

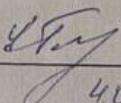
МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

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

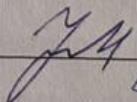
АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ
Студента 2 курса 241 группы
Направления подготовки магистратуры 06.04.01 Биология
Биологического факультета
Голубева Дмитрия Михайловича

Научный руководитель:
доцент, канд. биол. наук


4.06.26

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:
д-р биол. наук, доцент


4.06.26

Д. В. Уткин

Саратов 2026

Введение

Актуальность темы. Нефть – смесь жидких углеводородов с растворёнными твёрдыми углеводородами, смолисто-асфальтовыми веществами и газами. По данным Мирового энергетического статистического ежегодника, мировое потребление нефти устойчиво растёт. Нефть занимает ведущее место в топливно-энергетическом хозяйстве (в 2021 г. добыто более 524 млн тонн). Спектр её использования широк, однако добыча и переработка наносят серьёзный экологический ущерб [1].

Углеводороды нефти – один из главных загрязнителей окружающей среды. До 80 % разливов происходит по вине человека, что ведёт к нарушению экосистем, порче земель и гибели животных. Для ликвидации последствий применяют различные методы реабилитации [2].

Среди основных способов очистки почв от нефти – физический, химический и биологический. Физическая ремедиация (промывка или извлечение) дорога и длительна. Химическая рекультивация с помощью реагентов эффективна, но может вторично загрязнять почву. Нефть содержит полициклические ароматические углеводороды (канцерогены, мутагены) и гидрофобные соединения, что делает её устойчивой к деградации. Решение – биоремедиация.

Биоремедиация – удаление загрязнений с помощью живых организмов. Метод экологичен, быстр и дешевле традиционных способов.

Бактерии играют ключевую роль: они разлагают тяжёлые металлы, полиароматические углеводороды, нефтепродукты и пластмассы. Биопрепараты на основе бактерий-деструкторов углеводородов успешно применяются для очистки. Изучение углеводородокисляющих бактерий важно из-за их высокого биоремедиационного потенциала и недостаточной изученности [3].

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлась оценка биоремедиационного потенциала углеводородокисляющих бактерий почв г. Балаково.

Для реализации указанной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Выделить и провести количественный учет углеводородокисляющих бактерий.
2. Определить видовую принадлежность углеводородокисляющих бактерий.
3. Изучить биологические свойства углеводородокисляющих бактерий.

Материал и методы исследования.

Объектом исследования стали антропогенно нарушенные почвы, отобранные в черте г. Балаково, Саратовская область. В работе использовали 34 образца почв. Площадками опробования были урбанозёмы, индустриозёмы, культурозёмы и природные почвы.

Выделение и количественный учет углеводородокисляющих бактерий проводили методом последовательных разведений и высева на поверхность плотной питательной среды М9, в которой в качестве единственного источника углерода присутствовало вазелиновое масло [4].

Идентификацию бактерий проводили на основании изучения фенотипических свойств по определителю бактерий «Bergey's manual of determinative bacteriology» (2005) [5]. 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 при участии научного сотрудника Щербаковой Н.Е.

Определение спектра используемых углеводородокисляющими бактериями субстратов проводили методом высева исследуемых штаммов микроорганизмов на плотные дифференциально-диагностические питательные среды с источниками специфических субстратов [4].

В качестве углеводородных субстратов использовали следующие вещества: сырая нефть Соколовогорского нефтяного месторождения (Волго-Уральский нефтяной бассейн, Саратов, Россия), ряд индивидуальных углеводородов: *n*-алканы – гептан, гексан, декан; а также ароматические соединения – толуол, фенол. Способность микроорганизмов использовать для роста нефть и нефтепродукты определяли с помощью чашечного метода Мак-Кланга [6].

Исследование влияния абиотических факторов среды на рост углеводородокисляющих бактерий проводили при двух различных температурных условиях: низкой (+10 °C) и высокой (+43 °C), при шести разных значениях концентрации хлорида натрия: 1, 2, 5, 7, 10 и 15 %, при трех различных значениях водородного показателя среды: кислое (5), нейтральное (7) и щелочное (9).

Выявление антибиотикочувствительности и патогенных свойств проводили по стандартным методам [4].

Для выявления способности бактерий образовывать биопленки использовали метод определения степени формирования биопленок в стационарной фазе роста путем окрашивания кристаллическим фиолетовым по методу O'Toole [7].

Деструктивную активность бактериальных культур оценивали методом адсорбционной хроматографии с последующим гравиметрическим анализом, извлекая сумму неполярных и малополярных углеводородов из культуральной жидкости органическим растворителем (хлороформом) с одновременной очисткой элюата на окиси алюминия в хроматографической колонке [8].

Структура и объем работы.

Работа, изложенная на 68 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Исследование проиллюстрировано 23 рисунками и содержит 7 таблиц. Список использованных источников включает 64 наименования.

Научная новизна.

Впервые проведен скрининг углеводородокисляющих бактерий, выделенных из проб урбаноэмов, индустриозёмов, культурозёмов и природных почв г. Балаково.

Научная значимость.

Перспектива применения углеводородокисляющих микроорганизмов для создания биопрепарата, направленного на проведение эффективных реабилитационных мероприятий антропогенно нарушенных почв.

Положения, выносимые на защиту.

1. Из антропогенно нарушенных почв г. Балаково выделено 8 видов углеводородокисляющих бактерий: *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus circulans*, *B. horikoshii*, *B. lentimorbus*, *B. pumilus*, *Mammaliicoccus lentus*, *Ochrobactrum gallinifaecis*, *Paeniglutamicibacter psychrophenicus*. Численность УОБ варьирует от 5,0 до 10,1 lg КОЕ/г, достигая максимальных значений в природных почвах.

2. Выделенные штаммы УОБ сохраняют способность к росту в диапазоне pH 5-10, в пределах которого отдельные штаммы формируют плотные биоплёнки при специфических значениях pH (5, 7 или 9), демонстрируя при этом штамм-специфичную pH-зависимость: максимальная продукция биоплёнки достигается у одних культур в кислой (pH 5), у других – в нейтральной (pH 7), у третьих – в щелочной (pH 9) среде.

3. Штаммы *B. circulans* E75 и *B. pumilus* S35 окисляют до 47,5 и 43,6 % сырой нефти соответственно, а также утилизируют гексан, декан, толуол и фенол, демонстрируя широкий субстратный спектр.

4. Выделенные штаммы УОБ обладают ограниченным набором факторов патогенности и проявляют чувствительность к широкому спектру антибиотиков, что в совокупности с их деструктивной активностью в отношении углеводов обосновывает их высокий биоремедиационный потенциал и биобезопасность при интродукции в антропогенно нарушенные почвенные экосистемы.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных об углеводородокисляющих бактериях, их генетических, физиологических и экологических особенностях. Изложена информация об особенностях их ферментативных систем и биоремедиационном потенциале углеводородокисляющих бактерий, выделенных из антропогенно нарушенных почв.

В главе «Результаты исследования» представлены результаты исследований, в ходе которых из 34 почвенных проб было выделено 8 штаммов углеводородокисляющих бактерий: *Acinetobacter lwoffi*, *Bacillus circulans*, *B. horikoshii*, *B. lentimorbus*, *B. pumilus*, *Mammaliicoccus lentus*, *Ochrobactrum gallinifaecis*, *Paeniglutamicibacter psychrophenicus*. Рассчитаны индексы встречаемости и количественные показатели выделенных культур микроорганизмов.

Представлены результаты об адаптационном потенциале выделенных штаммов углеводородокисляющих бактерий: способность к использованию различных субстратов в качестве источников углерода, азота и энергии. Все штаммы были способны расщеплять крахмал, 38 % штаммов обладали ферментативными системами для разложения арабинозы и лактозы, 50 % штаммов – к разложению глюкозы, 25 % штаммов – к разложению мальтозы и сахарозы. Ни один штамм не был способен к окислению ксилозы. Использовать в качестве источника азота казеин и пептон были способны все штаммы. К использованию желатина и молекулярного азота были способны 88 % штаммов, нитрата калия – 38 % штаммов. К разложению декана были способны все исследованные штаммы. Ферментами для окисления сырой нефти, гексана, толуола и фенола обладали 88 % штаммов, гептана – 63 % штаммов.

Изложена информация об устойчивости выделенных бактерий к абиотическим факторам среды. 25 % штаммов не были адаптированы к низким температурам, 88 % штаммов были способны расти при температуре 43 °С.

100 % штаммов были способны расти в щелочной среде (рН 10) и при низкой концентрации хлорида натрия (1 %). 25 % штаммов не проявляли жизнедеятельности в кислой среде (рН 5), 38 % штаммов были способны расти при максимальной концентрации хлорида натрия в среде (15 %).

При изучении антибиотикорезистентности выделенных штаммов было выяснено, что высокая чувствительность к антибиотическим веществам была характерна для 38 % исследованных углеводородокисляющих бактерий.

В ходе исследования факторов патогенности было выявлено, что выделенные штаммы углеводородокисляющих бактерий были способны к мацерации от 13 до 38 % растительных тест-культур. Чаще всего размягчению были подвержены ткани корнеплода свёклы. Гемолитическую активность проявляли 88 % выделенных штаммов, желатиназную – 38 % штаммов, лецитиназную – 25 % штаммов. Плазмокоагулазной и фибринолитической активностями не обладал ни один из штаммов углеводородокисляющих бактерий.

Результаты исследования влияния температуры на образования биопленок показали, что максимальная продукция биопленки всех выделенных штаммов микроорганизмов наблюдается при температуре 37 °С. Анализ оценки влияния рН на формирования биопленки показал, что плотную продукцию в кислой и щелочной среде наблюдали у 25 % штаммов, в нейтральной среде – у 13 % штаммов. Умеренный синтез в щелочной среде наблюдали у 25 % штаммов, в кислой – у 13 % штаммов.

Деструктивная активность бактерий составляла у разных штаммов 24-47 %. Изоляты обеспечивают окисление нефти на уровне, сопоставимом с известными промышленными деструкторами, что обосновывает перспективность их применения в биоремедиационных технологиях.

Выводы

1 Из антропогенно нарушенных почв, отобранных в черте г. Балаково, выделено 8 видов углеводородокисляющих бактерий: *A. lwoffii*, *B. circulans*, *B. horikoshii*, *B. lentimorbus*, *B. pumilus*, *M. lentus*, *O. gallinifaecis*, *P. psychrophenicus*.

2 Численность углеводородокисляющих бактерий в почвах г. Балаково варьировала от 5,0 до 10,1 IgКOE/г. Количественные показатели углеводородокисляющих бактерий в урбаноэмах находились в диапазоне от 5,7 до 7,0 IgКOE/г, в индустриоземах – от 5,3 до 7,0 IgКOE/г, в культуроземах – от 5,6 до 7,0 IgКOE/г, в природных почвах – от 5,0 до 10,1 IgКOE/г.

3 Штаммы *B. horikoshii* P22 и *B. pumilus* S35 являлись наиболее толерантными к абиотическим факторам среды благодаря устойчивости к концентрации хлорида натрия (15 %), температуре (10, 43 °C) и уровню pH среды (5, 10).

4 Штамм *B. horikoshii* P22 расщеплял все протестированные углеводные субстраты за исключением ксилозы. Изоляты *A. lwoffii* R44 и *M. lentus* T18 усваивали каждый из рассмотренных источников азота. Штаммы *B. circulans* E75, *B. horikoshii* P22, *O. gallinifaecis* I59 и *A. lwoffii* R44 деградировали весь спектр изученных углеводородных субстратов.

5 Штаммы *B. circulans* E75, *P. psychrophenicus* W48 и *M. lentus* T18 проявили чувствительность к 72 % исследованных антибиотиков. Штаммы различались по полноте набора факторов патогенности: у *P. psychrophenicus* W48 доля выявленных маркеров составила 16,7 %, у *B. circulans* E75, *M. lentus* T18 и *O. gallinifaecis* I59 – 33,3 %.

6 Штаммы *B. circulans* E75 и *P. psychrophenicus* W48 образовывали плотную биопленку в кислой среде (pH 5), *A. lwoffii* R44 и *B. pumilus* S35 – в щелочной среде (pH 9), *M. lentus* T18 – в нейтральной среде (pH 7).

Штаммы *B. horikoshii* P22 и *O. gallinifaecis* I59 формировали биопленку на умеренном уровне в щелочной среде (pH 9), *B. lentimorbus* J64 – в кислой среде (pH 5).

7 Штаммы углеводородокисляющих бактерий характеризовались деструктивной активностью от 24,4 до 47,5 %. Изолятами с максимальной степенью деструкции были *B. circulans* E75 – 47,5 % и *B. pumilus* S35 – 43,6 %.

Список использованных источников

- 1 Шарипова, С. Ф. Изучение фракционного состава нефти / С. Ф. Шарипова, К. Х. Мажидов // Журнал технических исследований. – 2020. – Т. 3, № 5. – С. 27.
- 2 Kapsalyamova, Z. Use of natural gas and oil as a source of feedstocks / Z. Kapsalyamova, S. Paltsev // Energy economics. – 2020. – Vol. 92 – P. 104984.
- 3 Regulation and impact of VOC and CO₂ emissions on low-carbon energy systems resilient to climate change: A case study on an environmental issue in the oil and gas industry / V. Fetisov [et al.] // Energy science & engineering. – 2023. – Vol. 11, N. 4. – P. 1516–1535.
- 4 Егоров, Н. С. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Практическое пособие / Н. С. Егоров – М.: Московский государственный университет, 1983. – 251 с.
- 5 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.
- 6 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. 1. – С. 34–42.
- 7 Марданова, А. М. Биопленки: основные принципы организации и методы исследования / А. М. Марданова, Д. А. Кабанов. – Казань: К(П)ФУ, 2016. – 42 с.
- 8 Суржко, Л. Ф. Утилизация нефти в почве и воде микробными клетками / Л. Ф. Суржко, З. И. Финкельштейн, Б. П. Баскунов // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 393-399.

