

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра биохимии и биофизики

**ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫЕ СВОЙСТВА
УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
ПОЧВ Г. КОГАЛЫМА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Казакулова Эдуарда Данияловича

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. Проблема очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений актуальна, поскольку с ежегодным ростом добычи нефти неизбежно повышается шанс выбросов нефти, что приводит к загрязнению грунтовых вод и уменьшению сельскохозяйственной пригодности территорий. Также, нефть и нефтепродукты, в случае разлива, оказывают негативное влияние на фауну и на человека [1].

Ранее из почв г. Когалыма (ХМАО – Югра) были выделены углеводородокисляющие бактерии: *Bacillus alcolophilus* WS-3027B, *B. funiculus* LY-2403G, *B. halodurans* MH-3011N, *B. niacini* TC-8101S, *B. psychrodurans* LV-1106E. Доказана способность к деструкции нефти у этих бактерий и устойчивость к различным неблагоприятным условиям среды (повышенной минерализации, щелочности, низким температурам).

Эти бактерии, выделенные в непосредственной близости от мест добычи нефти, на загрязненных углеводородами почвах, представляют большую ценность для исследования и практического применения, поскольку обладают углеводородоразлагающими свойствами, и их исследование может привести к развитию новых подходов для биоремедиации почв, грунтовых вод и открытых водоемов [2].

В связи с вышеизложенным, целью работы является изучение поверхностно-активных свойств углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв г. Когалыма.

1. Оценка экзогенной и эндогенной эмульгирующей активности изучаемых углеводородокисляющих бактерий по отношению к нефти после их культивирования в жидкой минеральной среде с углеводородным субстратом.

2. Установление корреляции между показателями концентрации клеток, мутности и оптической плотности бактериальной суспензии штаммов, показавших максимальную эмульгирующую активность по отношению к нефти.

3. Выявление зависимости эмульгирующей активности изучаемых бактерий по отношению к нефти от концентрации бактериальных клеток в культуральной среде.

4. Определение показателя гидрофобности бактериальных клеток после их культивирования на плотной агаризованной питательной среде и в жидкой минеральной среде М9 с глицерином в качестве единственного источника углерода и энергии.

Материалы и методы. В работе использовали 5 штаммов бактерий: *Bacillus alcalophilus* WS-3027B, *B. funiculus* LY-2403G, *B. halodurans* MH-3011N, *B. niacini* TC-8101S, *B. psychrodurans* LV-1106E [2]. Музейные культуры хранили при 4 °C на столбиках 6%-ной агаризованной питательной среды (ГРМ-агар) под стерильным вазелиновым маслом с регулярными пересевами.

На первом этапе осуществляли пересев микроорганизмов, хранящихся на столбиках агаризованной питательной среды, на ГРМ-агар в чашки Петри методом штриха с обжигом петли. Каждый микробный штамм пересевали в двух повторностях.

Пересеянные из музейной коллекции бактериальные культуры 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.

Эмульгирующую активность микробных штаммов по отношению к нефти определили методом Д. Купера с некоторыми модификациями [3].

Для оценки показателя гидрофобности (ПГ) бактериальных клеток применяли метод Е.В. Серебряковой с соавт. [4], основанный на адсорбции бактериальных клеток на поверхности капель хлороформа.

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 28

источников на русском и английском языках. Работа изложена на 40 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 5 рисунками и 5 таблицами.

Основное содержание работы. В результате пересева были получены изолированные колонии на среде ГРМ-агар для каждого штамма. Далее микроорганизмы выращивали в течение двух суток в жидкой минеральной среде М9 с добавлением углеводородного субстрата в качестве единственного источника углерода и энергии (вазелиновое масло или глицерин, 2 % по весу). Состав среды М9 (г/л): Na_2HPO_4 – 6,0; KH_2PO_4 – 3,0; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1,0. Автоклавировали колбы со средой при 1 атм. в течение 30 минут. Отдельно автоклавировали вазелиновое масло или глицерин при 1 атм., добавляли углеводородный субстрат в каждую колбу перед посевом микроорганизмов (0,4 г на 20 мл) дозатором со стерильными наконечниками.

Микробные штаммы с ГРМ-агара на чашках Петри засеивали методом обжига шпателя в 50 мл среды М9 с глицерином, после культивирования измеряли мутность культуральной среды на приборе Densi-La-Meter II («Erba Lachema s.r.o.», Чехия).

Для оценки экзогенной эмульгирующей активности бактериальные клетки отделяли от культуральной среды центрифугированием на центрифуге MiniSpin plus (Eppendorf, Россия) в течение 10 мин при 8 тыс. об/мин, и исследовали супернатант.

В целом, у всех исследованных углеводородокисляющих бактерий рода *Bacillus*, выделенных из почв г. Когалыма, в ходе проведенных исследований была обнаружена экзо- и эндогенная эмульгирующая активность по отношению к нефти, образовавшиеся нефтяные эмульсии обладали достаточной стабильностью (рисунок 1, таблица 1).

В повторном эксперименте с двумя исследуемыми штаммами *B. alcalophilus* WS-3027B и *B. funiculus* LY-2403G, с целью довести мутность бактериальной суспензии до более высоких значений и измерить

эмульгирующие способности при более высокой концентрации бактерий, были внесены некоторые изменения.

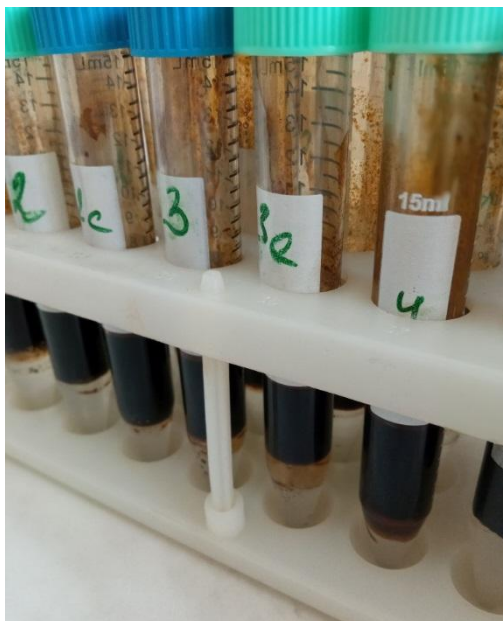


Рисунок 1 – Нефтяные эмульсии, образуемые углеводородокисляющими бактериями

Таблица 1 – Эмульгирующая активность углеводородокисляющих бактерий

Бактерии	Мутность бактериальной суспензии, McF	Эмульгирующая активность по отношению к нефти, %			
		эндогенная		экзогенная	
		E ₂₄	E ₄₈	E ₂₄	E ₄₈
<i>B. halodurans</i> MH-3011N	0,9	40,0±0,0	47,3±1,2	44,7±3,0	44,7±3,0
<i>B. alcalophilus</i> WS-3027B	0,3	50,0±0,0	48,7±2,3	45,3±1,1	44,0±2,0
<i>B. funiculus</i> LY- 2403G	0,2	46,7±1,1	46,7±2,3	45,3±2,3	45,3±3,0
<i>B. niacini</i> TC- 8101S	0,9	43,3±2,3	43,3±2,3	44,0±2,8	44,0±2,0
<i>B. psychrodurans</i> LV-1106E	0,7	42,7±1,1	44,0±2,0	43,0±2,8	43,0±1,4

Для культивирования микробных штаммов в минеральной среде М9 с углеводородным субстратом была увеличена исходная посевная доза микроорганизмов, приготовленная путем смыва стерильным физиологическим раствором суточных культур с ГРМ-агара 2-3 чашек Петри. В среду М9 в качестве единственного источника углерода и энергии добавлен глицерин в тех же концентрациях, что и вазелиновое масло в первом эксперименте. На основе получившихся в результате повторного эксперимента данных была составлена таблица 2.

Таблица 2 – Эмульгирующая активность *B. alcalophilus* WS-3027В и *B. funiculus* LY-2403G

Бактерии	Мутность бактериальной суспензии, McF	Эмульгирующая активность по отношению к нефти, %			
		эндогенная		экзогенная	
		E ₂₄	E ₄₈	E ₂₄	E ₄₈
<i>B. funiculus</i> LY-2403G	0,7	53,0±1,4	62,0±3,4	58,6±3,1	54,0±0,0
<i>B. alcalophilus</i> WS-3027В	1,8	70,0±2,6	68,7±1,1	74,0±2,8	74,0±2,8

У бактерий *B. alcalophilus* WS-3027В и *B. funiculus* LY-2403G через 24 ч эндогенная активность составила 70,0 и 53,0 % (рисунок 2), через 48 ч – 68,7 и 62,0 % (рисунок 3). Экзогенная эмульгирующая активность у данных бактерий через 24 ч составила 74,0 и 58,6 %, через 48 часов – 74,0 и 54,0 %.

Таким образом, при увеличении исходной посевной дозы в 3,5 раза эндогенная эмульгирующая активность *B. funiculus* LY-2403G через 24 ч увеличилась на 13 %, через 48 часов – на 33 %; экзогенная эмульгирующая

активность *B. funiculus* LY-2403G через 24 ч увеличилась на 30 %, через 48 часов – на 20 %.

При увеличении исходной посевной дозы в 6 раз эндогенная эмульгирующая активность *B. alcalophilus* WS-3027B через 24 ч увеличилась на 20 %, через 48 часов – также на 20 %; экзогенная эмульгирующая активность *B. alcalophilus* WS-3027B через 24 ч увеличилась на 28,7 %, через 48 часов – на 30,1 %.

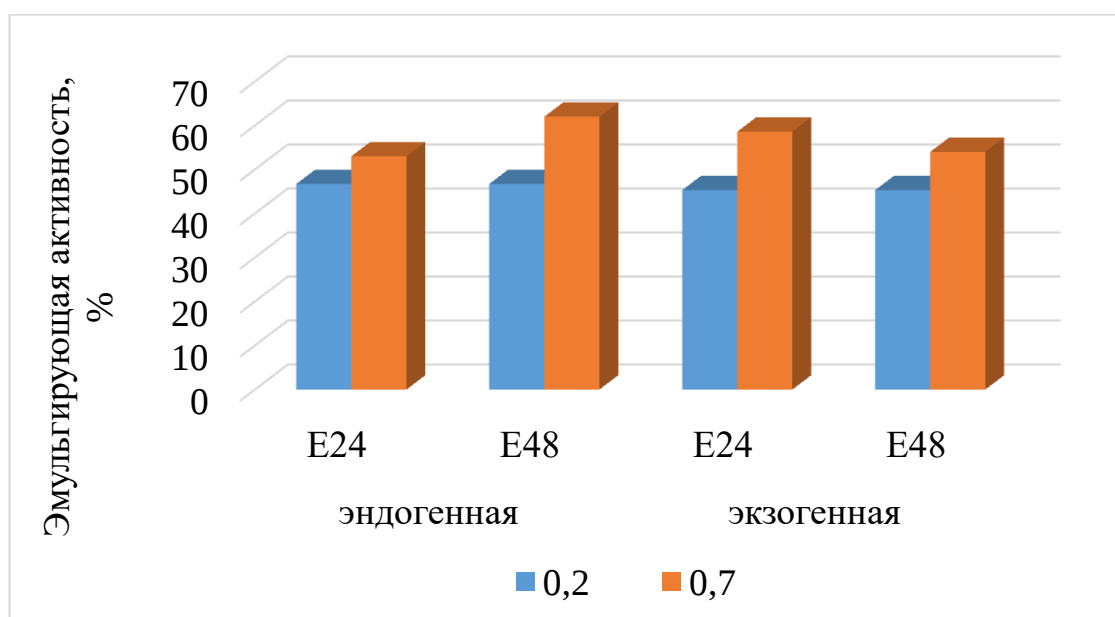


Рисунок 2 – Эндогенная и экзогенная эмульгирующая активность *B. funiculus* LY-2403G при различной посевной дозе

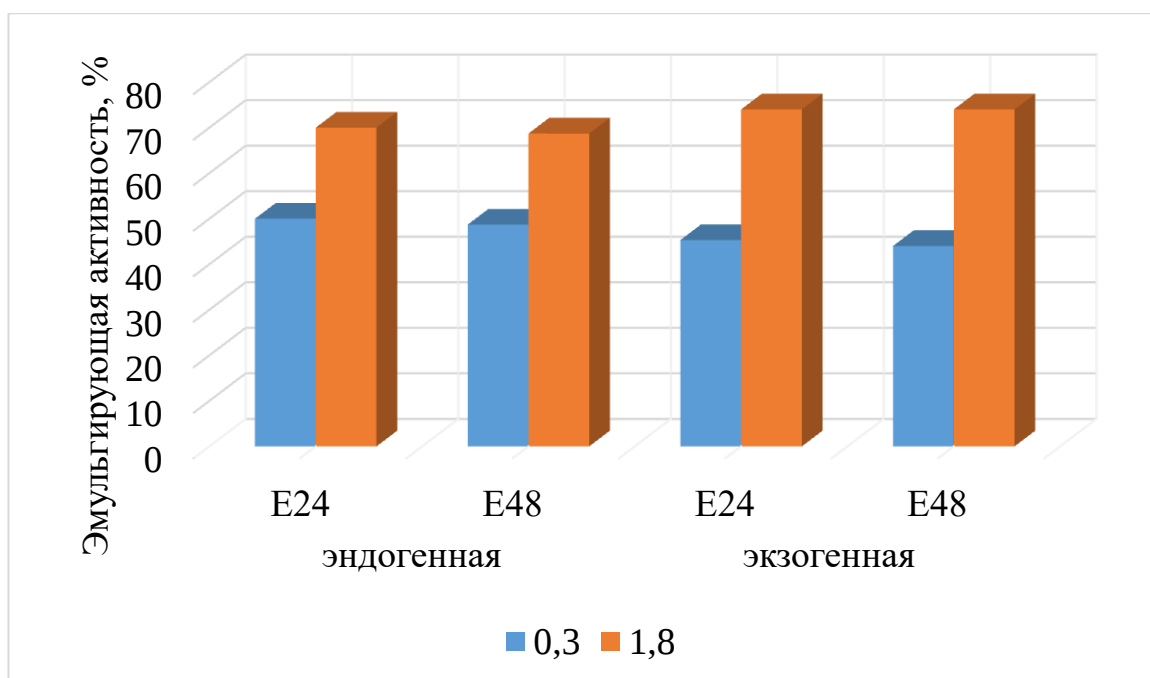


Рисунок 3 – Эндогенная и экзогенная эмульгирующая активность *B. alcalophilus* WS-3027B при различной посевной дозе

Проявленная этими бактериями высокая экзогенная эмульгирующая активность в отношении нефти, свидетельствует о возможном синтезе ими биоПАВ. Эти результаты указывают на возможные преимущества данных бактерий в процессах утилизации нефтяных углеводородов, т.к. биоэмульгирующая активность микроорганизмов в сочетании с биodeградирующей способностью сможет обеспечить большую биодоступность углеводородов в различных условиях окружающей среды.

Следующим экспериментом был проведен подсчет количества бактериальных клеток в суспензии. Для приготовления бактериальных суспензий использован метод «обжига шпателя» ввиду способности штаммов к вращению в питательную среду. Полученные суспензии (объем 10 мл) характеризовались следующими параметрами: для *B. alcalophylis* WS-3027B: мутность 0,3 McF, оптическая плотность 0,1 ед. (при $\lambda=540$ нм); для *B. funiculus* LY-2403G: мутность 0,2 McF, оптическая плотность 0,015 ед. Б (при $\lambda=540$ нм).

Условно предположив, что в полученных суспензиях содержится около 10^8 кл/мл, мы провели серийное разведение исходных суспензий в диапазоне

от 10^8 до 10^0 . Из каждого разведения выполнен посев на ГРМ-агар в нескольких повторностях с последующей инкубацией при 28°C в течение 48 часов. При подсчёте колоний были определены следующие показатели (таблица 3): количество клеток *B. alcalophilus* WS-3027B составило $2,7 \times 10^9$ КОЕ/мл, количество клеток *B. funiculus* LY-2403G составило $1,8 \times 10^9$ КОЕ/мл.

В дальнейшем определили показатель гидрофобности клеточной стенки изучаемых бактерий по методу Е.В. Серебряковой. Эксперимент проведён в двух вариантах:

- Культивирование на питательной среде ГРМ-агар.
- Культивирование в минеральной среде М9 с глицерином в качестве единственного источника углерода.

Таблица 3 – Показатели бактериальных суспензий *B. alcalophilus* WS-3027B и *B. funiculus* LY-2403G

Микроорганизмы	Показатели		
	Мутность бактериальной суспензии, McF	Оптическая плотность, ед.	Количество клеток, КОЕ/мл
<i>B. alcalophilus</i> WS-3027B	0,3	0,1	$2,7 \times 10^9$
<i>B. funiculus</i> LY- 2403G	0,2	0,015	$1,8 \times 10^9$

После этого измерена оптическая плотность водной фазы. Результаты эксперимента приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 – Показатель гидрофобности клеточной стенки у исследованных штаммов при культивировании на МПА

Штамм	ОП0	Средн. ОП1	ПГ, %
<i>B. halodurans</i> МН-3011N	0,23	0,225±0,01	2,17±0,10
<i>B. niacini</i> TC-8101S	0,22	0,13±0,00	40,91±0,00
<i>B. alcalophylis</i> WS-3027B	0,24	0,155±0,35	35,42±14,91
<i>B. funiculus</i> LY-2403G	0,23	0,125±0,35	45,65±14,91
<i>B. psychrodurans</i> LV-1106E	0,24	0,235±0,05	2,08±2,08

На первом этапе наибольшую гидрофобную активность проявили *B. alcalophylis* WS-3027B, *B. funiculus* LY-2403G, *B. niacini* TC-8101S. Высокий показатель гидрофобности клеточной стенки данных штаммов даёт основания полагать, что их нефтедеструкторные и эмульгирующие способности в долгосрочной перспективе выше, чем у штаммов *B. halodurans* МН-3011N, *B. niacini* TC-8101S.

На втором этапе исследования бактериальные культуры были засеяны в колбы с подготовленной минеральной средой М9 и культивированы в течение 48 часов с глицерином в качестве единственного источника питания. По прошествии 48 часов бактериальные суспензии были доведены до общей оптической плотности 0,22-0,23 ($\lambda=440$ нм). Для оценки показателя гидрофобности был использован метод Серебряковой, методика не отличалась от первого варианта эксперимента.

Результаты эксперимента представлены в таблице 5:

Таблица 5 –Показатель гидрофобности клеточной стенки у исследованных штаммов при культивировании на минеральной среде М9 с глицерином

Штамм	ОП0	Средн. ОП1	ПГ, %
<i>B. halodurans</i> МН-3011N	0,045	0,035±0,00	22,22±0,00
<i>B. niacini</i> TC-8101S	0,06	0,038±0,005	38,00±0,725
<i>B. alcalophylis</i> WS-3027B	0,08	0,058±0,005	28,13±6,13
<i>B. funiculus</i> LY-2403G	0,05	0,125±0,35	55,00±5,00

Во втором варианте эксперимента наибольшую гидрофобную активность вновь проявили *B. alcalophylis* WS-3027B, *B. funiculus* LY-2403G, *B. niacini* TC-8101S. В ходе этого исследования штамм *B. halodurans* МН-3011N показал существенно большие значения гидрофобности клеточной стенки, нежели при выращивании на ГРМ-агаре (рисунок 4).

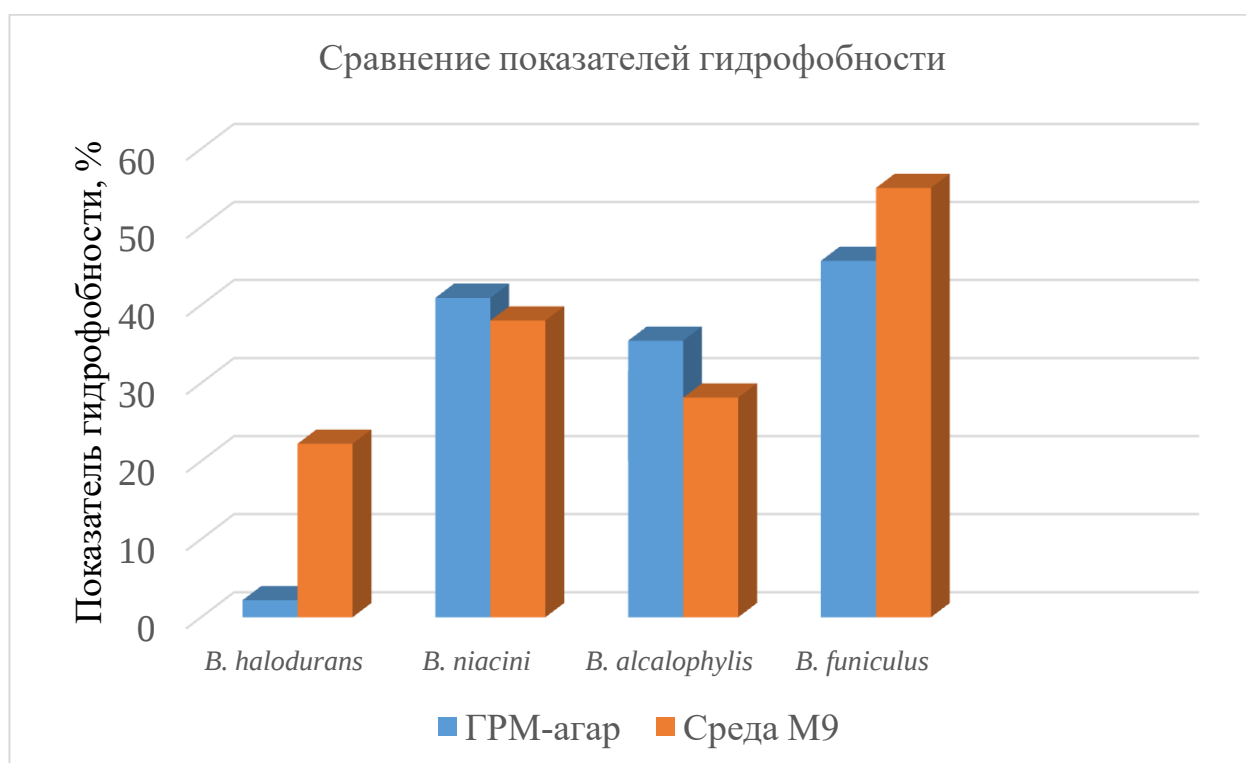


Рисунок 4 – Показатель гидрофобности бактериальных клеток после их культивирования в жидкой минеральной среде М9 с глицерином в качестве единственного источника углерода и энергии

Заключение. Вопрос биоремедиации загрязненных нефтью почв при помощи микроорганизмов не теряет свою актуальность. Были проведены эксперименты по определению эмульгирующей активности 5 штаммов микроорганизмов, выделенных из почв г. Когалыма. По результатам исследований, все 5 штаммов показали высокие поверхностно-активные свойства, что делает перспективным их применение для очистки экосистем, загрязненных нефтью.

В дальнейшем были проведены исследования показателя гидрофобности бактериальных клеток данных 5 штаммов, определены значения, соответствующие каждому штамму. Согласно результатам исследования, штаммы *B. alcalophylis* WS-3027B, *B. funiculus* LY-2403G, *B. niacini* TC-8101S имеют высокий показатель гидрофобности, что делает их перспективными для дальнейших исследований в области нефтедеструкции и для применения на практике, в качестве биодобавок в почвенные среды, воды, либо для приготовления препаратов-нефтедеструкторов.

Выводы. 1. Обнаружено, что при использовании в эксперименте культуральной среды с мутностью 0,7-0,9 McF бактерий *B. halodurans* MH-3011N, *B. niacini* TC-8101S и *B. psychrodurans* LV-1106E и мутностью 0,2-0,3 McF бактерий *B. funiculus* LY-2403G и *B. alcalophilus* WS-3027B эндогенная эмульгирующая активность составила через 24 ч 40-50 %, через 48 ч 43-49 %. Экзогенная эмульгирующая активность через 24 и 48 ч составила 43-45 %. Максимальная активность наблюдалась у *B. funiculus* LY-2403G и *B. alcalophilus* WS-3027B.

2. Показано, что при увеличении исходной посевной дозы в 3,5 раза эндогенная эмульгирующая активность *B. funiculus* LY-2403G через 24 ч увеличилась на 13 %, через 48 часов – на 33 %; экзогенная эмульгирующая

активность через 24 ч увеличилась на 30 %, через 48 часов – на 20 %. При увеличении исходной посевной дозы в 6 раз эндогенная эмульгирующая активность *B. alcalophilus* WS-3027В через 24 и 48 ч увеличилась на 20 %; экзогенная эмульгирующая активность *B. alcalophilus* WS-3027В через 24 и 48 ч увеличилась на 30 %.

3. Показатель гидрофобности клеточной стенки углеводородокисляющих бактерий после их культивирования на плотной агаризованной питательной среде был высоким у штаммов: *B. funiculus* LY-2403G, *B. alcalophilus* WS-3027В и *B. niacini* TC-8101S, составляя 35-45 %, после культивирования в жидкой минеральной среде М9 с глицерином показатель гидрофобности увеличился у штамма *B. halodurans* МН-3011N (в 10 раз) и у штамма *B. funiculus* LY-2403G (в 1,2 раза).

Список использованных источников

- 1 Борзенков, И. А. Разработка научных основ новых технологий очистки природных и техногенных экосистем от загрязнения нефтью и нефтепродуктами с использованием биопотенциала микроорганизмов / И. А. Борзенков, А. Л. Тарасов, С. С. Беляев // Георесурсы, геоэнергетика, геополитика. – 2012. – №2 – С. 1-16.
- 2 Ecological and microbiological features of the soils of the city of Kogalym / Ye. V. Pleshakova [et al.] // II International Scientific Forum on Sustainable Development and Innovation (WFSDI 2023). Conference Proceedings. – Ekaterinburg: Institute of Digital Economics and Law LLC, 2024. – P. 1230-1236.
- 3 Cooper, D. G. Surface-active compounds from microorganisms / D. G. Cooper, J. E. Zajic // J. Appl. Microbiol. – 1980. – Vol. 26. – N 3 – P. 229-253.
- 4 Оценка гидрофобных свойств бактериальных клеток по адсорбции на поверхности капель хлороформа / Е. В. Серебрякова [и др.] // Микробиология. – 2002. – Т. 71, № 2. – С. 237-239.