

УДК 579.26

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ТОРФОСОРБЕНТОВ НА НАЛИЧИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* И *PSEUDOMONAS*

К.В. Шокина, соискатель кафедры
тел. 8(8422)55-95-47, shokina-k93@mail.ru

П.С. Майоров, аспирант
тел. 8(8422)55-95-47, PavelMayorovv@yandex.ru

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент
тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

А.К. Морозова, студентка 3 курса ФВМиБ
тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

М.А. Лыдина, кандидат биологических наук, ст. преподаватель
тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

С.Н. Золотухин, доктор биологических наук, профессор
тел. 8(8422)55-95-47, fvm.zol@yandex.ru

Д.Н. Хлынов, ассистент
тел. 8(8422)55-95-47

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: бактерии, нефтесорбенты, *Bacillus*, *Pseudomonas*, питательные среды, колониеобразующие единицы.

Были проведены исследования микробных ценозов торфосорбентов «НОРД», нефтяного сорбента гидрофобизированного органоминерального, «OSLANSORB» на наличие бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Установлено, что количество бактерий рода *Bacillus* в пробах варьирует от $2,0 \times 10^2$ до $4,0 \times 10^4$ КОЕ/г, количество бактерий рода *Pseudomonas* – от $1,1 \times 10^3$ до $3,0 \times 10^3$ КОЕ/г.

Введение. Восстановление почвы после нефтезагрязнения связано, прежде всего, с деятельностью почвенной микрофлоры, способной потреблять углерод из циклических углеводов. Знания о качественном составе микробиоты, участвующей в разложении нефти в почве, позволяют более целенаправленно проводить поиск микроорганизмов для создания биопрепаратов, используемых для очистки загрязненной нефтью почвы. С другой стороны, представления о составе и, соответственно, биологии нефтедеструкторов, необходимы для разработки

мероприятий, способствующих активизации их деятельности в загрязненной почве. Видовой состав микроорганизмов, разлагающих нефть, исследован во многих типах почв на территории России, но о таксономическом составе этой группы микроорганизмов в дерново-подзолистых почвах известно крайне мало [6].

Наиболее активными и широко распространенными деструкторами нефтепродуктов оказались бактерии родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Candida*, *Actinomyces*, *Nocardia* и *Acinetobacter* [7]. Отселектированные микроорганизмы являются природными изолятами, нетоксичными и непатогенными. Микробные культуры активно утилизируют нефть и нефтепродукты, в том числе, трудноразагаемые, тяжелые фракции нефти. Способность ряда микроорганизмов к деструкции углеводородов нефти при низких температурах позволяет использовать их в биоремедиации загрязненных территорий в условиях холодного климата [4,8].

Цель - определить наличие бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas* в образцах торфосорбентов «НОРД», нефтяного сорбента гидрофобизированного органоминерального, «OSLANSORB».

Материалы и методы. Оборудование: автоклав электрический, термостаты электрические с автоматическим регулированием, холодильник бытовой, поддерживающий температуру на 4-6°C, микроскоп биологический, лупа, дистиллятор, сушильные шкафы с регулированием температуры до 200 °C, весы электронные, фарфоровые ступки с пестиком.

Лабораторная посуда: колбы различной емкости, чашки бактериологические Петри, шпатель стеклянный, пипетки емкостью 1, 2, 5, 10 мл, пробирки бактериологические, воронки стеклянные, цилиндры вместимостью 100, 250 и 500 мл, стаканы лабораторные, стекла покровные для микропрепаратов, стекла предметные для микропрепаратов, пробки разные (резиновые, ватно-марлевые).

Питательные среды и реактивы: дистиллированная вода, крахмал, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2HPO_4 , MgSO_4 , CaCO_3 , NaCl , агар-агар, среда Донована, питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой, питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар), пептон, магний хлористый, цетримид (цитилтриметиламмония бромид), глицерин, аммоний фосфорнокислый однозамещенный, ацетамид.

Исследования проводили по методикам, отраженным в нормативно-технической и справочной литературе [1-3,5].

Общее число почвенных бактерий - этот показатель является индикатором глубины минерализации органического субстрата. В чистых почвах с окончившимся процессом самоочищения число бактерий относительно общей микробной обсемененности достигает 20 - 50%, в загрязненных сохраняется в пределах до 20%. Однако, содержание бактерий и их процент колеблется в зависимости от почвенно климатических условий, поэтому в конкретных условиях необходимо устанавливать величины этих микробиологических показателей [4].

Для учета бактериальных форм микроорганизмов используются те же почвенные разведения, что и для определения общей численности, предварительно прогретые при 80 °С в течение 15 минут. Посев производился на поверхность мясо-пептонного агара и среду Донована (приготовленную без добавления полимиксина) в количестве 0,1 мл разведения, которое растиралось стеклянным шпателем по поверхности среды. Чашки с посевом помещали в термостат в перевернутом виде (крышкой вниз) при температуре 37° на 24-48 часов.

Подсчет числа колоний проводится по формуле:

$$x = a \times 10^n \quad (1)$$

где

- x - общее микробное число,
- a - количество выросших колоний,
- 10ⁿ - степень разведения.

То есть для определения общего микробного числа количество выросших колоний умножают на степень разведения культуры.

Определение количества бактерий рода *Pseudomonas*. Навеску пробы (1 грамм), используемую для приготовления первого разведения, довели путем добавления небольшого количества стерильной водопроводной воды до пастообразного состояния (9 мл) - разведение 1:10. После чего проба в пастообразном состоянии растиралась в течение 5 мин. Затем готовили первое разведение (1:100) пробы в стерильной водопроводной воде и полученная суспензия охлаждалась при 5-7°С в течение 20-30 мин. По истечении срока охлаждения производили раститровку суспензии, обычным способом: 1:1000, 1:10000. Перед посевом каждое разведение тщательно перемешивали стерильной пипеткой. Посев производили поверхностным способом, нанося на агаризованные среды 0,1 мл суспензий. Для учета количества псевдомонад используется цетримидный агар и среда с ацетамидом. Чашки с посевами помещали в термостат в перевернутом виде (крышкой вниз) при температуре 37°С на 24 часа.

Таблица 1 - Результаты микробиологического исследования торфосорбентов на наличие бактерий рода *Bacillus*

Степень разведения	«НОРД»	нефтяной сорбент гидрофобизированный органоминеральный	«OSLANSORB»
1:100	2±1	120±5	29±4
1:1000	-	64±3	3±2
1:10000	-	4±1	-

Таблица 2 - Результаты микробиологического исследования торфосорбентов на наличие бактерий рода *Pseudomonas*

Степень разведения	«НОРД»	нефтяной сорбент гидрофобизированный органоминеральный	«OSLANSORB»
1:100	-	11±4	17±4
1:1000	-	3±1	-
1:10000	-	-	-

Цетримидный агар. Пептон - 20,0 г, агар - 13,0 г, магний хлористый - 1.4 г, калий серноокислый - 10,0 г, цетримид (цитилтриметиламмония бромид) - 0,3 г, глицерин - 10,0 г, вода дистиллированная - до 1000,0 см (рН - 7,2).

Среда с ацетамидом. Агар - 15,0 г, натрий хлористый - 5,0 г, магний серноокислый - 0,2 г, аммоний фосфорнокислый однозамещенный - 1,0 г, калий фосфорнокислый двузамещенный - 1,0 г, ацетамид - 20, 0 г, вода дистиллированная - до 1000,0 см³ (рН - 6,7) [2-3].

Результаты исследований. Учет бактериальной обсемененности вели в течение 24-72 часов в зависимости от питательной среды. Результаты исследований фиксировались каждые 24 часа эксперимента.

В таблицах 1-2 представлены результаты исследований проб торфосорбентов в разведениях 1:100 - 1:10000.

Заключение. Был проведен второй этап исследования структуры и функций микробных ценозов торфосорбентов «НОРД», нефтяного сорбента гидрофобизированного органоминерального, «OSLANSORB», который позволил получить новые данные о характере микрофлоры торфяных почв различного ботанического состава и степени окультуренности, численности микроорганизмов, наличии в

субстрате бактерий родов *Bacillus* и *Pseudomonas*. Установлено, что количество бактерий рода *Bacillus* в пробах варьирует от $2,0 \times 10^2$ до $4,0 \times 10^4$ КОЕ/г, количество бактерий рода *Pseudomonas* – от $1,1 \times 10^3$ до $3,0 \times 10^3$ КОЕ/г.

Научные исследования проводятся при финансовой поддержке государства в лице Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа «УМНИК»).

Библиографический список

1. ГОСТ 27894.3-88 Торф и продукты его переработки для сельского хозяйства. Методы анализа. - М.: Изд-во стандартов, 1990.- 24с.
2. Васильев, Д.А. Методы общей бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. - Ульяновск, УГСХА, 2008. - 263с.
3. Васильев Д.А. Методы частной бактериологии / Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, Н.М. Никишина. - Ульяновск, УГСХА, 2008. - 224с.
4. Звягинцев, Д.Г. Динамика микробных популяций в почвах. // Структура и функции микробных сообществ почв с различной антропогенной нагрузкой. - Киев, 1982 - 164с.
5. Методические указания по санитарно-микробиологическому исследованию почвы / Утверждено заместителем Главного государственного санитарного врача СССР В.Е.КОВШИЛО 4 августа 1976 г. N 1446-76 - URL:http://uristu.com/library/sssр/usr_8927/ - дата обращения 11.02.2015.
6. Национальный отраслевой журнал «Вертикаль» - URL: <http://www.ngv.ru/news/> - дата обращения 12.11.2015.
7. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. - № 1 (25). – С. 68-75.
8. Макеев, В.А. Изучение чувствительности бактерий рода *Bacillus* к различным концентрациям хлорида натрия / В.А. Макеев, М.А. Юдина, А.Х. Мустафин [и др.] / в сборнике: Ветеринарная медицина XXI века: инновации, опыт, проблемы и пути их решения: международная научно-практическая конференция, посвященная Всемирному году ветеринарии в ознаменование 250-летия профессии ветеринарного врача. - Ульяновск, 2011. - С. 185-187.

RESEARCH OF SAMPLES TORFOSORBENTOV ON EXISTENCE OF BACTERIA OF THE SORT *BACILLUS* AND *PSEUDOMONAS*

*Shokina K.V., Mayorov P. S., Feoktistova N.A., Morozova A.K.,
Lydina M.A., Zolotukhin S.N.*

Keywords: bacteria, petrosorbents, *Bacillus*, *Pseudomonas*, nutrient mediums, koloniyeobrazuyushchy units.

Researches of microbic tsenoz of torfosorbent "NORTH", an oil sorbent of gidrofobizirovanny organomineralny, "OSLANSORB" on existence of bacteria of the sorts *Bacillus* and *Pseudomonas* were conducted. It is established that the quantity of bacteria of the sort *Bacillus* in tests varies from $2,0 \times 10^2$ to $4,0 \times 10^4$, WHICH, quantity of bacteria of the sort *Pseudomonas* – from $1,1 \times 10^3$ to $3,0 \times 10^3$, WHICH.