

Министерство образования и науки Российской Федерации  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**МИКРОБНЫЕ АССОЦИАЦИИ ОТРАБОТАННЫХ АКТИВНЫХ ИЛОВ,  
УТИЛИЗИРУЕМЫХ НА ПОЛИГОНЕ «ЖЕЛЕЗНОДОРОЖНЫЙ»  
В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы  
направления подготовки 06.03.01 Биология  
биологического факультета  
Дементьевой Наталии Андреевны

Научный руководитель:

доцент кафедры микробиологии  
и физиологии растений, к.б.н., доцент

  
30.05.18 А. М. Петерсон

Зав. кафедрой микробиологии  
и физиологии растений, д.б.н., профессор

  
30.05.18 С. А. Степанов

Саратов 2018

## Введение

**Актуальность темы.** Биоремедиация представляет собой относительно новое, перспективное направление экобиотехнологии, и занимается разработкой и внедрением новых методов очистки окружающей среды с использованием потенциала микроорганизмов. В основе процесса биоремедиации сточных вод лежит биохимическое окисление органических загрязнений микроорганизмами активного ила в аэробных или анаэробных условиях [1]. Активный ил представляет собой суспензию, состоящую из скоплений микроорганизмов, образующих хлопьевидные частицы. Микробное сообщество активного ила имеет обширный состав, и большинство представителей до сих пор не выделено в чистой культуре и не идентифицировано.

Однако возникает проблема утилизации отработанных активных илов из очистных сооружений [2]. Оптимальным вариантом является их деструкция с использованием входящих в состав этих илов микроорганизмов.

В связи с этим, изучение микробных ассоциаций отработанных активных илов и поиск в их составе активных микроорганизмов-деструкторов является актуальной задачей.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы явилось изучение микробных ассоциаций отработанных активных илов, утилизируемых на полигоне «Железнодорожный» в Московской области. Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить структуру микробных ассоциаций отработанных активных илов.
2. Выявить особенности микробных ассоциаций активных илов разных сроков захоронения.
3. Установить виды, доминирующие в микробных ассоциациях отработанных активных илов в течение всего периода захоронения.
4. Изучить биохимическую активность доминантных видов.

5. Выявить антагонистическую активность доминантных видов по отношению друг к другу и к типичным почвенным бактериям и условно-патогенным микроорганизмам.

**Материалы и методы.** Работа выполнена на базе кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского и на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии Саратовского государственного медицинского университета имени В. И. Разумовского.

Объектом исследования являлись образцы илов с полигона «Железнодорожный», расположенного в Московской области. Илы складировались на данный полигон с городской станции аэрации. Всего было исследовано тридцать образцов, которые были разделены на три группы в зависимости от сроков хранения на полигоне: менее 5 лет, от 5 до 10 лет, более 10 лет.

Выделение чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов проводили согласно стандартной методике десятикратных разведений [3]. При изучении выделенных культур определяли их культуральные, морфологические, биохимические свойства [4].

Для определения видовой принадлежности выделенных чистых культур проводили секвенирование на базе ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» методом анализа маркерной последовательности 16S рРНК.

Диапазон устойчивости выделенных доминантных видов определяли культивированием их на ГРМ-агаре при различных физико-химических параметрах.

При изучении взаимоотношений бактерий, выделенных из исследованных образцов, по отношению друг к другу, использовали метод штрихового посева [5].

Антагонистическую активность выделенных из илов видов бактерий по отношению к типичным почвенным и стандартным условно-патогенным штаммам микроорганизмов изучали методом агаровых слоев [6]. При изучении выделенных бактерий и представителей почвенной микрофлоры в качестве тест-культур использовали 5 штаммов типичных почвенных бактерий рода *Bacillus*, которые обычно доминируют в образцах грунтов и представляют собой грамположительные спорообразующие палочки.

При изучении антагонистической активности выделенных из отработанных илов бактерий по отношению к условно-патогенным микроорганизмам использовали 6 стандартных тест-штаммов условно-патогенных микроорганизмов: 4 вида грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 14153, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488, *Serratia marcescens* ATCC 3880/220015, один грамположительный кокк *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, а также представитель микроскопических дрожжеподобных грибов *Candida albicans* ATCC 885653

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ Excel и Statistica 10.0. При анализе количественных показателей рассчитывали медиану и межквартильный размах значений.

**Структура и объем работы.** Диплом изложен на 58 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы и список использованных источников. Работа включает 2 рисунка, 13 таблиц. Список использованных источников включает в себя 54 наименования.

#### **Основное содержание работы**

Из образцов илов было выделено 40 чистых культур бактерий.

Показатель КМАФАнМ для образцов различных сроков захоронения варьировал в диапазоне от  $10^6$  до  $10^9$  степени и не имел статистически значимых различий.

При определении систематического положения выделенных чистых культур первоначально изучали культуральные и морфологические свойства выделенных бактерий.



Для дальнейшей работы было отобрано 25 чистых культур бактерий, которые были отправлены на секвенирование для определения их видовой принадлежности.

Результаты секвенирования показали, что микробную ассоциацию отработанных илов составляют 25 видов 8 родов. Все выделенные виды принадлежали к филумам Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria.

Большая часть изолятов представляла филум Firmicutes (семейства Bacillaceae, Staphylococcaceae, Paenibacillaceae). Представитель этого филума – род *Bacillus* – являлся доминирующим. Он включал в себя 12 видов: *B. aquimaris*, *B. aryabhattai*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mojavensis*, *B. mycoides*, *B. oryzaecorticis*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. subtilis*, *B. thuringiensis*. Кроме рода *Bacillus* филум Firmicutes был представлен родами *Brevibacterium* (вид *B. frigoritolerans*), *Psychrobacillus* (вид *P. psychrodurans*), *Brevibacillus* (вид *B. reuszeri*), *Staphylococcus* (виды *S. pasteurii*, *S. warneri*).

Вторым по количеству представленных видов оказался филум Proteobacteria (семейства Pseudomonadaceae, Moraxellaceae). Данный филум включал 3 рода. Первый род – *Pseudomonas* был представлен 4 видами: *P. poae*, *P. simiae*, *P. stutzeri*, *P. synxantha*. Род *Psychrobacter* был представлен одним видом – *P. psychrophilus*. Род *Acinetobacter* включал в себя также один вид – *A. johnsonii*.

Филум Actinobacteria был представлен одним видом семейства Brevibacteriaceae (*B. frigoritolerans*).

Далее в работе представляло интерес определить динамику содержания различных видов бактерий в разных образцах илов в зависимости от сроков их хранения. В образцах илов со сроком хранения более 10 лет было выделено 11 видов бактерий. По встречаемости в данных образцах преобладал вид *P. psychrophilus* (100%). Наиболее высокие количественные показатели отмечались у видов *B. safensis*, *B. pumilus*, *P. stutzeri* и *A. johnsonii* ( $10^4$ ).

В илах со сроком хранения 5-10 лет всего было определено 18 видов бактерий. Наиболее часто встречались два вида – *B. frigoritolerans* и *B.*

*megaterium* (100%). Высокие значения КОЕ определялись у видов *B. pumilus* и *P. psychrophilus* ( $10^4$ ).

В образцах отработанных активных илов со сроком хранения менее 5 лет было определено 19 видов бактерий. Наибольшими показателями встречаемости обладали виды *B. subtilis* и *B. mojavensis* (75%). Высокий показатель КОЕ имел вид *B. mojavensis* ( $10^4$ ).

Анализируя полученные результаты, можно сделать вывод, что наибольшее видовое разнообразие наблюдалось в образцах илов возрастом менее 5 лет.

Были выявлены 6 видов бактерий, которые массово встречались во всех пробах, вне зависимости от срока хранения, обладавшие высокими показателями встречаемости и количественного содержания: *B. aryabhattai*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *P. brenneri*, *P. psychrophilus*. На основании полученных результатов эти виды были определены как доминантные.

Учитывая, что доминантные виды бактерий рассматриваются как возможные деструкторы различных органических соединений, представляло интерес выяснить, какие пищевые субстраты они могут использовать в своем метаболизме.

В результате проведенных исследований было установлено, что большинство доминантных видов (83,3%) обладало высокой сахаролитической активностью. Наибольшая активность по отношению к углеводам была выявлена у *B. aryabhattai* и *B. thuringiensis*. Самая низкая сахаролитическая активность наблюдалась у *P. brenneri*. Высокая ферментативная активность наблюдалась при использовании глюкозы, сахарозы, маннита и сорбита. Меньше всего в качестве источника углерода использовались лактоза и мальтоза.

Способностью к фиксации молекулярного азота обладали 4 вида (66,7% исследуемых доминант): *B. aryabhattai*, *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *P. brenneri*. Способность к редукции нитратов наблюдалась только у одного доминантного вида *B. mojavensis*. К гидролизу желатины оказались способны 4 доминантных

вида (66,7%): *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*, *P. brenneri*. Из общего числа исследуемых видов, фермент каталаза был обнаружен у всех 6 изученных доминант (100% всех изучаемых видов), а оксидазной активностью обладали 3 доминантных культуры *B. mojavensis*, *B. thuringiensis*, *P. brenneri* (50% всех исследуемых культур). Три вида (*B. mojavensis*, *B. aryabhattai*, *B. thuringiensis*) были способны к анаэробному росту на среде Гисса с глюкозой.

При исследовании температурного диапазона устойчивости выделенных бактерий было установлено, что оптимальными температурами для их культивирования являются +28°C и +37°C. При данных температурах все виды давали хороший рост уже через 24 часа. При понижении температуры до +8°C единичные колонии на 5 сутки культивирования образовывали только 2 вида (33,3%) *P. psychrophilus* и *P. brenneri*. При увеличении температуры до +43°C интенсивный рост на вторые сутки культивирования наблюдался у *B. mojavensis* и *B. pumilus*.

Высокие концентрации хлорида натрия не действовали губительно на большинство выделенных видов. Выделенные доминанты оказались устойчивыми к засолению, за исключением *B. thuringiensis*, который не давал роста при содержании в среде 6 и 10% NaCl. Вид *P. brenneri* имел слабый рост при добавлении в среду соли. Как типичные галофилы вели себя виды *B. mojavensis* и *B. pumilus*. Они успешно росли при добавлении в среду 10% NaCl.

При рассмотрении диапазона pH, при котором возможен рост доминантных видов, было установлено, что он сдвинут в щелочную сторону. При pH 10 хороший рост давали все доминантные виды уже на вторые сутки культивирования, кроме *B. thuringiensis*. При pH 5 *B. mojavensis* давал видимый рост на четвертые сутки культивирования. Таким образом, большая часть выделенных доминантных видов бактерий (83,3%) относилась к алкалотолерантным. К ацидотолерантным бактериям был отнесен вид *B. mojavensis*. Другие виды не давали роста при pH 5.

На следующем этапе работы проводили изучение антагонистической активности доминантных видов бактерий по отношению друг к другу для



выявления возможных последствий при объединении их в комплексном биопрепарате.

В ходе проведенной работы было установлено, что наибольшей антагонистической активностью обладал вид *B. pumilus* по отношению к пяти другим доминантным видам (*B. aryabhattai*, *B. mojavenensis*, *B. thuringiensis*, *P. brenneri*, *P. psychrophilus*). Также, слабую антагонистическую активность проявлял доминантный вид *B. thuringiensis* по отношению к виду *B. aryabhattai*. Другие изоляты не проявляли антагонистическую активность по отношению друг к другу. Высокая антагонистическая активность *B. pumilus* в отношении других доминантных культур вполне закономерна, так как этот вид способен продуцировать различные ферменты и метаболиты с антибактериальной активностью. Поэтому в будущем использовать этот вид в сочетании с другими доминантными видами является нецелесообразным. Остальные доминанты могут использоваться в составе комплексного биопрепарата.

Антагонистическую активность в отношении тест-штаммов типичных почвенных бактерий проявили три вида: *B. mojavenensis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*. Больше всего антагонистическая активность проявлялась в отношении видов *B. megaterium* ATCC 14581, *B. lentus* ATCC 10840, *B. thuringiensis* ATCC 19270. В меньшей степени подавлялся рост *B. cereus* ATCC 11778 и *B. subtilis* ATCC 6633.

Таким образом, было установлено, что исследуемые доминантные виды бактерий из отработанных активных илов в небольшой мере будут подавлять рост аборигенной микрофлоры почв.

Представители рода *Bacillus* (*B. mojavenensis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis*) подавляли рост условно-патогенных микроорганизмов *S. aureus* ATCC 6538 и *K. pneumoniae* ATCC 31488. Следовательно, при внесении доминантных чистых культур в отработанный активный ил, будут улучшаться его санитарные показатели.



### Заключение

В ходе проведённых исследований выявлен богатый видовой состав отработанных активных илов, утилизируемых на полигоне «Железнодорожный» в Московской области. Показатель КМАФАнМ для образцов различных сроков захоронения варьировал в диапазоне от  $10^6$  до  $10^9$  степени и не имел статистически значимых различий.

В микробных ассоциациях исследованных активных илов, наиболее разнообразно были представлены семейства Bacillaceae (52%) и Pseudomonadaceae (24%). В небольшом количестве (8%) присутствовали представители семейств Moraxellaceae и Staphylococcaceae. Наименьшее видовое разнообразие характерно для семейств Brevibacteriaceae и Paenibacillaceae (4%).

Наиболее высокие показатели встречаемости и численности в илах всех сроков захоронения имели *Bacillus aryabhattai*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas brenneri*, *Psychrobacter psychrophilus*. Эти виды характеризовались широким спектром ферментативной активности и устойчивостью к действию физико-химических факторов.

Наибольшую антагонистическую активность проявлял доминантный вид *B. pumilus*, что в дальнейшем исключает его использование в одном биопреparate совместно с пятью другими доминантными видами бактерий.

Доминирующие в илах виды *B. mojavensis*, *B. pumilus*, *B. thuringiensis* обладали антагонистической активностью по отношению как к почвенным, так и к условно-патогенным микроорганизмам.

Таким образом, полученные данные позволяют рассматривать доминантные виды бактерий, выделенные из иловых отложений разных сроков хранения, в качестве перспективных компонентов новых биопрепаратов.

### Выводы

1. В микробных ассоциациях исследованных активных илов наиболее разнообразно представлено сем. Bacillaceae (52% видов) и Pseudomonadaceae (24%). В небольшом количестве (8%) присутствовали представители семейств

Moraxellaceae и Staphylococcaceae. Наименьшее видовое разнообразие характерно для семейств Brevibacteriaceae и Paenibacillaceae (4%).

2. Наибольшая обсемененность илов отмечалась в образцах со сроком хранения менее 5 лет ( $10^8$  КОЕ/г). В более старых образцах показатель КМАФАнМ снижался до  $10^7$  КОЕ/г.

3. Виды *Bacillus aryabhatai*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas brenneri*, *Psychrobacter psychrophilus* массово встречались во всех пробах илов, независимо от срока захоронения, и имели высокие показатели встречаемости (до 100%) и численности ( $10^4$  КОЕ/г).

4. В качестве источника углерода все доминантные виды использовали глюкозу. Сахарозу и маннит использовали 83,3% изолятов, белковые соединения – 66,7%. Фиксацию молекулярного азота осуществляли 66,7% исследуемых видов, редукцию нитратов – только *B. mojavensis*.

5. Оптимальные температуры роста для доминантных видов бактерий составили +28°C и +37°C. К факультативным термофилам было отнесено 50% изолятов, к факультативным психрофилам – 33,3%. Галотолерантными оказались 83,3% бактерий. Большая часть доминантов (83,3%) оказалась алкалотолерантными.

6. Наибольшей антагонистической активностью по отношению к другим доминантным видам обладал *B. pumilus*, слабую антагонистическую активность проявлял *B. thuringiensis*. *B. aryabhatai*, *B. mojavensis*, *P. brenneri*, *P. psychrophilus* не влияли на рост сопутствующих доминирующих видов.

7. На типичных представителей почвенной микрофлоры подавляющее воздействие оказывали 50% изолятов. Доминантные виды незначительно подавляли рост условно-патогенных бактерий. Рост *S. aureus* ATCC 6538 задерживали 50,0%, *K. pneumoniae* ATCC 31488 – 33,3% доминирующих в илах бактерий рода *Bacillus*.

### Список использованных источников

1. Капков, В. И. Биоремедиация морских прибрежных экосистем: использование искусственных рифов / В. И. Капков, Е. В. Шошина, О. А. Беленикина // Вестник МГТУ. 2016. Т. 19, №1. С. 286–287.
2. Skorkowski, L Assessment of Excess Sludge Ultrasonic, Mechanical and Hybrid Pretreatment in Relation to the Energy Parameters / L. Skorkowski, E. Zielewicz, A. Kawczynski // Water. 2018. V. 10, N.55. P. 2–5.
3. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований: ГОСТ Р ИСО 68872 – 2013. Москва: Стандартиформ, 2014. 4 с.
4. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. Москва: Медицина, 2004. С. 56–59.
5. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов. Москва: уч. пособие, 2005. 130 с.
6. Иркитова, А. Н. Сравнительный анализ методов определения антагонистической активности молочнокислых бактерий / А. Н. Иркитова, Я. Р. Каган, Г. Г. Соколова // Известия Алтайского государственного университета. Биологические науки. 2012.С. 42–43.

*Г. Д. И.*