

УДК 579.26

ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗЦОВ ТОРФОСОРБЕНТОВ НА НАЛИЧИЕ БАКТЕРИЙ РОДА *ACTINOMYCETALES* И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОБЩЕЙ ЧИСЛЕННОСТИ САПРОФИНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

П.С. Майоров, аспирант

тел. 8(8422)55-95-47, pavelmayorovv@yandex.ru

К.В. Шокина, соискатель кафедры

тел. 8(8422)55-95-47, shokina-k93@mail.ru

В.А. Милинская, студент 3 курса ФВМуБ

тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

Н.А. Феоктистова, кандидат биологических наук, доцент

тел. 8(8422)55-95-47, feokna@yandex.ru

Д.А. Васильев, доктор биологических наук, профессор

тел. 8(8422)55-95-47, dav_ul@mail.ru

В.Г. Захарова, Е.Г. Логинова, А.А. Щербина, Ю.А. Райчинец, аспиранты
email: feokna@yandex.ru

ФГБОУ ВО Ульяновская ГСХА

Ключевые слова: бактерии, нефтесорбенты, *Actinomycetales*, питательные среды, колониеобразующие единицы, общая численность сапрофитных микроорганизмов.

Были проведены исследования микробных ценозов торфосорбентов «НОРД», нефтяного сорбента гидрофобизированного органоминерального, «*OSLANSORB*» на наличие бактерий рода *Actinomycetales* и определение общей численности сапрофитных микроорганизмов. Установлено, что общая численность микроорганизмов в пробах варьирует от 6×10^2 до 7×10^4 КОЕ/г, количество бактерий рода *Actinomycetales* – от 2×10^2 до 4×10^3 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, соответ-

ственно, 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 [4].

Наиболее активными и широко распространенными деструкторами нефтепродуктов оказались бактерии родов *Actinomyces*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Candida*, *Bacillus*, *Nocardia* и *Acinetobacter* [6]. Отселектированные микроорганизмы являются природными изолятами, нетоксичными и непатогенными. Микробные культуры активно утилизируют нефть и нефтепродукты, в том числе, трудноразлагаемые, 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].

Цель работы - определить наличие бактерий рода *Actinomycetales* и общее микробное число в образцах торфосорбентов «НОРД», нефтяного сорбента гидрофобизированного органоминерального и «OSLANSORB».

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

Для учета общей численности сапрофитных микроорганизмов проводились диспергирование и десорбция клеток с поверхности почвенных частиц следующим способом. Навеску пробы (1 грамм), используемую для приготовления первого разведения, доводили 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°C 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. Далее исследования проводятся параллельно двумя способами.

Способ 1. После чего брали 1 мл суспензии и переносили на дно стерильной чашки. Из каждого разведения посев производили на 3 параллельные чашки. После в каждую чашку вливали предварительно расплавленный и остуженный до 45°C мясопептонный агар (1,5 %) в количестве 9 мл. Чашки Петри с расплавленным агаром хорошо перемешивали с имеющейся там суспензией, осторожно наклоняя чашки во все стороны. Затем чашки помещали на строго горизонтальную поверхность до затвердевания среды. На чашке делается надпись с указанием номера пробы и разведения.

После застывания мясопептонного агара чашки с посевом помещали в термостат в перевернутом виде (крышкой вниз) при температуре 37° на 24 часа. После инкубации подсчитывали выросшие колонии и проводили пересчет на 1 г пробы.

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.

Способ 2. Брали 0,1 мл разведения и производили посев на поверхности мясопептонного агара (1,5 %), разлитого в чашки Петри накануне и подсушенного в условиях термостата. Из каждого разведения

посев производили на 3 параллельные чашки. Термостатирование засеянных чашек ведется при 28-30 °С в течение 72 часов. После инкубации подсчитывали выросшие колонии и проводили пересчет на 1 г пробы. Подсчет числа колоний проводится по формуле 1.

Определение количества актиномицетов. 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 актиномицетов используется крахмало-аммиачный агар. Чашки с посевом помещали в термостат в перевернутом виде (крышкой вниз) при температуре 37° на 24-72 часов.

Крахмало-аммиачный агар (КАА). Среда синтетическая, твёрдая, элективная. На 1 л дистиллированной воды, г: крахмал - 10, (NH₄)₂SO₄ - 2, K₂HPO₄ - 1, MgSO₄ - 1, CaCO₃ - 3, агар - 20. Агар растворяли в 300 мл дистиллированной воды. Отдельно растворяли крахмал в 100 мл воды. В остальных 600 мл воды растворяли соли, нагревали до кипения и в кипящий раствор при непрерывном помешивании вливали крахмал, затем добавляли воду с агаром и стерилизовали в автоклаве.

Подсчет числа колоний проводится по формуле 1.

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 первый 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

Таблица 1 - Результаты микробиологического исследования торфосорбентов на определение общей численности микроорганизмов

Степень разведения	«НОРД»	нефтяной сорбент гидрофобизированный органоминеральный	«OSLANSORB»
1:100	6±2	289±13	сливной рост
1:1000	-	95±7	21±7
1:10000	-	7±2	2±1

Таблица 2 - Результаты микробиологического исследования торфосорбентов на наличие бактерий рода Actinomycetales

Степень разведения	«НОРД»	нефтяной сорбент гидрофобизированный органоминеральный	«OSLANSORB»
1:100	2±1	18±6	2±1
1:1000	-	4±2	-
1:10000	-	-	-

субстрате бактерий рода Actinomycetales. Установлено, что общая численность микроорганизмов (КМАФАнМ) в пробах варьирует от 6×10^2 до 7×10^4 КОЕ/г, количество бактерий рода *Actinomycetales* – от 2×10^2 до 4×10^3 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/sssrf/usr_8927/ - дата обращения 11.02.2015.
6. Феоктистова, Н.А. Распространение *Bacillus cereus* и *Bacillus mycoides* в объектах санитарного надзора / Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2014. - № 1 (25). – С. 68-75.

RESEARCH OF SAMPLES TORFOSORBENTOV ON EXISTENCE OF BACTERIA OF THE SORT ACTINOMYCETALES AND DETERMINATION OF TOTAL NUMBER OF SAPROFITNYKH MICROORGANISMS

Mayorov P. S., Shokina K.V., Milinskaya V.A., Feoktistova N. A., Vasilyev D. A., Zakharova V. G., Loginova E. G., Scherbina A. A., Raichynets Y. A.

Keywords: bacteria, petrosorbents, *Actinomycetales*, nutrient mediums, koloniyeobrazuyushchy units, total number saprofitnykh of microorganisms.

Researches of microbic tsenoz of torfosorbent "NORTH", an oil sorbent of gidrofobizirovanny organomineralny, "OSLANSORB" on existence of bacteria of the sort *Actinomycetales* and determination of total number the saprofitnykh of microorganisms were conducted. It is established that the total number of microorganisms in tests varies from 6×10^2 to 7×10^4 , WHICH, quantity of bacteria of the sort *Actinomycetales* – from 2×10^2 to 4×10^3 , WHICH.