Рис. 5. Радиальный прирост эльдарской сосны (*Pinus eldarica* Medw.) в лесопосадках по годам (($A = 50$ лет) вертикальный-прирост по годам, мм))

Толщина годовых колец в стволе деревьев разных пород и родов растущих в одинаковых условиях, была одинаковой. Это свидетельствует о влиянии одного и того же условия развития на деревья. Изменение температуры вызвало различия в плотности и цвете древесины у видов.

Изучение динамики развития в разных условиях и сравнительный анализ развития видов - *Cupressus sempervirens* L., *Pinus halapensis* Mill., *Acacia dealbata* Lin., и *Pinus eldarica* Medw. с учетом биоэкологических свойств даёт возможность использовать их в различных разработках с экотипологическим обоснованием для использования в лесоустройстве Azerbaijan.

1. Ваганов Е.А. Исследование метеорологических условий сезон дерева с помощью рефлектограмм годовых колец./ Вкн.: Анализ динамик биологических объектов, М.://Наука, 1978, с. 103-115.
2. Щиатов С.Г. Методы дендрохронологии. Красноярск, 200, 80 с.
3. Cook E.R., Kairiutstis L.A. Methods of Dendrochronology. Dondrecht/ BostonLondon: Kluwer Academic Publishers, 1990, pt 163-217
4. Holmes R.L. Dendrochronology: program manual. Tucson Laboratory of Tree Ring Research. 1999, 40 pp.
5. Rinn F. TSAP. Version 3.0 Reference manual computer program for time series analysis and presentation copyright Frank Rin Distrubution, Heidelberg, Germany, 1996, 246 p.
6. Schweingruber F.H. Tree Rings and evaronment Dendrochronology// D.Reidel Bern, Stutgard, Wenna, Paul Haupt, 1996, pp 609

Филиппов И.Д., Шуршалова Н.Ф., Петерсон А.М.

Антагонистическая активность штаммов *bacillus pumilus*, выделенных из отработанных активных илов, в отношении санитарно-значимых микроорганизмов

Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского
(Россия, Саратов)

doi: 10.18411/lj-06-2019-129

idsp: ljjournal-06-2019-129

Аннотация

В активных илах, вывозимых с очистных сооружений, преобладают представители рода *Bacillus*, среди которых доминируют представители вида *B. pumilus*. Большинство штаммов этого вида обладают высокой антагонистической активностью по отношению к санитарно-значимым микроорганизмам *Escherichia coli* и

Staphylococcus aureus. Подавление роста этих бактерий происходит не только за счёт более быстрого захвата бациллами среды обитания, но и за счёт выделения ими метаболитов с антибактериальной активностью.

Ключевые слова: *Bacillus pumilus*, активный ил, антагонистическая активность, санитарно-значимые микроорганизмы

Abstract

In active sludge, exported from treatment facilities, prevail by representatives of the genus *Bacillus*, which are dominated by members of the species *B. pumilus*. Most strains of this species have a high antagonistic activity against microorganisms *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Suppression of the growth of these bacteria is not only due to the faster capture of bacilli habitat, but also due to the allocation of metabolites with antibacterial activity.

Keywords: *Bacillus pumilus*, active sludge, antagonistic activity, sanitary-significant microorganisms

В последние годы всё более актуальной становится проблема очистки сточных вод, которые образуются в результате хозяйственной деятельности человека. Одним из наиболее перспективных путей решения данной проблемы является биоремедиация сточных вод с использованием активных илов. Но возникает проблема дальнейшей их утилизации. Оптимальным вариантом является обеззараживание и деструкция загрязняющих веществ отработанных илов с использованием входящих в их состав бактерий [1].

Одной из наиболее перспективных групп микроорганизмов, которые можно использовать для биоремедиации, являются бактерии рода *Bacillus* [2]. Благодаря своей многоплановой ферментативной активности, *Bacillus* могут успешно выполнять функцию деструкторов различных загрязняющих веществ [3]. Кроме того, бациллы известны своей антагонистической активностью по отношению к самым разным группам микроорганизмов. Это делает их перспективными биоагентами для контроля содержания в почвах патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, попадающих в почвы с хозяйственными стоками.

В связи с этим, целью данной работы явилось изучение антагонистической активности бактерий рода *Bacillus*, выделенных из отработанных активных илов, по отношению к санитарно-значимым микроорганизмам.

Объектом исследования послужили образцы отработанных активных илов с полигона «Железнодорожный» (Московская область). Всего было исследовано тридцать образцов. В работе были использованы стандартные штаммы санитарно-значимых микроорганизмов: *S. aureus* 209Р и *E. coli* 113-13, полученные из Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов имени Л. А. Тарасевича.

Выделение чистых культур аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов из образцов илов проводили методом разведений и посева на ГРМ-агар [4]. Идентификация выделенных чистых культур осуществлялась методом анализа маркерной последовательности 16S рРНК на базе ЦКП «Биотехнология» ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии».

Антагонистическую активность доминирующих видов по отношению к тест-штаммам микроорганизмов изучали методом дисков.

При изучении антагонистического эффекта продуктов метаболизма бактерий, исследуемый микроорганизм засевали в ГРМ-бульон, культивировали в течение 5-ти суток при +28°C. Затем проводили центрифугирование при 10 000 g в течение 10-15 мин для отделения клеток от культуральной жидкости. Суточную культуру тест-

штамма засеивали газоном на чашку с ГРМ-агаром. В засеянном газоне вырезали лунку и вносили туда культуральную жидкость исследуемого штамма. В экспериментах использовали неразведённую культуральную жидкость, а также её разведения 1:2 и 1:4.

В ходе микробиологических исследований отработанных илов было установлено, что в их микробных ассоциациях доминируют представители рода *Bacillus*, среди которых наиболее значимую роль играет вид *B. pumilus*. Он имел максимальные показатели встречаемости (68%) и численности (10^5 КОЕ/г) в пробах отработанных илов. 9 штаммов этого вида были отобраны для дальнейшего изучения.

Разные изоляты *B. pumilus* проявляли различную антагонистическую активность в отношении тестируемых микроорганизмов *in vitro* (таблица 1).

100% исследованных штаммов *B. pumilus* подавляли рост золотистого стафилококка. Антагонизм в отношении кишечной палочки оказался очень переменчивым. 7 штаммов из 9 (77,8%) в той или иной степени подавляли рост *E. coli*, 2 штамма (22,2%) вообще не оказывали какого-либо подавляющего действия на рост этого микроорганизма. Штаммы *B. pumilus* 6 и *B. pumilus* 12 оказывали наиболее сильное подавляющее действие на оба тестируемых штамма.

Все штаммы, обладающие антагонистической активностью, демонстрировали подавление роста тест-микроорганизмов за счёт более быстрого роста и захвата питательной среды. По литературным данным [5, 6] многие штаммы *B. pumilus* способны продуцировать метаболиты с антибактериальной активностью. Поэтому на следующем этапе работы было важно выяснить, обладают ли антибактериальной активностью продукты метаболизма двух штаммов *B. pumilus* (*B. pumilus* 6 и *B. pumilus* 12), которые проявили максимальный антагонистический эффект по отношению к тест-микроорганизмам в предыдущей части эксперимента.

Таблица 1

Диаметры зон подавления роста тест-штаммов микроорганизмов штаммами *B. pumilus*, выделенными из отработанных активных илов ($M \pm m$, мм; $p \leq 0,05$)

№ штамма <i>B. pumilus</i>	Тест-штаммы микроорганизмов	
	<i>E. coli</i> 113-13	<i>S. aureus</i> 209P
3	13±2	13±1
4	10±0,9	11±0,6
5	10±0,6	10±0,5
6	18±1	20±0,8
8	0	14±2
9	0	14±2
12	18±1	21±1
13	14±2	15±2
16	12±0,8	14±1

Как видно из таблицы 2, метаболиты обоих исследованных штаммов оказывали схожее действие на тест-микроорганизмы.

Подавление роста *E. coli* происходило только при использовании неразведённой культуральной жидкости, но эффективность действия в этом варианте не уступала эффективности действия на стафилококк. На кишечную палочку оба штамма оказали схожее воздействие.

Антибактериальное действие на *S. aureus* было дозозависимым при использовании метаболитов штамма *B. pumilus* 6 и не имело статистически значимых различий при использовании всех исследованных разведений продуктов метаболизма штамма *B. pumilus* 12.

Таблица 2

Действие продуктов метаболизма *B. pumilus* на тест – штаммы
(зоны задержки роста, мм; $M \pm m$; $p \leq 0,05$)

Тест – штаммы	Разведение культуральной жидкости					
	1:4		1:2		без разведения	
	<i>B. pumilus</i> 6	<i>B. pumilus</i> 12	<i>B. pumilus</i> 6	<i>B. pumilus</i> 12	<i>B. pumilus</i> 6	<i>B. pumilus</i> 12
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	15±2	16±1
<i>S. aureus</i>	10±1	13±0,8	15±2	15±1	15±1	15±2

Таким образом, было доказано, что антагонистическая активность обоих штаммов *B. pumilus* в отношении санитарно-значимых микроорганизмов связана не только с более быстрым захватом среды обитания, но и с выделением в окружающую среду продуктов метаболизма, обладающих антимикробной активностью в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. Несмотря на выявленные незначительные различия, оба исследованных штамма *B. pumilus* могут эффективно участвовать в обеззараживании отработанных активных илов.

1. Гринин, А. С. Промышленные и бытовые отходы: Хранение, утилизация, переработка / А. С. Гринин, В. Н. Новиков - М.: ФАИР-ПРЕСС, 2002.- 336 с.
2. Лапшина, И. З. Биотехнологические методы очистки сточных вод / И. З. Лапшина, Е. С. Слюняева, Т. И. Бейсекова // Труды Международной научной конференции «Высокие технологии - залог устойчивого развития». - 2011. - № 3. - С. 50-53.
3. Неустроев, М. П. Пробиотики из штаммов *Bacillus subtilis* в сельском хозяйстве Якутии / М. П. Неустроев, Н. П. Тарабукина, М. П. Федорова // Якутск, 2010. - 10 с.
4. Бондаренко, А. И. Биологический метод защиты растений от заболеваний / А. И. Бондаренко, Л. Д. Буймистру, С. И. Николаева // Применение биологических методов защиты растений в сельскохозяйственном производстве: Сборник научных трудов, 1988. - С. 44-50.
5. Нефелова, М. В. Спорообразование и биосинтез антибиотиков полипептидов / М. В. Нефелова // Успехи микробиологии. - 1982. - № 17. - С. 177-189.
6. Bondarenko, V. M. Dysbiosis and probiotic preparations / V. M. Bondarenko, A. A. Vorobyev // Journal of Microbiology. - 2004. - № 3. - P. 84-92.