

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
ПОЧВ Г. КОГАЛЫМ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

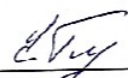
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Венедюхиной Елизаветы Павловны

Научный руководитель:


доцент, канд. биол. наук


30.05.23

Е. В. Глинская

Зав. кафедрой:

профессор, доктор биол. наук


30.05.23

С. А. Степанов

Саратов 2023 год



Введение

К числу наиболее опасных экологических проблем современного мира относится проблема загрязнения почвы тяжелыми металлами и углеводородами, которые попадая в почву, способны не только аккумулироваться в ней и распространяться на огромные расстояния, но и переходить из одной среды в другую, участвуя в биосферном круговороте [1].

Огромное количество органических соединений поступает в почву при освоении нефтегазовых ресурсов, что приводит к тому, что данный вид загрязнения становится приоритетным для многих районов нефтедобычи. Наибольшую опасность представляют вещества группы полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) [2]. Загрязнение углеводородами относится к четвертому классу опасности, когда оно содержится в почве в количестве 10 г / кг почвы. При загрязнении почвы нефтью и нефтепродуктами нарушаются её физические и химические характеристики такие как, температура, рН, способность удерживать влагу, проницаемость и обмен воздуха в почве. Микрофлора, которая живет во всех слоях почвы, погибает практически полностью, а вместе с ней растения и животные [3].

Нередко масштабы загрязнения почвы оказываются настолько большими, что ее способности к самоочищению не хватает и поэтому стоит острая необходимость в разработке и совершенствовании технологий биоремедиации. Наиболее перспективным направлением в технологиях рекультивации почвенных систем, зараженных органическими поллютантами, считается биодеструкция [4]. В большинстве случаев в данных биотехнологиях используются биопрепараты, которые содержат жизнеспособные клетки как отдельных штаммов углеводородокисляющих микроорганизмов («Путидойл», «Олеворин») так и бактериальные консорциумы, например, «Деворойл». Известно, что использование именно смешанных культур, состоящих из двух и более микроорганизмов, повышает эффективность биодеградациии нефти и нефтепродуктов [5].

Процессы биогенного окисления углеводов очень сложны и еще достаточно хорошо не изучены, а способность микроорганизмов использовать углеводородные субстраты обладает избирательностью [6]. Все это толкает исследователей на поиск эффективных штаммов деструкторов.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось изучение биологических свойств углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв г. Когалым.

Для реализации указанной цели были сформулированы следующие задачи.

1. Изучить диапазон устойчивости бактерий к физико-химическим факторам.
2. Определить спектр субстратов, используемых бактериями.
3. Исследовать факторы патогенности и вирулентности бактерий.
4. Выявить воздействие исследуемых штаммов на ростовые показатели двудольных и однодольных растений.
5. Установить наличие антагонистической активности бактерий, выделенных из почв г. Когалым, по отношению к гетеротрофным почвенным микроорганизмам.

Материал и методы исследования. Объектами исследования являлись углеводородокисляющие бактерии, ранее выделенные в ходе предыдущих исследований из почв г. Когалым в 2021-2022 гг. – *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Bacillus alcolophilus*, *Bacillus niacini*, *Bacillus psychrodurans*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus funiculus*. Отбор почвенных проб проводили сотрудники Центра исследования керна и пластовых флюидов Филиала ООО «ЛУКОЙЛ-Инжиниринг» «КогалымНИПИнефть» в г. Тюмени.

На первом этапе проводили определение диапазона устойчивости штаммов к физико-химическим факторам. Для изучения устойчивости к высокой и низкой температуре осуществляли посев на ГРМ-агар (Оболенск, Россия) и культивировали при температуре 43 и 10°C. При изучении влияния водородного показателя использовали ГРМ-бульон (Оболенск, Россия)

с различными значениями pH (1, 2, 3, 4, 5, 9, 10). При изучении влияния концентрации хлорида натрия на рост углеводородокисляющих бактерий использовали ГРМ-агар (Оболенск, Россия) с разной концентрацией NaCl (2, 5, 7, 10, 15 %). Культивирование осуществляли при температуре 28°C.

Определение спектра используемых субстратов проводили методом высева данных бактерий на плотные дифференциально-диагностические питательные среды с источниками специфических субстратов [7].

Сахаролитическую активность проверяли на средах Гисса. В качестве субстратов исследуемые штаммы использовали: моносахариды (глюкоза, сорбит, арабиноза, ксилоза, манит), олигосахариды (мальтоза, сорбит, лактоза). Активность амилаз проверяли на среде, содержащей крахмал (pH 6,0) (г/л): крахмал – 2,0; пептон – 0,5; K₂HPO₄ – 0,3; MgSO₄ – 0,1; агар-агар – 15,0. Целлюлолитическую активность определяли на среде следующего состава (pH 6,0) (г/л): порошковая целлюлоза – 2,0; NaNO₃ – 2,0; K₂HPO₄ – 1,0; MgSO₄ – 0,5; KCl – 0,5; дрожжевой экстракт – 0,1; агар-агар – 17,0. Пектинолитическую активность определяли на среде с порошковым яблочным пектином (pH 6,0) (г/л): порошковый пектин - KH₂PO₄– 4,0; Na₂HPO₄– 6,0; (NH₄)₂SO₄– 2,0; FeSO₄– 0.001; дрожжевой экстракт – 0,1; MgSO₄– 0.2; CaCl₂– 0.001; CuSO₄– 0.00005; MnSO₄– 0.00001; ZnSO₄– 0.00001; MoO₃– 0.000001; голодный агар-агар – 15,0.

Липолитическую активность устанавливали на средах, содержащих поверхностно-активные вещества – твин-80, либо с растительными маслами. Состав среды с твин 80 (pH 7,4) (г/л): твин-80 - 10,0; триптон – 10,0; NaCl – 5,0; CaCl₂×H₂O – 0,1; агар-агар – 20,0. Среда с растительными маслами (7,2-7,4) (г/л): NH₄Cl – 20,0; NH₄NO₃ – 4,0; Na₂SO₄×10 H₂O – 8,0; K₂HPO₄×3H₂O – 15,7; KH₂PO₄×3H₂O – 5,6; MgSO₄×7H₂O – 0,4; агар-агар – 10,0; растительное масло – 1,0. Использовали подсолнечное, рыжиковое, горчичное, льняное, оливковое масло.

Гидролиз желатины выявляли посевом уколом в мясо-пептонную желатину. Способность расщеплять мочевины исследовали на среде с

добавлением 20%-ной мочевины (рН 6,0) (г/л): 20 %-ный раствор мочевины , $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ - 5; K_2HPO_4 – 5; цитрат натрия – 5. Использование азота минеральных солей проверяли на следующих средах (рН 6,0) (г/л): глюкоза- 20; KH_2PO_4 – 1; MgSO_4 – 0,5; NaCl – 0,5; ГРМ-агар – 1,5. В одном случае вносят NH_4Cl – 1 г. и CaCO_3 - 5 г., а в другом NH_4Cl – 1 г. Способность к фиксации молекулярного азота определяли посевом на безазотистую среду Эшби.

Посев исследуемых культур осуществляли штрихом или уколом и инкубировали при температуре 28°C. О ферментативной активности судили по диаметру зон гидролиза субстрата или изменению цвета индикатора среды. Для визуализации зон гидролиза, в некоторых случаях, использовали дополнительные вещества – раствор Люголя и 0,05 %-ный спиртовой раствор бромтимолового синего для поверхностно-активных веществ и пектинов.

Выявление фитопатогенных свойств проводили путем теста на мацерацию, производимую по стандартной методике [7, 8]. В стерильные чашки Петри раскладывали диски из фильтровальной бумаги, смачивали стерильным физиологическим раствором. На поверхность помещали диски стандартных тест-объектов диаметром 1 см и толщиной 0,5 см: клубни картофеля и корнеплоды моркови, редиса и свеклы, листья капусты. Исследуемую культуру петлей наносили на диски растительных тканей и инкубировали при 28°C в течение 48-72 ч. Оценку фитопатогенного влияния проводили визуально и касанием петли. Патогенные свойства по отношению к животным определяли посредством нескольких тестов: гемолиз, плазмокоагулазная, фибринолитическая активность, способность к гидролизу лецитина, а также наличие ферментов ДНКазы и РНКазы.

Для определения влияния исследуемого штамма на ростовые показатели семян использовали тест-культуру растений – семена пшеницы посевной и редиса. Определение данной способности проводили по стандартной методике, заключающейся в инокуляции семян тестового растения 1 мл суспензии бактерий в различной концентрации и проращиванию обработанных семян на фильтровальной бумаге при 28°C в течение 5 суток [7].

Определение антагонистической активности исследуемых бактерий проводили методом агаровых блоков [9]. Исследуемый штамм и тест-культуры бактерий выращивали на плотной среде ГРМ при температуре 28°C в течение 24–48 ч. Из исследуемых тест-культур готовили взвеси в стерильной дистиллированной воде по стандарту мутности 10 единиц и проводили посев газоном по 100 мкл взвеси каждой тест-культуры на поверхность среды. Далее вырезали агаровые блоки, которые с помощью стерильного скальпеля раскладывали на чашки Петри с газонами бактерий. Раскладывали по 3 блока на каждую чашку Петри на равном расстоянии друг от друга, плотно прижимая к поверхности среды. Посевы тест-культур бактерий инкубировали при 28°C 24–48 ч., 3–5 суток. По окончании времени инкубации измеряли диаметры зон ингибирования роста тест-культур в миллиметрах (мм).

Структура и объем работы. Работа изложена на 54 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 14 таблицами и 7 рисунками. Список использованных источников включает в себя 47 наименований.

Основное содержание работы

В главе «Обзор литературы» представлена краткая характеристика различных антропогенных загрязнений и их влияние на структуру, и состояние почвы. Приведены сведения о санитарных нормах предотвращающие будущие техногенные загрязнения, а также мониторинговых системы для контроля надчистотой почв.

В главе «Результаты исследования» описаны и проанализированы устойчивость к физико-химическим факторам, спектр используемых субстратов, факторы патогенности, влияние на прорастание семян однодольных и двудольных растений и антагонистические свойства углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв г. Когалым.

Анализ исследования устойчивости к физико-химическим факторам показал, что из изучаемых штаммов 67 % способны к росту при широком диапазоне температур от 10 до 43°C. Все исследуемые штаммы предпочитают

слабощелочные значения pH, 70 % штаммов предпочитают диапазон от 3 до 5. Большинство штаммов предпочитают небольшие концентрации солей, только 30 % штаммов способны к росту при высоких концентрациях солей в среде. В ходе проделанной работы было выяснено, что штаммами, способными расти в широких диапазонах температур оказались *B. niacini*, *B. psychrodurans*, *B. funiculus*. Наиболее ацидофильными штаммами оказались *B. niacini* и *B. halodurans*. Рост при высоких концентрациях солей осуществляли только *B. niacini*, *B. psychrodurans* и *C. flaccumfaciens*.

В результате исследования спектра используемых субстратов было выяснено, что наиболее востребованным источником углерода являются лактоза и крахмал. Половина штаммов способна ферментировать лактозу с образованием кислоты, а крахмал способны использовать все штаммы. Из всех представленных штаммов наибольшую активность проявляет *B. funiculus*. Он способен окислять все представленные олигосахариды, из полисахаридов он использует крахмал и все моносахариды, кроме сорбита. Самым востребованным липидом оказался, согласно проведенным опытам, твин 80 его в качестве источника углерода использует 100 % штаммов. По отношению к другим субстратам исследуемые бактерии обладают низкой липолитической активностью, только 16% штаммов использовало подсолнечное масло, такой же процент пришелся на горчичное и оливковое масло, 33% у льняного масла, рыжиковое не было использовано ни одним штаммом.

При изучении использования различных источников азота результаты показали, что 100 % штаммов используют неорганические соединения азота, в лице солей аммония и нитратов. Органический азот не использует только *B. funiculus*. К фиксации азота не способен только *C. flaccumfaciens*, всех остальных можно причислить к diaзотрофам. Из проведенных исследований можно сделать вывод, что углеводородокисляющие бактерии г. Когалым способны использовать широкий круг источников азота.

Для изучения патогенности данных бактерий были проведены тесты на патогенность по отношению к растениям и животным. Результаты

исследования показали, что исследуемые штаммы бактерий рода *Bacillus* способны мацерировать свёклу, а такие виды как *B. niacini*, *B. halodurans* и *B. funiculus* разлагают такие субстраты, как морковь, картофель и редис. Капусту способны мацерировать только два вида рода *Bacillus* и бактерии рода *Curtobacterium*. Наиболее активно разлагают растительные ткани бактерии *B. halodurans* и *B. funiculus*. Менее выраженной способностью к мацерации обладает *B. psychrodurans*.

Отрицательный результат показали все тесты на гемолиз, а это означает, что наши бактерии не обладают ферментами способными разрушать мембраны эритроцитов. Ферментов способных разрушать плазму крови, образуя сгусток, также обнаружить, не удалось, из чего следует отрицательный тест на фибринолизин. К гидролизу лецитина способны 50 % наших штаммов, что может свидетельствовать о наличии у *B. alcolophilus*, *B. niacini* и *B. funiculus* фермента лецитиназы. Ферментами разрушающими дезокси- и рибонуклеиновые кислоты обладают также 50 % штаммов все из них представители рода *Bacillus*.

Результаты исследования влияния бактерий на прорастание семян двудольных и однодольных растений показали, что максимальный фитостимулирующий эффект наблюдается при обработке семян однодольных и двудольных растений суспензией бактерий *B. psychrodurans*. Эти бактерии стимулировали рост корней пшеницы и редиса в концентрации 10^5 и 10^6 КОЕ/мл. Из литературы на данную тему известно, что внесение перспективных бактериальных инокулянтов может стимулировать рост и развитие растения, за счет тесных взаимодействий с растением-хозяином и другими участниками микробиоценоза, фиксации атмосферного азота, продукции фитогормонов и ферментов, растворении недоступных элементов минерального питания [10].

Большой части бактерий рода *Bacillus* присущи высокие антагонистические свойства они подавляют рост около 40 % тест-культур. Рост 63 % штаммов выделяемыми *B. halodurans*. Низкую

антагонистическую активность проявляли *C. flaccumfaciens* и *B. alcolophilus* – они подавляют два вида исследуемых штаммов гетеротрофов, а *B. niacini* оказывает негативное влияние на рост только одного штамма. Высокая антагонистическая активность замечена у *B. psychrodurans* и *B. funiculus* – они подавили три вида гетеротрофных микроорганизмов, а *B. halodurans* угнетает рост пяти гетеротрофных микроорганизмов из восьми.

Выводы

1. 67 % углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв г. Когалым, способны к росту в широком диапазоне температур от 10 до 43 °С. 100 % штаммов предпочитают щелочные значения pH (8-10), 70 % штаммов – кислые (3 - 5). 30 % изолятов устойчивы к концентрации хлорида натрия в среде до 15 %.

2. 100 % углеводородокисляющих бактерий, выделенных из почв г. Когалым, способны использовать твин 80 и крахмал в качестве источника углерода. 50 % штаммов утилизируют лактозу. 100 % изолятов используют органические и неорганические источники азота, за исключением *B. funiculus*, который не гидролизует белок и мочевины, и *C. flaccumfaciens*, который не способен к фиксации молекулярного азота.

3. 100 % исследуемых штаммов способны к мацерации тканей корнеплодов свёклы, 70 % бактерий мацерируют ткани корнеплодов моркови и листьев капусты. 50 % штаммов обладают факторами патогенности: ферментами лецитиназой, ДНК-азой и РНК-азой.

4. Выраженный ростстимулирующий эффект наблюдается при обработке семян однодольных растений суспензией бактерий. *B. psychrodurans* в концентрациях 10^5 и 10^6 КОЕ/мл. Положительное влияние на рост корня наблюдается при обработке семян двудольных растений взвесью бактерий *B. niacin* в концентрации 10^5 КОЕ/мл и *B. psychrodurans* в концентрации 10^6 КОЕ/мл.

5. Углеводородокисляющие бактерии *C. flaccumfaciens* и *B. alcolophilus* подавляют 25 % аборигенных гетеротрофных бактерий. *B. psychrodurans* и

B. funiculus подавляют 38 % гетеротрофов. *B. halodurans* угнетает рост 63 % гетеротрофных бактерий, только *B. niacini* оказывает негативное влияние на рост 12 % тест-штаммов.

Список использованных источников

1 Нгун, Т. К. Эколого микробиологические особенности антропогенно-преобразовательных степных почв с разными магнитными и термомагнитным и свойствами дис. ... канд. биолог. наук / Т. К. Нгун. - Саратов, 2019. - 170 с.

2 Особенности фракционного состава полициклических ароматических углеводородов и полиэлементного загрязнения почв урбанизированных территорий и их гигиеническая характеристика (на примере почв функциональных зон Санкт-Петербурга) / Г. А. Шамилишвили [и др.] // Гигиена и санитария. - 2016. - №95. - С. 827-837.

3 Мужехоев, А. А. Специфика загрязнения почвы нефтепродуктами / А. А. Мужехоев, Я. М. Шадиева, З. И. Дзармотова // Достижения науки и образования. - 2022. - №1. - С. 1-3.

4 Филиппова, Л. С. Загрязнение почвы и биологические методы ее очистки /Л. С. Филиппова, А. С. Акимова // Международный научно-исследовательский журнал. - 2022. - №11. - С. 1-6.

5 Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводородов нефти / А. А. Ветрова [и др.] // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. - 2013. - №2. - С. 241-257.

6 Тимергазина, И. Ф. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами / И. Ф. Тимергазина, Л. С. Переходова // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2012. - №1. - С. 1-28.\

7 Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов [и др.] - М.: Академия, 2005. - 608 с.

8 Малышина, М. С. Выявление факторов фитопатогенности у бактерий-ассоциантов некоторых видов тли в Саратовской области /

6 Тимергазина, И. Ф. К проблеме биологического окисления нефти и нефтепродуктов углеводородокисляющими микроорганизмами / И. Ф. Тимергазина, Л. С. Переходова // Нефтегазовая геология. Теория и практика. - 2012. - №1. - С. 1-28.\

7 Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов [и др.] - М.: Академия, 2005. - 608 с.

8 Малышина, М. С. Выявление факторов фитопатогенности у бактерий-ассоциантов некоторых видов тли в Саратовской области / М. С. Малышина, А. М. Петерсон, С. Ю. Балтаева // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. - 2013. - Том 13. - Вып.2. - С. 49-53.

9 Антагонистическая активность бактерий *Bacillus velezensis* / Д. Л. Басалаева [и др.] // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология. - 2022. - Том 22. - Вып. 1. - С. 57-63.

10 Прорастание семян злаков под влиянием композиций азотфиксирующих и фосфатмобилизирующих бактерий из почв, возделываемых в условиях Дальнего Востока / М. Л. Сидоренко [и др.] // Сельскохозяйственная биология. - 2021. - №1. - С. 146-157.

