

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«Казанский (Приволжский) Федеральный Университет»  
Институт фундаментальной медицины и биологии  
Кафедра микробиологии**

Направление подготовки: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

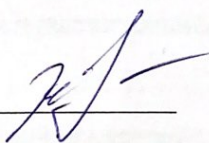
**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
БИОРЕМЕДИАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ГАЛОТОЛЕРАНТНЫХ  
БАКТЕРИЙ ЯКШИНСКОГО МЕСТОРОЖДЕНИЯ  
МИНЕРАЛЬНЫХ СОЛЕЙ**

Обучающийся 4 курса  
группы 01-905  
"14" июня 2023 г.



Терегулова Д.Р.

Научный руководитель  
канд. биол. наук, доцент  
"14" июня 2023 г.



Харитоновна М.А.

Заведующий кафедрой  
микробиологии  
д-р биол. наук, профессор  
"14" июня 2023 г.



Ильинская О.Н.

Казань – 2023

## СОДЕРЖАНИЕ

|  |    |
|--|----|
| <b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....   | 4  |
| <b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....  | 5  |
| <b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....  | 8  |
| 1.1 Проблема загрязнения окружающей среды углеводородами нефти, нефтепродуктами и высокоминерализованными нефтепромысловыми сточными водами..... | 8  |
| 1.2 Биологическая ремедиация нефтезагрязненных почв.....   | 14 |
| 1.3 Стратегии адаптации бактерий к гиперосмотическому стрессу.....   | 22 |
| 1.4 Биопрепараты на основе бактериальных консорциумов для очистки почв и вод от загрязнения нефтью и нефтепродуктами.....                        | 27 |
| <b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....   | 33 |
| <b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....  | 33 |
| 2.1 Штаммы.....  | 33 |
| 2.2 Питательные среды.....   | 33 |
| 2.3 Культивирование бактерий.....  | 34 |
| 2.4 Оценка роста бактерий.....   | 34 |
| 2.5 Диффузионные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибиотическим препаратам.....   | 34 |
| 2.6 Определение гидрофобности клеточной поверхности.....   | 35 |
| 2.7 Определение бисуфрантов.....   | 35 |
| 2.8 ПЦР-скрининг генов оксигеназ, разрушающих алифатические и ароматические углеводороды.....  | 36 |
| 2.9 Измерение массовой концентрации гексадекана методом ИК-спектрофотометрии с применением концентратометра серии КН-2.....                      | 36 |
| 2.10 Капельно-чашечный метод определения количества микроорганизмов (Drop Plate анализ).....   | 37 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.11 Статистическая обработка результатов .....  | 37        |
| <b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>   | <b>38</b> |
| 3.1 Морфология и культуральные свойства штаммов <i>Dietzia kunjamensis</i> S9,<br><i>Dietzia maris</i> S10, <i>Halomonas titanicae</i> S1 .....  | 38        |
| 3.2 Влияние различных концентраций солей на рост <i>Dietzia kunjamensis</i> S9,<br><i>Dietzia maris</i> S10, <i>Halomonas titanicae</i> S1 .....   | 43        |
| 3.3 Влияние различных значений pH на рост <i>Dietzia kunjamensis</i> S9, <i>Dietzia</i><br><i>maris</i> S10, <i>Halomonas titanicae</i> S1 .....   | 45        |
| 3.4 Характеристика антибиотикорезистентности штаммов <i>Dietzia kunjamensis</i><br>S9, <i>Dietzia maris</i> S10, <i>Halomonas titanicae</i> S1 .....   | 47        |
| 3.5 Эмульгирующая активность культуральной жидкости штаммов <i>Dietzia</i><br><i>kunjamensis</i> S9, <i>Dietzia maris</i> S10, <i>Halomonas titanicae</i> S1 .....   | 50        |
| 3.6 Определение гидрофобности клеточной поверхности штаммов <i>Dietzia</i><br><i>kunjamensis</i> S9, <i>Dietzia maris</i> S10, <i>Halomonas titanicae</i> S1 .....   | 52        |
| 3.7 ПЦР-скрининг генов оксигеназ, разрушающих алифатические и<br>ароматические углеводороды в геноме штаммов <i>Dietzia kunjamensis</i> S9,<br><i>Dietzia maris</i> S10, <i>Halomonas titanicae</i> S1 ..... | 55        |
| 3.8.1 Характеристика роста штаммов на минеральной среде, содержащей<br>гексадекан или нефть в качестве источников углерода .....   | 57        |
| 3.8.2 Оценка изменения концентрации н-гексадекана при культивировании<br>штаммов на минеральной среде с гексадеканом в качестве единственного<br>источника углерода и энергии .....                          | 61        |
| 3.9.1 Характеристика роста совместных культур на минеральной среде,<br>содержащей н-гексадекан или нефть в качестве источников углерода .....  | 62        |
| 3.9.2 Оценка изменения концентрации н-гексадекана при культивировании<br>совместных культур на минеральной среде с н-гексадеканом в качестве<br>единственного источника углерода и энергии .....             | 65        |
| <b>ВЫВОДЫ.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....</b>   | <b>68</b> |

## ВВЕДЕНИЕ

Бесспорно, нефть является одним из наиболее ценных полезных ископаемых и имеет важное значение для человечества. Однако, аварийные ситуации при ее добыче, транспортировке и переработке приводят к негативным последствиям. При разливах нефть эмульгируется, рассеивается и накапливается в почвах, донных осадках. Нефтяное загрязнение может охватывать большие территории, нанося серьезный ущерб экономике, а также почвенным и водным экосистемам. Происходит нарушение биологического равновесия и уменьшению биоразнообразия. Помимо того, что окружающей среде наносит вред загрязнение углеводородами нефти, большую озабоченность вызывает попадание нефтепромысловых вод, обладающей высокой минерализацией. Таким образом, нефтяное загрязнение – серьезная проблема, которая требует постоянного внимания и принятия мер по предотвращению и минимизации негативных последствий [Koshlaf, Ball, 2017; Hu, Li, 2013].

Биодеградация углеводородов микроорганизмами является одним из основных природных механизмов самоочищения окружающей среды и зависит от обилия микроорганизмов-биодеструкторов [Selivanovskaya, Galitskaya, 2011]. Биологические методы, основанные на использовании микроорганизмов, являются эффективным и экологически безопасным способом борьбы с загрязнением окружающей среды. Микроорганизмы способны использовать ксенобиотики в качестве источника энергии и превращают их в нетоксичные продукты, такие как двуокись углерода и вода [Koshlaf, Ball, 2017]. В настоящее время с физическими и химическими методами борьбы успешно сочетаются и конкурируют биологические методы, которые широко применяются для рекультивации нефтезагрязненных почв, природных водоемов и сточной воды [Guo, 2014]. Для борьбы с загрязнением нефтью применяют биопрепараты, на основе микроорганизмов, состав которых подбирается индивидуально, учитывая специфику загрязнения. Так,

для восстановления загрязненных территорий, обладающих повышенной соленостью, необходимо использовать галотолерантные микроорганизмы, устойчивые к повышенным концентрациям соли [Шубенько, 2016].

Ранее из скважинного рассола Якшинского месторождения минеральных (калийно-магниевых) солей были выделены штаммы *Dietzia kunjomensis* S9, *Dietzia maris* S10, *Halomonas titanicae* S1. Помимо того, что данные микроорганизмы способны существовать при высоких концентрациях соли, они могут обладать потенциалом для биодеструкции углеводородов нефти. Известны представители рода *Dietzia*, разрушающие алканы [Rainey *et al.*, 1995; von der Weid *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011; Yumoto *et al.*, 2002] и полициклические ароматические соединения [Al-Awadhi *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Maeda *et al.*, 1998; von der Weid *et al.*, 2007], которые применяются для биоремедиации почв и очистки сточных вод от нефтепродуктов. Бактерии рода *Halomonas* могут легко адаптироваться к различным средам и использовать изменяющиеся в пространстве и времени ресурсы [Singer *et al.*, 2011]. Описаны штаммы *Halomonas*, продуцирующие экзополисахариды и биосурфактанты, эффективно увеличивающие солубилизацию углеводородов нефти и способствующие их биодegradации микробным сообществом [Kawata, *et al.*, 2014].

Целью данной работы является оценка биоремедиационного потенциала галотолерантных бактерий *Dietzia kunjomensis* S9, *Dietzia maris* S10 и *Halomonas titanicae* S1.

В соответствии с поставленной целью решаются следующие задачи:

- 1) Охарактеризовать морфологические и культуральные свойства *D. kunjomensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1.
- 2) Исследовать влияние различных концентраций солей и значений pH на рост *D. kunjomensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1.
- 3) Охарактеризовать резистентность *D. kunjomensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1 к противомикробным препаратам.

4) Охарактеризовать гидрофобность клеточных поверхностей *D. kunjamensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1.

5) Определить эмульгирующую активность *D. kunjamensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1.

6) Провести ПЦР-скрининг генов оксигеназ, разрушающих алифатические и ароматические углеводороды в геноме штаммов *D. kunjamensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1.

7) Охарактеризовать рост штаммов на минеральной среде, содержащей н-гексадекан или нефть в качестве источников углерода.

8) Оценить изменение содержания н-гексадекана в среде при культивировании штаммов *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10.

9) Охарактеризовать эффективность использования совместных культур *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 с *H. titanicae* S1 в отношении утилизации углеводородов нефти.

## ВЫВОДЫ

1. *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 являются грамположительными бактериями, варьирующими по форме от кокков до коротких палочек, формирующими гладкие блестящие с ровными краями пигментированные округлые колонии. Колонии *D. kunjamensis* S9 окрашены в кораллово-красный цвет, центр приподнят. Колонии *D. maris* S10 выпуклые, оранжевые. *H. titanicae* S1 – граммотрицательные полиморфные палочки, содержат крупные опалесцирующие неокрашивающиеся включения. Колонии светло-бежевые, округлые, слизистые, с приподнятым центром, полупрозрачные.

2. *D. kunjamensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1 являются галотолерантными бактериями. Увеличение концентрации хлорида натрия до 4% не оказывает существенного влияния на рост культур. Оптимальными для роста являются нейтральные и щелочные (до pH 9) среды.

3. Установлено, что каждый из исследуемых штаммов обладает резистентностью лишь к одному из 20 проанализированных антибиотиков: *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 проявляют устойчивость к триметоприм/сульфаметоксазолу, а *H. titanicae* S1 – эритромицину.

4. *D. kunjamensis* S9, *D. maris* S10 и *H. titanicae* S1 обладают эмульгирующей активностью по отношению к ксилолу. Наиболее стабильные эмульсии с высокими показателями образует *H. titanicae* S1.

5. *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 обладают высокой гидрофобностью клеточной поверхности (показатель гидрофобности более 76%), показатель гидрофобности *H. titanicae* S1 несколько ниже (51.4 %).

6. Установлено, что *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 обладают генами *alkB* и *nahAc*, продукты которых участвуют в деградации алифатических и ароматических углеводородов нефти.

7. Штаммы *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 способны к росту на минеральной среде, содержащей н-гексадекан или нефть в качестве

единственных источников углерода, при этом наблюдается уменьшение нефтяной пленки, а также нарушение ее структуры.

8. Установлено, что *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 способны к утилизации модельного соединения для нелетучих алифатических углеводородных компонентов сырой нефти н-гексадекана.

9. Простые микробные консорциумы между алкан-деструкторами *D. kunjamensis* S9 и *D. maris* S10 и хелпером *H. titanicae* S1 являются эффективными в отношении утилизации углеводородных компонентов нефти.