

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Специальность: 06.03.01 – биология


ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Дипломная работа

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ  
ДЕНИТРИФИКАТОРОВ**

Работа завершена:

«11» 06 2023 г.



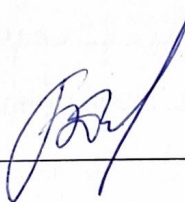
(Э.Р. Гильмутдинова)

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., доцент кафедры генетики

«13» 06 2023 г.



(Э.В. Бабынин)

Заведующий кафедрой

д.б.н., доцент

«13» 06 2023 г.



(А.Р. Каюмов)

Казань – 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Денитрификация у бактерий .....	7
1.1.1 Представление о денитрификации .....	7
1.1.2 Влияние экзогенных факторов на денитрификацию .....	9
1.2 Роль денитрификации .....	10
1.2.1 Глобальный азотный цикл .....	10
1.2.2 Токсические и негативные эффекты нитратов, нитритов и промежуточных продуктов денитрификации на человека и окружающую среду .....	11
1.2.3 Применение денитрифицирующих микроорганизмов .....	13
1.3 Генетические основы диссимиляционной денитрификации .....	14
1.4 Краткая характеристика исследуемых штаммов .....	16
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	19
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	19
2.1 Используемые материалы, реактивы, приборы и программы .....	19
2.1.1 Используемые реактивы .....	19
2.1.2 Селекция денитрифицирующих бактерий .....	19
2.1.3 Препараты ДНК .....	20
2.1.4 Оборудование .....	21
2.1.5 Программы и ресурсы .....	21
2.2 Молекулярно-биологические методы .....	21
2.2.1 Выделение геномной ДНК .....	21

2.2.2 ПЦР-амплификация ДНК .....	22
2.2.3 Электрофорез .....	22
2.2.4 Секвенирование .....	22
2.2.5 Скрининг метаболической активности бактерий .....	23
2.3 Биоинформатические методы .....	24
2.4 Статистическая обработка данных .....	24
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>25</b>
3.1 Идентификация микроорганизмов .....	25
3.2 Метаболическая активность штаммов в средах Виноградского и Александрова с содержанием различных источников азота .....	27
3.3 Метаболическая денитрифицирующая активность штаммов в средах Виноградского и Александрова с нитратом .....	27
3.4 Влияние pH на активность денитрификаторов в среде Виноградского	31
3.5 Идентификация гена <i>narA</i> у <i>Shinella zooglooides</i> .....	32
3.6 Метаболическая азотфиксирующая активность штаммов в средах Виноградского и Александрова .....	33
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>35</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>36</b>



## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
П.н.	Пар нуклеотидов
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
16S rRNA	Рибосомальная рибонуклеиновая кислота с константой седиментации, равной 16
DCPIP	2,6-дихлорфенолиндофенол
EDTA	Этилендиаминтетрауксусная кислота
NAP	Оксигенная NO <sub>3</sub> -редуктаза
NAR	Аноксигенная NO <sub>3</sub> -редуктаза
NAS	Ассимиляционная NO <sub>3</sub> -редуктаза
NIR	NO <sub>2</sub> -редуктаза
NOR	NO-редуктаза
NOS	N <sub>2</sub> O-редуктаза
SDS	Лаурилсульфат натрия

## ВВЕДЕНИЕ

Азот повсеместно присутствует в биосфере, атмосфере, гидросфере и литосфере в органическом и неорганическом виде, оказывает ощутимое влияние на планету. Изучение процессов круговорота азота позволяет рассматривать глобальный азотный цикл, в котором изучение роли прокариотов в способности к денитрификации, нитрификации, азотфиксации и анаммокса расширяет возможности прогнозирования баланса азотного цикла и темпов глобального потепления, оценки влияния антропогенного вмешательства в цикл, использования микроорганизмов в очистных мероприятиях и снижения негативного воздействия азот содержащих токсичных соединений.

Обеспокоенность вызывает увеличение содержания нитратов и нитритов в сточных и питьевых водах, в почве, в продуктах питания. Известно, что повышение их содержания отрицательно сказывается на здоровье человека. К примеру, нитриты влияют на гемоглобин, превращая его в метгемоглобин, тем самым вызывая болезнь метгемоглобинемии — неспособность связывания кислорода. Также известно, что  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NO}_2^-$  соединения участвуют в образовании канцерогенных N-нитрозосоединений в организме человека, которые могут стать причиной рака желудка.

Денитрификация — многостадийное полное или неполное восстановление азота из нитратов  $\text{NO}_3$  и нитритов  $\text{NO}_2$ , среди микроорганизмов как денитрификаторы наиболее известны *Preudomonas*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Moraxella* и *Hyphomicrobium*. Исследование денитрификации усложняется уникальностью в процессах восстановления азота для каждого вида прокариот, при этом с каждым годом дополняется база обнаруженных денитрификаторов.

**Цель** данной работы: выявить способность к денитрификации среди штаммов, выделенных из почвы Татарстана.

**Задачи, основанные на цели:**

- 1) Идентифицировать видовую принадлежность штаммов посредством выделения 16S rRNA;
- 2) Оценить денитрифицирующую активность штаммов в средах с разными источниками азота;
- 3) Выявить наличие гена, отвечающего за нитрат-редукцию, у наиболее активно растущего штамма;
- 4) Оценить азотфиксирующую активность штаммов денитрификаторов.





**АНТИПЛАГИАТ**  
ОБНАРУЖЕНИЕ ЗАИМСТВОВАНИЙ

## СПРАВКА

Казанский (Приволжский) федеральный университет

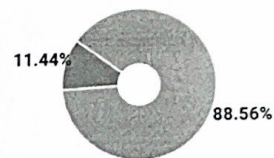
о результатах проверки текстового документа  
на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ АНТИПЛАГИАТ.СТРУКТУРА

Автор работы: Гильмутдинова Эльмира Радиковна  
Самоцитирование  
рассчитано для: Гильмутдинова Эльмира Радиковна  
Название работы: Дипломная работа. Гильмутдинова, 01-902  
Тип работы: Не указано  
Подразделение:

### РЕЗУЛЬТАТЫ

СОВПАДЕНИЯ 11.44%  
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ 88.56%  
ЦИТИРОВАНИЯ 0%  
САМОЦИТИРОВАНИЯ 0%



ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 29.05.2023

Структура документа: Проверенные разделы: основная часть с.1-21

Модули поиска: ИПС Адилет; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс\*; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley; eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ: аналитика; СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация; Модуль поиска "КПФУ"; Медицина; Диссертации НББ; Коллекция НБУ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика; Перефразирования по Интернету; Перефразирования по Интернету (EN); Перефразирования по коллекции издательства Wiley; Патенты СССР, РФ, СНГ; СМИ России и СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Бабынин Эдуард Викторович

ФИО проверяющего

Дата подписи:

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

Ответ на вопрос, является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.