

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра биохимии и биофизики

**БИОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ И ИММОБИЛИЗАЦИОННЫЙ
ПОТЕНЦИАЛ МАРГАНЕЦОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Варюхиной Марины Юрьевны

Научный руководитель:

профессор кафедры биохимии и биофизики,

док. биол. наук, доцент:

Е.В. Плешакова

Зав. кафедрой биохимии и биофизики,

док. биол. наук, профессор:

С.А. Коннова

Саратов 2026

Введение. К числу приоритетных загрязнителей окружающей среды относятся тяжелые металлы (ТМ), в частности марганец [1]. Этот элемент играет значительную роль в биологическом круговороте веществ и энергии, обладает высокой биофильностью, способен аккумулироваться в верхнем слое почвы, а в повышенных концентрациях выступать в роли экотоксиканта и оказывать отрицательное воздействие на организм человека [2, 3].

Наиболее подверженными загрязнению оказываются природные и сточные воды. Марганец при этом входит в перечень приоритетных поллютантов, поступающих в организм человека с питьевой водой [4]. Согласно результатам мониторинга, проводимого в рамках ежегодного доклада Министерства природных ресурсов и экологии Саратовской области о состоянии и об охране окружающей среды, соединения марганца в 2024 году послужили характерными загрязняющими веществами [5]. Таким образом, вопрос об очистке вод от избытка марганца является особенно актуальным в том числе на территории нашей области.

Очистка вод от повышенных концентраций марганца может осуществляться с участием марганецооксилирующих микроорганизмов. Для этой группы характерна способность окислять двухвалентные соединения марганца и других металлов и осажать оксиды элементов на поверхности собственной клетки.

Актуальным является изучение марганецооксилирующих микроорганизмов и особенностей их метаболизма, рассмотрение возможности иммобилизации данных микроорганизмов на частицах загрузочного материала биофильтров для применения их в технологиях очистки вод от повышенных концентраций марганца (II). Подобные исследования обладают как практической, так и общенаучной значимостью, ведь физиологические особенности и механизмы окисления этого металла в живых организмах еще не изучены полностью.

Цель данной работы состояла в изучении эколого-функциональных свойств марганецооксилирующих микроорганизмов и их способности к

иммобилизации на носителях для оценки возможности дальнейшего их использования в очистке воды от повышенного содержания марганца (II).

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Определение экологической взаимосвязи марганецооксиляющих микроорганизмов для дальнейшей оценки возможности создания на их основе эффективных микробных консорциумов.

2. Изучение фосфатмобилизующей активности марганецооксиляющих микроорганизмов с целью их использования для очистки вод с комплексным загрязнением.

3. Определение влияния значения pH среды культивирования на рост марганецооксиляющих микроорганизмов.

4. Изучение возможности марганецооксиляющих микроорганизмов к иммобилизации на носителях (на примере кварцевого песка и вермикулита) и определение влияния иммобилизации на эффективность удаления марганца (II) из водной среды.

Материалы и методы. В работе использовали 4 штамма микроорганизмов: 3 штамма марганецооксиляющих (*Bacillus simplex* 55.2, *Bacillus simplex* 13.2 и *Listeria murrayi* 13.4) и один штамм железо- и марганецооксиляющих бактерий (*Bacillus megaterium* 69.5). Все они были ранее выделены из почвенных микробиоценозов высокомагнитных почв г. Медногорска (Оренбургская область, Россия) [6].

Для «оживления» культур осуществляли пересев микроорганизмов со столбиков агаризованной селективной среды на ГРМ-агар в чашки Петри методом штриха с обжигом петли, выращивали при температуре 28-30 °C в стационарных условиях в термостате в течение 1-2 суток, получали изолированные колонии, проверяли данные культуры на чистоту после длительного хранения.

Экологическую взаимосвязь микроорганизмов определяли методом перекрестного посева и методом лунок.

Способность к растворению фосфатов изучали по образованию зон растворения фосфатов кальция (гало) вокруг колоний на среде Муромцева, (г/л): глюкоза – 10,0; K_2SO_4 – 0,2; $MgSO_4 \times 7H_2O$ – 0,4; аспарагин – 1,0; $CaCl_2 \times 2H_2O$ – 2,2; $Na_3PO_4 \times 12H_2O$ – 3,8; агар-агар – 20,0 [7]. В качестве контроля также проводили исследование двух штаммов микроорганизмов, взятых из музейной коллекции (*Staphylococcus hominis* 2LB и *Dietzia maris* AM3).

При оценке влияния pH среды для культивирования (в диапазоне pH от 2,2 до 5) на рост бактерий применяли МПБ, приготовленный с использованием фосфатно-цитратного буфера (pH 2,2) и цитратного буфера (pH 3-5). Для определения ростовых значений pH сред бактерии культивировали в пробирках с МПБ в стационарных условиях при 28 °C. Через несколько суток визуально фиксировали рост бактерий.

Иммобилизацию микроорганизмов на кварцевом песке и вермикулите проводили поэтапно в лабораторных условиях согласно модифицированной методике, описанной А. Piazza с соавт. [8]. Убыль Mn (II) в среде культивирования определяли согласно ГОСТ 4974-2014 [9], используя метод с окислением соединений марганца до перманганат-ионов.

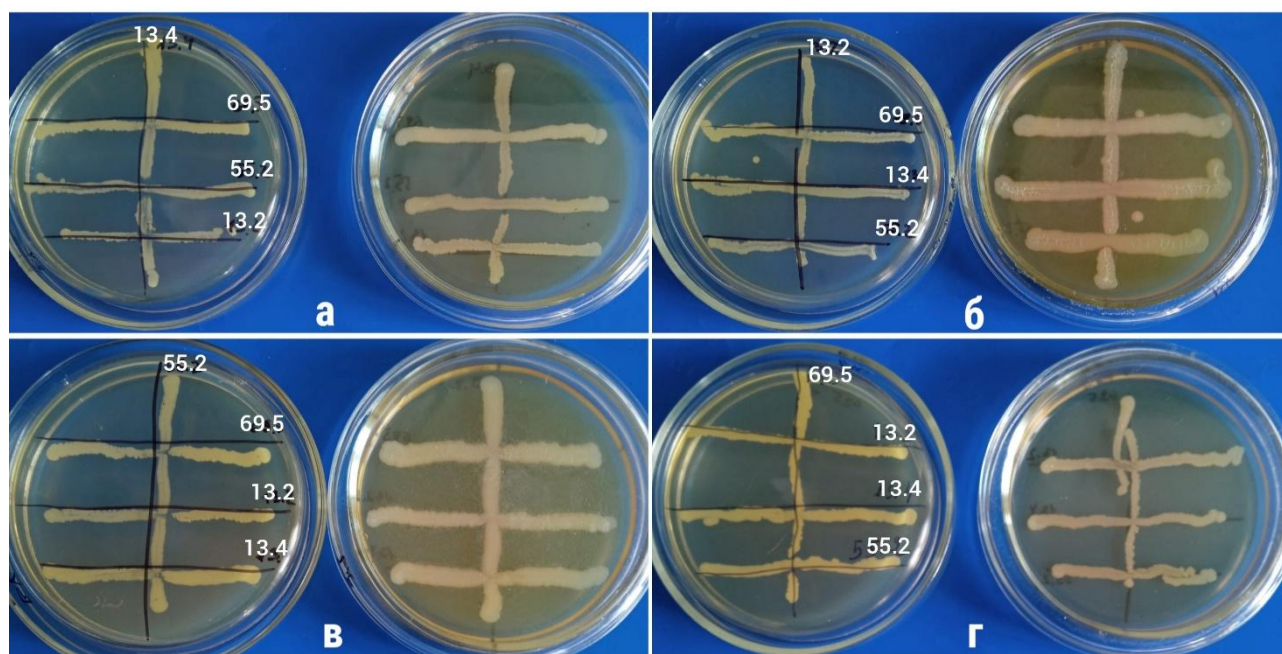
Структура и объем работы. Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 71 источник на русском и английском языках. Работа изложена на 48 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 12 рисунками и 1 таблицей.

Основное содержание работы. В результате «оживления» были получены изолированные колонии на среде ГРМ-агар для каждого штамма. Рост колоний наблюдался уже в течение первых суток после пересева микроорганизмов. Культуры после длительного хранения остались чистыми.

Результаты роста микроорганизмов при изучении их экологической взаимосвязи в местах пересечения колоний представлены в таблице 1, визуальная оценка роста – на рисунке 1.

Таблица 1 – Особенности роста марганецокисляющих микроорганизмов при перекрестном посеве

Исследуемый штамм (горизонтальный посев)	Штамм, относительно которого наблюдается рост (вертикальный посев)			
	<i>Bacillus simplex</i> 13.2	<i>Listeria murrayi</i> 13.4	<i>Bacillus simplex</i> 55.2	<i>Bacillus megaterium</i> 69.5
<i>Bacillus simplex</i> 13.2		+-	-	+-
<i>Listeria murrayi</i> 13.4	+		+-	+-
<i>Bacillus simplex</i> 55.2	+	+		+
<i>Bacillus megaterium</i> 69.5	+	+-	-	
Примечания				
1 «-» – отсутствие роста				
2 «+-» – слабый рост				
3 «+» – хороший рост				



а – *Listeria murrayi* 13.4; б – *Bacillus simplex* 13.2; в – *Bacillus simplex* 55.2;
г – *Bacillus megaterium* 69.5

Рисунок 1 – Визуальная оценка роста микроорганизмов при перекрестном посеве

Штамм *B. simplex* 55.2 подавляет рост всех остальных микроорганизмов. Однако в одном из повторов относительно него наблюдался слабый рост *L. murrayi* 13.4. Микробные штаммы *B. simplex* 13.2, *L. murrayi* 13.4 и *B. megaterium* 69.5, по всей видимости, состоят в нейтральных отношениях, так

как полного подавления роста того или иного штамма в местах их соприкосновения не происходит. Небольшую ингибирующую активность из них способны проявлять *L. murrayi* 13.4 и *B. megaterium* 69.5.

Исследование методом лунок проводилось для микроорганизмов *L. murrayi* 13.4 и *B. simplex* 55.2 с целью уточнения истинных взаимоотношений штаммов, так как данные, полученные методом перекрестного посева, вызвали некоторые сомнения.

Была выявлена антагонистическая активность *B. simplex* 55.2 в отношении *L. murrayi* 13.4. В случае, когда в лунку вносилась бульонная культура *B. simplex* 55.2, а *L. murrayi* 13.4 высевалась на поверхность МПА, вокруг лунки наблюдались зоны подавления роста, связанные с ингибирующим действием первого штамма на второй. Когда же в лунке находилась культура *L. murrayi* 13.4, зон подавления роста не наблюдалось.

Все исследуемые штаммы марганецооксиляющих бактерий проявили способность к росту на среде Муромцева, рост колоний наблюдался уже спустя 24 часа от начала культивирования. Зоны растворения фосфатов кальция стали заметны спустя 72 часа от начала культивирования, однако наблюдались только в одной из трех засеянных чашек. Диаметр зон растворения фосфатов кальция через 10 дней от начала культивирования составил для штаммов: *B. simplex* 55.2 – 20 мм, *B. simplex* 13.2 – 20 мм, *B. megaterium* 69.5 – 25 мм и *L. murrayi* 13.4 – 15 мм (рисунок 2). На 21 сутки культивирования зон растворения уже не было видно, что может быть связано с истощением питательной среды. Все исследуемые штаммы в разной степени способны растворять неорганические фосфаты, т.е. обладают фосфатмобилизующей активностью.

Также фосфатмобилизующая активность была проверена у двух контрольных штаммов микроорганизмов (*St. hominis* 2LB и *D. maris* AM3). На 6 день культивирования диаметр наблюдаемых зон растворения фосфатов кальция вокруг колоний составил 2 мм для *St. hominis* 2LB и 16 мм для *D. maris* AM3. Следовательно, у *St. hominis* 2LB не наблюдается способности к

мобилизации неорганических фосфатов, а у *D. maris* AM3 она сходна с таковой у марганецооксиляющих бактерий.

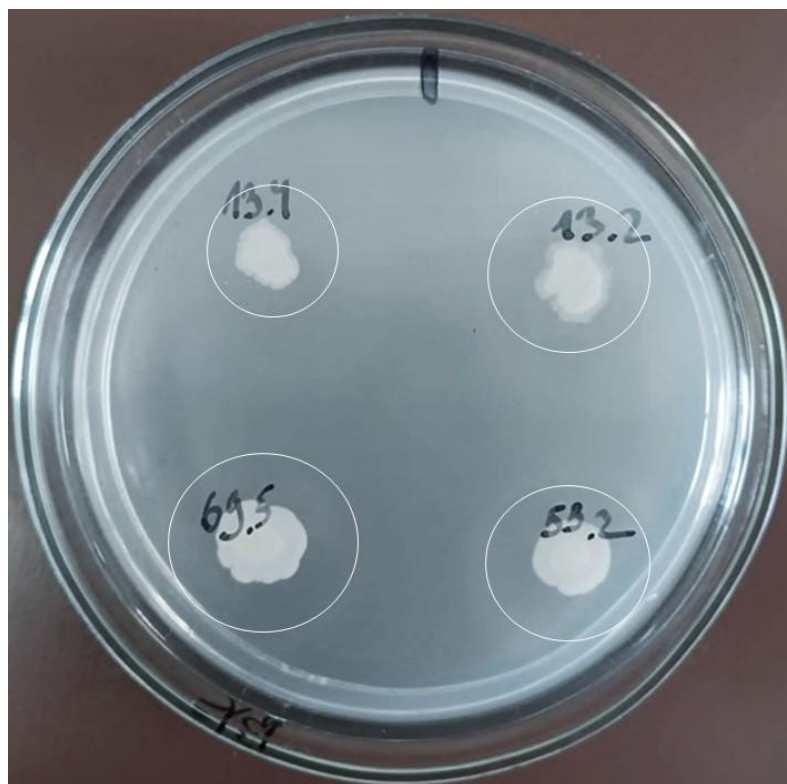


Рисунок 2 – Визуальная оценка зон растворения фосфата кальция у исследуемых микроорганизмов

Было показано, что штамм *B. megaterium* 69.5 обладает способностью к росту в среде МПБ со значением pH от 2,2 до 5. Спустя 5 дней культивирования в стационарных условиях при 28 °C во всех пробирках с микроорганизмами наблюдалось помутнение среды и образование осадка на дне пробирки, что свидетельствует о наличии роста бактерий.

Способность микроорганизмов к иммобилизации на носителе определялась по убыли Mn (II) в среде культивирования. В ее роли выступала жидкая селективная среда для марганецооксиляющих микроорганизмов с концентрацией Mn (II) 2 ммоль/л. Носителями выступали кварцевый песок и вермикулит.

В условиях нейтральной кислотности среды (pH 7) убыль Mn (II) в среде с кварцевым песком составила 95,3 %. Убыль металла в среде после

иммобилизации *B. megaterium* 69.5 на песке отличалась незначительно, составив 96,2 %. Такой же эксперимент был проведен в условиях высокой кислотности (pH 3). При этом концентрация бактерий в используемой бактериальной суспензии составила 0,5 г/л. Несмотря на то, что масса *B. megaterium* 69.5 при иммобилизации была в 2 раза ниже, убыль Mn (II) была высокой. В среде с иммобилизованными микроорганизмами убыль составила 89,2 %, в контрольном образце с кварцевым песком без микроорганизмов была ниже – 85,8 %. Результаты исследования представлены на рисунке 3.

Учитывая полученные результаты, а также определенное визуальное наличие роста микроорганизмов в исследуемых колбах с кварцевым песком (помутнение среды), можно сказать, что *B. megaterium* 69.5 обладает способностью к иммобилизации на кварцевом песке как носителе, что может быть полезно для дальнейшего использования данного микроорганизма в системах очистки вод от повышенных концентраций марганца (II).

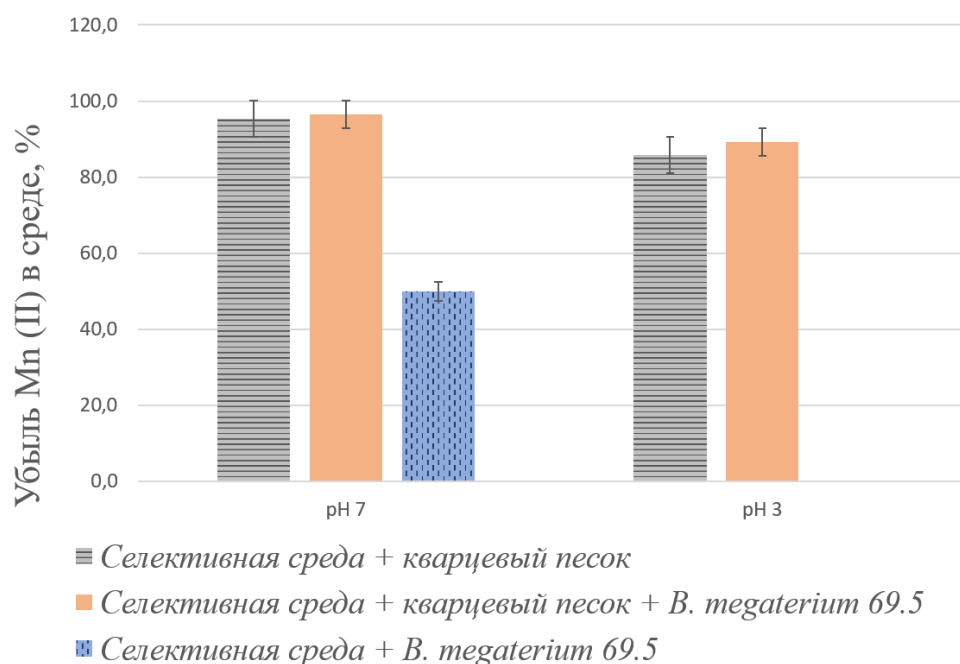


Рисунок 3 – Результаты убыли Mn (II) в среде культивирования (при pH 3 и pH 7) при культивировании с кварцевым песком, с клетками *B. megaterium* 69.5, а также с кварцевым песком и иммобилизованными на нем клетками *B. megaterium* 69.5

Была изучена способность штамма *B. megaterium* 69.5 к иммобилизации на золотистом агровермикулите («Лита», Россия), соответствующем ГОСТ 12865-6, фракция: 1-3 мм, оценена эффективность использования вермикулита в качестве загрузочного материала биофильтров.

Установлено, что убыль марганца (II) в среде культивирования при использовании вермикулита составила 99,9 % за 7 суток, остаточная концентрация Mn (II) составила 0,107 мг/л. Убыль металла в среде в случае иммобилизации микроорганизма *B. megaterium* 69.5 также была крайне высокой и составила 99,99 %, остаточная концентрация Mn (II) составила 0,012 мг/л.

Сравнивая остаточную концентрацию марганца в среде культивирования, следует отметить, что эффективность удаления металла с помощью иммобилизованных на вермикулите клеток *B. megaterium* 69.5 в 8,9 раза выше, чем с использованием только вермикулита. Эти отличия можно было увидеть визуально (рисунок 4).



а) без *B. megaterium* 69.5; б) с иммобилизованными на вермикулите клетками *B. megaterium* 69.5

Рисунок 4 – Образцы, отобранные из среды культивирования

Заключение. Вопрос об очистке сточных вод от повышенных концентраций марганца (II) остается актуальным, в том числе в Саратовской области. Также важным является изучение способности марганцеоксилирующих микроорганизмов к иммобилизации на частицах носителя в составе загрузочного материала биофильтров. Образующиеся в таком случае биопленки способствуют биологическому окислению Mn (II) и удалению металла из воды с его содержанием, превышающим предельно допустимое.

В рамках данной работы было изучено 4 штамма марганцеоксилирующих микроорганизмов (*B. simplex* 55.2, *B. simplex* 13.2, *B. megaterium* 69.5 и *L. murrayi* 13.4), определена их экологическая взаимосвязь и фосфатмобилизующая активность. Для штамма *B. megaterium* 69.5 также изучена способность к росту в диапазоне pH (2,2-5) и иммобилизации на кварцевом песке и вермикулите, рассмотрено влияние иммобилизации микроорганизма на эффективность удаления Mn (II) из среды.

Полученные сведения являются полезными при разработке методов очистки сточных вод с использованием данных микроорганизмов. Перспективным оказывается дальнейшее изучение возможных компонентов биофильтров и условий их функционирования.

Выводы. 1. При оценке экологической взаимосвязи марганцеоксилирующих микроорганизмов установлено, что *B. simplex* 13.2, *L. murrayi* 13.4 и *B. megaterium* 69.5 состоят в нейтральных отношениях, что перспективно для создания микробных консорциумов для очистки вод от избыточного содержания Mn (II). Микробный штамм *B. simplex* 55.2 ингибирует рост остальных изученных микроорганизмов, что не предполагает его использование в составе консорциумов.

2. Показано, что все исследованные марганцеоксилирующие микроорганизмы обладают фосфатмобилизующей активностью. Диаметр зон растворения фосфатов кальция через 10 сут. культивирования составил для микроорганизмов: *B. megaterium* 69.5 – 25 мм; *B. simplex* 55.2 и *B. simplex* 13.2 – 20 мм, *L. murrayi* 13.4 – 15 мм. Обнаруженная способность позволяет

использовать данные микроорганизмы для очистки воды с комплексным загрязнением.

3. Установлено, что *B. megaterium* 69.5 способен активно расти в жидкой питательной среде в диапазоне pH от 2,2 до 5, что может быть важно при очистке воды в экстремальных условиях, например, в кислой среде.

4. Выявлено, что клетки *B. megaterium* 69.5 способны к иммобилизации на кварцевом песке и вермикулите, что приводит к повышению эффективности удаления Mn (II) из жидкой среды. Убыль металла в среде при культивировании микроорганизма с кварцевым песком составила 96,2 % (при pH 7) и 89,2 % (при pH 3), а с вермикулитом приблизилась к 100 % при (pH 7), что свидетельствует об эффективности использования *B. megaterium* 69.5 в очистке воды.

Список использованных источников

1 Пьянков, А. С. Железо и марганец как основные загрязняющие вещества подземных вод / А. С. Пьянков // Научное сообщество XXI века: проблемы и пути их решения : сборник научных трудов / «НИЦ ЭСП» в ЮФО. – Анапа, 2024. – С. 15-20.

2 Кочмар, И. Н. Экологические аспекты геохимии марганца в зоне техногенеза отвалов угольных шахт / И. Н. Кочмар, В. В. Карабын // Журнал Белорусского государственного университета. – Экология. – 2017. – № 4. – С. 81-91.

3 Токсические эффекты марганца как фактор риска для здоровья населения / Г. В. Шестова [и др.] // Медицина экстремальных ситуаций. – 2014. – № 4. – С. 59-65.

4 Peculiarities of children's risk assessment on ingestion of chemicals with drinking water / N. V. Stepanova [et al.] // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – V. 7, N 3. – P. 1677.

5 Доклад о состоянии и об охране окружающей среды Саратовской области в 2024 году [Электронный ресурс] : [офиц. сайт]. – URL: <https://saratov.gov.ru/gov/auth/minres/doklad-o-sostoyanii-i-ob-okhrane->

okruzhayushchey-sredy-saratovskoy-oblasti/dokladOOS.php. (дата обращения: 17.10.25). – Загл. с экрана. – Яз. рус.

6 Микробиологическая и биохимическая индикация почв города Медногорска / Е. В. Плешакова [и др.] // Агрохимия. – 2016. – № 1. – С. 66-73.

7 Муромцев, Г. С. Методы изучения растворения фосфатов кальция микроорганизмами / Г. С. Муромцев // Микробиология. – 1957. – № 26. – С. 172-178.

8 Environmental bacteria involved in manganese (II) oxidation and removal from groundwater / A. Piazza [et al.] // Frontiers in microbiology. – 2019. – V. 10. – P. 119.

9 ГОСТ 4974-2014. Вода питьевая. Определение содержания марганца фотометрическими методами. – М. : Стандартинформ, 2015. – 23 с.