации (включая MALDI-TOF MS) до молекулярно-генетических методов (секвенирование 16S рРНК, метагеномика, метатранскриптомика). Специфика почв г. Лангепас – подзолистые, болотные и техногенно-нарушенные почвы с низкой температурой, избыточным увлажнением и кислой реакцией среды (рН 4,6–5,2)

В главе «Результаты исследования» представлены результаты работы. В ходе исследования была определена численность гетеротрофных бактерий, которая составила 6,1–7,9 lg КОЕ/г, УОБ – 2,3–4,9 lg КОЕ/г, микромицетов – 0–4,1 lg КОЕ/г. В ходе работы выделены чистые культуры,

которые после фенотипического и MALDI-TOF анализа идентифицированы как 10 видов. Доминирующее положение заняли грамположительные бактерии семейства Bacillaceae (*B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. simplex*, *L. fusiformis*), а также представители Actinomycetota (*K. varians* и *M. luteus*). Самыми часто встречающимися видами, выделенными из образцов почвы, были *B. simplex* и *K. varians*, выделяемые из 30 % и *M. luteus* из 35 % проб.

В ходе работы были исследованы возможности выделенных бактерий к деградации различных классов углеводов – ароматических и насыщенных – а также к использованию сырой нефти в качестве единственного источника. При оценке деструкционного потенциала штаммы *B. megaterium* C8, *B. simplex* C2 и *M. luteus* H21 утилизировали 90 % тестируемых углеводов. У *B. cereus* C21 отсутствовал рост при добавлении углеводов в среду.

В ходе исследования антибиотикорезистентности были отобраны 4 штамма с минимальной толерантностью: *B. amyloliquefaciens* H14, *B. atrophaeus* H16, *B. cereus* C21 и *B. pumilus* H19. Данные штаммы проявили чувствительность к ванкомицину, эритромицину, линезолиду, цефтриаксону.

Оценка фитопатогенности выявила низкую способность к мацерации растительных тканей исследуемыми штаммами. Масса мацерата не превышала 3,5 %. *B. simplex* C2 и *M. luteus* H21 не вызывали мацерации.

Определение факторов зоопатогенности выявило отсутствие плазмокоагулазы у 10 % штаммов (*M. luteus* H21), гемолизина – 50 % штаммов, желатиназы – 70 % штамма. Липазная и фибринолитическая активности отсутствовали у всех изолятов. Облигатных патогенов не обнаружено.

Оценка образования биопленок штаммами УОБ показала, что 80 % штаммов формировали биопленки; максимальная активность отмечена у штамма *K. varians* C10 (ОД_{отн.} = 3,9). Штаммы *B. atrophaeus* H16 и *B. pumilus* H19 биоплёнок не образовывали.

Выводы

1. Количество гетеротрофных бактерий почв г. Лангепас варьировало от 6,1 до 7,9 lg КОЕ/г, достигая максимума в точках с минимальной антропогенной нагрузкой. Численность углеводородокисляющих бактерий составила от 2,3 до 4,9 lg КОЕ/г, микромицетов – от 0 до 4,1lg КОЕ/г.

2. Из антропогенно нарушенных почв г. Лангепас выделено 10 видов УОБ, доминирующее положение заняло семейство Bacillaceae класса Bacilli. На долю Actinomycetota (Micrococccaceae) пришлось два вида.

3. Широкий спектр деградации показали штаммы *B. megaterium* C8, *B. simplex* C2 и *M. luteus* H21, которые использовали 90 % исследуемых углеводов.

4. Наименьшей антибиотикорезистентностью обладают штаммы *B. amyloliquefaciens* H14, *B. atrophaeus* H16, *B. cereus* C21 и *B. pumilus* H19. Все изученные культуры проявили чувствительность к ванкомицину, эритромицину, линезолиду и цефтриаксону.

5. Мацерация тканей УОБ не превышает 3,5 % от исходной массы. *B. simplex* C2 и *M. luteus* H21 не проявили мацерирующей активности на обоих тест-объектах. Скрининг зоопатогенных маркеров выявил отсутствие плазмокоагулазы у 10 % штаммов (*M. luteus* H21), гемолитической активности – у 50 % штаммов (*B. simplex* C2, *K. varians* C10, *B. amyloliquefaciens* H14, *B. atrophaeus*, H16, *B. safensis* H18), желатиназы – у 70 % штаммов (*L. fusiformis* C1, *B. simplex* C2, *K. varians* C10, *B. cereus* C21, *M. luteus* H21, *B. safensis* H18, *B. pumilus* H19).

6. 30 % штаммов УОБ обладают выраженной способностью к образованию биопленок, 50 % – слабой. Максимальная активность зафиксирована у *K. varians* C10 (ОДотн. = 3,9).

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 СанПиН 2.1.7.1287-03. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы: утв. Глав. гос. сан. врачом РФ 25.01.2003: взамен СанПиН 42-128-4433-87. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 19 с.
- 2 Созина, И. Д. Микробиологическая ремедиация нефтезагрязненных почв / И. Д. Созина, А. С. Данилов // Записки Горного института. – 2023. – № 260. – С. 297-312.
- 3 Yakimov, M. M. Obligate oil-degrading marine bacteria / M. M. Yakimov, K. N. Timmis, P. N. Golyshin // Current Opinion in Biotechnology. – 2007. – Vol. 18 (3). – P. 257–266.
- 4 Jansson, J.K. The soil microbiome – from metagenomics to metaphenomics / J. K. Jansson, K. S. Hofmockel // Current Opinion in Microbiology. – 2020. – Vol. 43. – P. 162–168.
- 5 Head, I. M. Marine microorganisms make a meal of oil / I. M. Head, D. M. Jones, W. F. M. Röling // Nature Reviews Microbiology. – 2006. – Vol. 4 (3). – P. 173–182.
- 6 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.
- 7 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 Биопленки углеводородокисляющих бактерий антропогенно нарушенных почв г. Когалыма / А. С. Коробейникова [и др.] // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2025. – № 4. – С. 406–414.

9 Weisburg, W.G. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study / W. G. Weisburg // Journal of Bacteriology. – 1991. – Vol. 173. – P. 697–703.

10 Rojo, F. Degradation of alkanes by bacteria / F. Rojo // Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 11, No. 10. – P. 2477-2490.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized, overlapping loops and lines, positioned to the right of the third reference entry.