

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
на тему:
«ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА РОСТ
***THERMOMONAS FUSCA*»**

Студент



Кузнецов Олег Дмитриевич

Руководитель



Заплатин Б.П.

Нормоконтролер



Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 19.06.23 № 14)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой

отлично
(протокол заседания ГЭК от 04.07.23 № 4)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Обзор бактерий рода <i>Thermomonas</i>	6
1.2 Систематическое положение бактерий рода <i>Thermomonas</i>	10
1.3 Обзор бактерий вида <i>Thermomonas fusca</i>	12
1.4 Сравнение бактерий вида <i>Thermomonas fusca</i> с другими представителями рода <i>Thermomonas</i>	15
1.5 Практическое применение термофильных бактерий и бактерий рода <i>Thermomonas</i> в химической и биологической промышленности, а также биоинженерии	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
2.1 Описание объекта исследования	22
2.2 Методы исследования	25
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	29
3.1 Культуральные и морфологические признаки вида <i>Thermomonas fusca</i> штамма SHC 3-19	29
3.2 Влияние температуры на рост культуры <i>Thermomonas fusca</i>	31
3.3 Влияние содержания солей на рост культуры <i>Thermomonas fusca</i>	34
3.4 Влияние изменения pH на рост культуры <i>Thermomonas fusca</i>	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	41
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	43

ВЕДЕНИЕ

Одной из проблем почвенной микробиологии является выявление адаптации термофильных бактерий к различным факторам внешней среды. Что сказывается на не полном описании видов термофильных бактерий.

Исследования влияния факторов внешней среды на рост термофильных культур важны как для почвенной микробиологии, так и для микробиологи и биотехнологии.

В настоящее время развитие современной биологической и биохимической науки тесно связано с электронными инструментальными методами исследования. Методы ПЦР методик позволяют определить геном термофильных бактерий что позволяет определить их видовую принадлежность.

Все чаще полагаясь на инструментальные методы анализа происходит недостаток исследовательского материала что негативно сказывается на изученности термофильных культур.

Однако, не менее важно проводить лабораторный анализ культуры термофильных бактерий для определения температурного интервала роста и других факторов внешней среды для более качественного использования культур микроорганизмов в биохимическом производстве и биотехнологии.

В настоящее время с данной проблемой всё чаще сталкиваются микробиологические культуры рода *Thermomonas* в виду недостаточности исследования их культуральных особенностей, а также труднодоступности мест отбора проб.

Из-за данных особенностей род *Thermomonas* был изучен менее подробно и менее детально.

Актуальность исследования этих бактерий связана с тем, что они могут играть важную роль в промышленности, в том числе в производстве белка и водорода. Кроме того, бактерии рода *Thermomonas* выделяют определенные ферменты, и они также могут использоваться для обработки отходов и биоразлагаемых материалов.

Таким образом, изучение бактерий рода *Thermomonas* может не только расширить наши знания о биоразнообразии, но и привести к разработке новых методов промышленного производства и защиты окружающей среды.

Наименее изученным и наиболее интересным для биоинженерии и микробиологической науки является бактериальная культура вида *Thermomonas fusca*, входящая в род *Thermomonas*. Которая имеет следующие особенности:

- оригинальные для рода *Thermomonas* культуральные свойства, а также малые размеры клеток;
- способность данной культуры образовывать биопленки с сопутствующими микробиологическими культурами при отборе проб, что затрудняет лабораторный анализ колоний данного вида и подсчет полученной биомассы бактерий;

Вышеперечисленное объясняет проблему изучения влияния факторов внешней среды на рост *Thermomonas fusca*, связанную, в первую очередь с трудностью выделения данной культуры.

Целью данной исследовательской работы было проведение микробиологического анализа и определение морфологических особенностей бактерий, изучение влияния факторов внешней среды на рост микробиологической культуры *Thermomonas fusca*, а также анализ изменения культуральных свойств и их особенностей при изменении внешних факторов окружающей среды.

Так же были применены новые методы анализа подсчета культуральной биомассы бактерий.

Задачами моей работы было:

- определение морфологических особенностей клеток бактерий вида *Thermomonas fusca*;
- изучение культуральных свойств бактерий;
- исследование влияния внешних факторов среды на рост культуры и прирост культуральной массы бактерий вида *Thermomonas fusca*.

Результаты данной исследовательской работы могут быть применены в дальнейшей лабораторной практике по почвенной микробиологии; в изучении особенностей бактерий рода *Thermomonas*, что позволит более эффективно использовать данную культуру в биологических и химических производствах и для улучшения экологического состояния почвы и защиты окружающей среды.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Обзор бактерий рода *Thermomonas*

Род *Thermomonas*, относящийся к семейству *Xanthomonadaceae*, был впервые установлен и описан Буссе и др. в 2002 году. На данный момент этот род включает пять видов, выделенных из широкого круга местообитаний, таких как: на взвеси каолина был получен типовой вид *Thermomonas haemolytica* в 2002 году [21, 24].

Из вод горячих источников Карловых вар в 2003 году был получен вид *Thermomonas hydrothermalis* который был получен так же позднее в геотермальных источниках Сан-Жемиле в Португалии и в 2016 году найден в пробах из геотермальных источников Иордании [19].

В пробах экспериментального реактора денитрификации был выделены такие виды как: *Thermomonas brevis* и *Thermomonas fusca* в 2003 году [23].

В образцах из проб, полученных на полях женьшеня в Южной Корее выделен такой представитель вид как: *Thermomonas koreensis* в 2006 [26].

Как правило согласно научным источникам места обитания бактерий рода *Thermomonas* представляет собой верхние слои почвы, а также глубинные водоносные слои почвы глубинами не превышающие 400 метров с прилегающими к ним почвенными водами. Так из информации приведенной выше местами обитания ряда видов рода *Thermomonas* служат геотермальные районы и горячие источники [22].

В литературных источниках до сих пор существует не однозначное мнение к каким группам отнести бактерии рода *Thermomonas*. Так как диапазон температур, в котором растут эти виды бактерий, может быть, как мезофильным, так и факультативно термофильным [25].

Так в источниках упоминается что культуры вида *T. haemolytica* и *T. hydrothermalis* имеют предел температуры для роста 50 °C что согласно классификации предложенной М.В. Гусевым в учебном пособии (О.Н. Сахно 2009) является признаками факультативных термофильных бактерий [17].

Три других члена рода *Thermomonas* имеют относительно низкие пределы температуры роста до 37 °С реже до 40 °С. По основной классификации описанной в литературе данные виды культур можно отнести к мезофильным типам бактерий [12].

Культуральные особенности этого рода бактерий имеют следующие особенности: колонии выглядят как округлые образования имеющие поверхностный рост на плотных питательных средах [15].

Колонии имеют слабовыраженную окраску, однако ряд видов рода *Thermomonas* имеет окраску колоний в градации от темно - коричневого и красного до светло - желтого и бесцветного [20, 24].

Размеры колоний не превышают как правило 2-3 мм в диаметре, края колоний ровные, рост по штриху колоний разнообразен и зависит от вида бактерий [20, 24].

Признаки, которые являются общими для членов рода *Thermomonas* - то, что они являются аэробными, Грамм отрицательными не спорообразующими бактериями, имеющими палочковидную форму, клетки часто подвижные, что обусловлено наличием одного жгутика, расположенного монотрихально [24].

Размеры клеток бактерий рода *Thermomonas* могут быть различными в зависимости от вида и условий среды. Обычно они варьируют от 0,5 до 2 микрон. Некоторые виды, такие как *T. haemolytica*, имеют длину в 3-4 микрона [24].

В литературных источниках часто описываются виды рода *Thermomonas* как факультативные анаэробные хемолитоавтотрофные микроорганизмы донорами электронов для бактерий данного рода являются различные органические соединения такие как например: глюкоза, мальтоза, фруктоза и т.д. [17].

Акцепторами электронов согласно большинству авторов являются неорганические соединения к примеру: O₂, H₂ нитраты сульфиты и т.д., а также ионы различных металлов таких как: Fe²⁺ Co²⁺ Mg и др [15].

Бактерии рода *Thermomonas* обладают высокой нитрифицирующей способностью, то есть они способны к биологическому окислению аммония до нитрита и далее до нитрата. Это процесс, который необходим для поддержания биологического цикла азота в почвах и водных экосистемах.

Согласно статье Марты П. Альвес (2002г.) так как бактерии данного рода обычно обитают в горячих и термальных источниках, где высокие температуры, могут стимулировать их нитрифицирующую способность. Они также могут присутствовать в почвах и других средах, где содержание аммония высокое что способствует увеличению нитрифицирующей активности [25].

Как было написано ранее, многие авторы выделяют рост бактерий рода *Thermomonas* на органических субстратах зависит от нескольких факторов, включая температуру, pH, наличие питательных веществ и наличие кислорода.

Также рост бактерий рода *Thermomonas* требует наличия питательных веществ, таких как углеводы (глюкоза, фруктоза и другие сахара и соединения), белки или липиды (в большинстве своем глицерины и дилэтанолламины). В то же время, они могут использовать различные органические соединения в качестве источников углерода и энергии.

Кроме того, бактерии рода *Thermomonas* обычно предпочитают нейтральную или слегка щелочную среду с pH около 7, но в некоторых случаях они могут расти при более кислых условиях.

Так как большинство видов *Thermomonas* являются аэробами, то есть они требуют кислорода для роста. Однако некоторые виды могут расти и в отсутствие кислорода, используя альтернативные электронные акцепторы, такие как нитраты или окисляемые металлы.

Во многих литературных научных статьях и источниках видовое определение бактерий рода *Thermomonas* многими авторами определялось ПЦР методом, рибосом 16S анализа последовательности рДНК [18, 24].

Данная последовательность представляет собой около 1500 нуклеотидных пар. Сравнение этих последовательностей с представителями

основных линий происхождения в пределах домена Бактерии показали, что представители рода *Thermomonas* находятся в субклассе *Proteobacteria* и был наиболее тесно связан с бактериями рода *Lysobacter* и рода *Xanthomonas*.

Так же в своих статьях исследователи сравнивали последовательность 16S рДНК, определенную для рода *Thermomonas*, с последовательностями всех официально опубликованных видов *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* и *Xylella* (Wells et al., 1987; Drancourt et al., 1997; Hauben et al., 1997; Moore et al., 1997; Hauben et al., 1999; Tre'baol et al., 2000), а также штаммами, объединяющие различные геномные виды *Stenotrophomonas*, но не дифференцированные таксономически (Hauben et al., 1999) [21, 24].

Последовательности 16S рДНК видов относительно новых родов *Luteimonas* и *Pseudoxanthomonas*, также относящихся к *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* и *Xylella*, описаны Finkmann et al. (2000), также сравнивали с родом *Thermomonas* для определения его таксономического положения [21, 24].

Из описанного выше рядом исследователей Мён Кюм Кимом и Ван-Тхэк Имом в 2006 году (Южная Корея) были сформулированы основные характеристики бактерий рода *Thermomonas*:

1. Адаптация к высоким температурам: Бактерии рода *Thermomonas* приспособлены к выживанию и функционированию при высоких температурах, обычно в диапазоне 30-75°C. Они обладают уникальным набором белков теплового шока, которые помогают им оставаться функциональными при высоких температурах [26].

2. Утилизация сложных и простых углеводов: Бактерии рода *Thermomonas* могут использовать широкий спектр сложных углеводов, включая целлюлозу, гемицеллюлозу и пектин. Они также способны использовать простые сахара, такие как глюкоза, фруктоза и сахароза в качестве источника углерода [26].

3. Производство ферментов: Бактерии *Thermomonas* производят различные ферменты, включая целлюлазы, ксиланазы и пектиназы, которые

позволяют им расщеплять сложные углеводы до более простых соединений, таких как глюкоза, которые могут быть использованы для получения энергии.

4. Фиксация азота: Некоторые виды *Thermomonas* способны фиксировать азот, что предполагает преобразование азотного газа в форму, которая может быть использована растениями для роста и развития [26].

К сожалению работы, с культурами и видами рода *Thermomonas* ведутся крайне медленно ввиду их культуральных особенностей и малого размера клеток, а также из-за проблем, связанных с местами отбора проб.

Бактерии данного рода по мнению многих авторов являются достаточно перспективными для биоинженерии и дальнейших исследований.

1.2 Систематическое положение бактерий рода *Thermomonas*

По систематическому положению бактерии рода *Thermomonas* относятся к типу *Proteobacteria*, классу *Gammaproteobacteria*, порядку *Xanthomonadales*, семейству *Xanthomonadaceae* [15].

Класс *Gammaproteobacteria* принадлежит к типу *Proteobacteria* и включает около 250 родов, что делает его наиболее родовым таксоном прокариот. К этому классу принадлежат несколько важных с медицинской, экологической и научной точек зрения групп бактерий [11].

В большинстве он состоит из множества грамотрицательных микробов и является наиболее филогенетически и физиологически разнообразным классом протеобактерий [22].

Обычно они имеют разнообразные формы, такие как палочки, изогнутые палочки, кокки, спириллы и волокна, и включают свободноживущие бактерии, образующие биопленки, комменсалы и симбионты, некоторые также обладают отличительной чертой биолюминесценции [12].

Метаболизм, обнаруживаемый у разных родов, очень отличается; существуют как аэробные, так и анаэробные (облигатные или факультативные) виды, хемолитоавтотрофы, хемоорганотрофы, фотоавтотрофы и гетеротрофы и др [12].

Порядок *Xanthomonadales* состоит из 28 правильно названных родов бактерий из двух семейств: *Xanthomonadaceae* и *Rhodanobacteraceae*. *Xanthomonadaceae* состоит из 13 родов в то время как *Rhodanobacteraceae* состоит из 14 родов. Семейства можно отличить друг от друга на основе консервативных сигнатурных инделей (небольших последовательностей генома), обнаруженных среди множества белков, специфичных для каждого семейства [20].

Эти индели проводятся параллельно с филогеномным анализом, который выявляет две отдельные клады, которые, по-видимому, эволюционно расходятся. *Lysobacterales* и *Lysobacteraceae* являются более ранними синонимами *Xanthomonadales* и *Xanthomonadaceae* соответственно [20].

Бактерии порядка *Xanthomonadales* представляют собой: грамотрицательные, каталазоположительные, не образующие спор аэробы. Члены отряда представляют собой прямые стержневидные палочки. В то время как некоторые члены отряда неподвижны, другие виды в отряде подвижны посредством жгутиков [18, 23, 24].

Бактерии семейства *Xanthomonadaceae* широко распространены и заселяют самые разные среды обитания [20].

Виды рода *Lysobacter* встречаются в почве и пресной воде. *Nevskia* обитает преимущественно на поверхности воды и образует плоские образования с отдельными клетками, выделяющими слизистый секрет [18].

Бактерии рода *Thermomonas* включают в себя термофильные грамотрицательные бактерии (5 видов). Эти микроорганизмы населяют различные горячие и теплые районы, такие как горячие источники, геотермальные и подводные источники [22].

Бактерии рода *Thermomonas* обладают высокой теплостойкостью и могут расти при температурах от 20 до 75 ° C. Они также способны использовать разнообразные источники углерода и энергии, включая сахара, ксилан, целлюлозу и другие сложные углеводы [23].

Многие виды, особенно из рода *Xanthomonas*, являются патогенными для растений, некоторые из них также могут быть опасны для человека [5].

Род *Stenotrophomonas* распространен в больницах и может вызывать внутрибольничные инфекции.

1.3 Обзор бактерий вида *Thermomonas fusca*

Одним из ярких представителей бактерий рода *Thermomonas* является культура микроорганизмов вида *Thermomonas fusca*. Данный вид бактерий впервые был выделен из проб экспериментального реактора денитрификации исследователем Joris Mergaert в 2003 году [23].

Согласно исследованию автор столкнулся с рядом проблем таких как: определение оптимума температурного роста, а также выделение клеток бактерий вида *Thermomonas fusca* в виду специфики роста данных бактерий на плотных питательных средах [23].

На плотных средах бактерии данного вида с сопутствующими их бактериями из проб образуют биопленки что затрудняет идентификацию бактерий и их видовое определение [22, 23].

Бактерии вида *Thermomonas fusca* обитают в почвенных слоях и в грунтовых водах на глубине 200–300 метров. На данный момент данные бактерии найдены на обширной территории преимущественно в диагностических и исследовательских скважинах [23].

При посевах на плотные питательные среды такие как соевый агар или R2a учеными авторами были выявлены следующие культуральные особенности: по типу питания бактерии вида *Thermomonas fusca* относятся как факультативные аэробные хемолитоавтотрофные микроорганизмы. Донорами электронов для бактерий данного рода являются различные органические соединения такие как например: глюкоза, целлюлоза, маноза и т.д [22].

Акцепторами электронов бактерий вида *Thermomonas fusca* являются ионы Fe^{2+} а также нитраты и ионы тяжелых металлов [5]

Данный вид обладает денитрифицирующими способностями, то есть данная культура способна к биологическому окислению аммония до нитрита и далее до нитрата [5].

Как следует из ранее написанного основным местом обитания являются денитрифицирующие исследовательские реакторы и хранилища жидких радиоактивных отходов так как в данных природных местах большое содержание нитратов и аммонийных солей [11]

Культура *Thermomonas fusca* растет при температурах от 10 до 45 и °С как в бескислородных условиях, так и в присутствии кислорода, что свидетельствует согласно исследованиям ряда авторов о мезофильности данной культуры [10, 12]

Рост происходит при показателях pH от 6.0 – 8.0, но в некоторых случаях они могут расти при более кислых условиях.

Колонии при росте на плотных питательных средах представляют собой округлые блестящие образования, с гладкими краями, красного цвета, размерами диаметра не превышающими 1-2 миллиметра [23].

Рост колоний происходит поверхностно на плотных питательных средах, на жидких питательных средах рост культуры происходит замедленно и в крайне малых количествах порой не достаточных для анализа [6].

Аэробный, рост на твердых питательных средах происходит с нитратом в качестве акцептора электронов. Рост происходит на комплексной среде при 4-37 °С, но при 50 °С культура не растет.

Оптимум роста для культуры *Thermomonas fusca* находится при 28-37 °С. На твердой питательной среде R2A после 5 дней инкубации при 28 ° С образуются выпуклые, круглые, гладкие, полупрозрачные колонии диаметром около 2 мм и с целыми краями.

Рост при 20 ° С исследователи получают коричневые колонии с темным центром, но при более высоких температурах некоторые штаммы остаются не пигментированными или имеют слабозелтый цвет.

Как изложено ранее клетки бактерии *Thermomonas fusca* восстанавливают нитрат и нитрит [22].

При исследовании ряда авторов на ферментативные реакции были выявлены следующие особенности:

- положительные реакции присутствуют для следующих ферментов: оксидаза, каталаза, щелочная фосфатаза, валинариламидаза, цистинариламидаза, лейцинариламидаза, кислая фосфатаза и α -глюкозидаза [22].
- Отрицательные реакции наблюдаются для следующих ферментов: аргининдигидролаза, уреазы, α -галактозидаза, β -галактозидаза, β -глюкуронидаза, β -глюкозидаза, α -маннозидаза, N-ацетилглюкозаминидаза и α -фукозидаза [22, 23].
- Спорные моменты наблюдаются при росте на: глюкозе, маннозе, мальтозе, арабинозе, манните, глюконате, капрате, адипате, малате, цитрате или фенилацетате [23].

Клетки бактерий вида *Thermomonas fusca* представляют собой палочковидные стержни, образующие нити, и имеют ширину 0-7 мкм на длину 3-10 мкм. Клетки являются подвижными, движения происходят посредством одного полярного монотрихозного или немотильного (крайне тонкого и маленького) жгутика [27].

Для определения и анализа жирных кислот бактерий вида *Thermomonas fusca* выращивали в течение 48 ч на TSA (Твердый соевый агар) и их метиловые эфиры жирных кислот экстрагировали и разделяли с помощью GLC с использованием системы MIDI (MICROBIAL ID), как описано ранее (Mergaert 1993-2003г.) [23].

Для всех протестированных штаммов *Thermomonas fusca* клеточные экстракты содержали главным образом разветвленные жирные кислоты. У вида *Thermomonas fusca* были обнаружены широкие диапазоны относительных количеств для жирных кислот C14: 0 и C16: 0, но не было

четкой корреляции с геномными данными и филогенетическим сходством [23].

Исходя из вышеизложенного ряд исследователей обобщает все сведения о виде *Thermomonas fusca*. Вот некоторые ключевые характеристики предложенные (Mergaert 2003г.) для этого конкретного вида:

1. Морфология: *Thermomonas fusca* - это грамотрицательная палочковидная бактерия. Клетки обычно составляют 1-3 мкм в длину и 0,5-0,7 мкм в ширину [23].

2. Температурный диапазон: *Thermomonas fusca* - термофильная бактерия, оптимальная температура роста которой составляет около 30°C. Она может расти в диапазоне температур 20-45°C [23].

3. Рост при различных источниках углерода: *Thermomonas fusca* способна использовать для получения энергии как простые сахара, так и сложные углеводы, включая глюкозу, фруктозу, сахарозу и ксилан [23].

4. Ферменты: *Thermomonas fusca* производит различные ферменты, включая целлюлазы и ксиланазы, которые позволяют ему расщеплять сложные углеводы до более простых соединений.

5. Фиксация азота: *Thermomonas fusca* способен фиксировать азот, что предполагает преобразование азотного газа в форму нитратов и нитритов.

1.4 Сравнение бактерий вида *Thermomonas fusca* с другими представителями рода *Thermomonas*

Согласно последним исследованиям, проведенным в Иордании (2013 год) бактерии вида *Thermomonas fusca* являются неоднозначными представителями рода *Thermomonas*. Так место обитания *Thermomonas fusca* отличается от всех остальных представителей своего рода. *Thermomonas hydrothermalis* обитают согласно исследованиям в геотермальных районах и геотермальных источниках [26].

Другие же представители рода *Thermomonas* обитают в почвенных слоях, как и вид *Thermomonas fusca*. Однако из-за температурных и

климатических различии мест обитания наблюдаются изменения культуральных и биологических, а также физиологических свойств бактерий [23, 26].

Так бактерии видов *Thermomonas haemolytica* и *Thermomonas hydrothermalis* обладают температурным порогом роста культуры до 50 редко 70 ° С. Соответственно многие исследователи относят данные виды культур к скорее к факультативным термофильным видам бактерий [20].

Бактерии остальных видов в том числе *Thermomonas fusca* и *Thermomonas brevis* имеют более низкий температурный порог до 45–50 ° С.

Соответственно согласно изложенным данным данные бактерии в научных источниках относят скорее к мезофильным реже к термотолерантным бактериям [10, 23].

По способу питания все бактерии рода *Thermomonas* относят к хемолитоавтотрофам однако акцепторы электронов у вида *Thermomonas fusca* в отличие от остальных бактерий приходящихся данному роду отличается.

Акцепторами у представителей микроорганизмов рода *Thermomonas* являются органические соединения как правило это молекулы углеводов или сахаров [20].

Акцепторами же электронов бактерий вида *Thermomonas fusca* являются ионы Fe^{2+} а также нитраты и ионы тяжелых металлов [23].

Что так же выделяет данные бактерии из рода *Thermomonas*. Донорами же электронов для всего рода бактерий являются органические соединения и субстраты [26].

Рост бактерий в присутствии нитрат ионов у культуры *Thermomonas fusca* и культуры *Thermomonas haemolytica* довольно высок и преобладает. В отличие от остальных представителей рода *Thermomonas* где рост в присутствии данного иона не наблюдается [19].

Культуральные свойства вида *Thermomonas fusca* так же отличаются от представителей рода *Thermomonas*. Так цвет колоний представителей видов Т.

fusca и *T. hydrothermalis* имеют оттенки от светло коричневого (розового) до светло желтого (в зависимости от температуры инкубации культур) [23].

В других научных работах упоминается что колонии остальных представителей рода *Thermomonas* не обладают пигментацией и как правило бесцветны [23, 24].

Остальные культуральные свойства колоний рода *Thermomonas* как правило в основном схожи между собой т.е. колонии обладают поверхностным ростом на твердых питательных средах, округлые, обладают блеском и густой консистенцией [24].

Так же отличаются и размеры колоний в зависимости от места обитания и отбора проб колоний вида *Thermomonas fusca* гораздо мельче (не более 1 - 1,5 мм в диаметре) других представителей данного рода [23].

Так, например, максимальный размер колоний наблюдается у культуры вида *Thermomonas hydrothermalis* и составляет в диаметре от 2–4 мм [21].

Согласно научным и литературным источникам в среднем размеры колоний варьируются в зависимости от вида культуры и находятся в диапазоне от 1–3,5 мм в диаметре [23, 24].

Из изложенных ранее данных многие авторы делают выводы из размеров бактериальных клеток рода *Thermomonas* [24].

Так клетки вида *Thermomonas fusca* обладают самыми маленькими размерами и составляют: ширина 0.7, длина 3–5 реже 10 мкм [23].

Остальные представители рода обладают значительно большими размерами к примеру клетки, *Thermomonas haemolytica* имеют размеры: ширина 1–1.2, длина достигает до 12.0 мкм.

Средние размеры представителей рода *Thermomonas* составляют ширина 1.0, длина 2–4 мкм.

По составу клетки данного рода как правило идентичны и изменения в составе не значительны. Но клетки вида *Thermomonas fusca* имеют один жгутик, расположенный монотрихально [19].

В отличие от остальных видов рода *Thermomonas* в которых движения клеток производится скольжением по поверхности питательной среды. Наличие жгутиков у бактериальных клеток так же зависит от места обитания и является адаптационной способностью бактерий данного рода [24].

Согласно литературным источникам *Thermomonas fusca* имеет некоторые общие черты с другими представителями рода *Thermomonas*, но также обладает некоторыми отличительными характеристиками, которые выделяют его среди других видов бактерий рода *Thermomonas*. Вот некоторые из них:

1. Морфологические особенности: Все виды бактерий рода *Thermomonas* - грамтрицательные палочковидные бактерии, но *Thermomonas hydrothermalis*, как правило, немного крупнее, чем *Thermomonas fusca*.

2. Температурный диапазон: Не все бактерии рода являются термофильными и оптимально растут при температуре выше 50°C. Однако оптимальная температура роста *Thermomonas fusca* составляет около 30-40°C, тогда как *Thermomonas hydrothermalis* и *Thermomonas haemolytica* оптимально растут при несколько более высоких температурах (55-57°C и 50-55°C, соответственно).

3. По использованию источников углерода: все представители рода способны использовать для получения энергии как простые сахара, так и сложные углеводы. Однако в научных статьях было показано, что *Thermomonas fusca* имеет более широкий спектр субстратов, чем *Thermomonas hydrothermalis* и *Thermomonas haemolytica*.

4. Ферменты: все представители рода *Thermomonas* являются продуцентами различных ферментов, включая целлюлазы и ксиланазы, которые позволяют им расщеплять сложные углеводы. Однако конкретные ферменты и уровни их активности у разных видов могут отличаться.

5. По фиксации азота: все представители данного рода бактерий *Thermomonas* способны фиксировать азот, что делает их потенциально полезными для повышения плодородия почвы. Однако степень их

способности к фиксации азота и конкретные источники азота, которые они используют, могут различаться между видами.

1.5 Практическое применение термофильных бактерий и бактерий рода *Thermomonas* в химической и биологической промышленности, а также в биоинженерии

Термофильные микроорганизмы принимают активное участие в современных биогеохимических процессах в наземных и морских гидротермальных местообитаниях. Они преобразуют горные породы, синтезируя органическое вещество и изменяя состав минералов, содержащих серу, железо, кремний и другие химические элементы. Согласно некоторым современным гипотезам, первыми живыми организмами на планете были анаэробные автотрофные прокариоты, способные существовать при повышенных температурах. Эти микроорганизмы могут перерабатывать самые разные «несъедобные» вещества и служить источником устойчивых к нагреву белков, которые пригодятся для производства еды, тканей, моющих средств и многого другого [13].

Термофильные анаэробные бактерии, обладающих собственными мощными гидролазами, применяют при получении этанола, что значительно ускоряет процесс, так как исключается стадия предварительного гидролиза сырья, а высокая температура культивирования увеличивает скорость реакций. Об этом авторы, Е. Ю. Захарук, Е. Ю. Серова, рассказывают в своей статье про конверсию микробиологических отходов [7].

В своей статье Арьков Р. В. и др. рассуждают о применении термофилов для ускорения химических реакций при очистке сточных вод на предприятиях нефтехимической промышленности [1].

Так очистка загрязненных почв и водных ресурсов так же может производиться бактериями рода *Thermomonas*. Данные бактерии обладают способностью расщеплять токсичные соединения, такие как поликарбонат, который используется в производстве пластиковых бутылок и упаковок. Эти

бактерии могут использоваться в процессе биоремедиации, чтобы очищать загрязненные почвы и воду от токсинов [20].

Некоторые виды рода *Thermomonas*, такие как *Thermomonas hydrothermalis*, используются в биотехнологических процессах для производства энергии, биопластиков, метаболитов и других продуктов [26].

В работе Золотухина А. В. и соавторов говорится об утилизации трупов животных термофильными микроорганизмами в термальных ямах для обеспечения биологической безопасности территорий и населения арктической зоны [8].

В статье Брэдли Г. Луска и др. говорится о применении культур термофильных бактерий в термофильных микробных электролизерах. Что свидетельствует о возможном применении термофилов производстве электричества [21].

Так бактерия вида *Thermomonas fusca* обладает способностью к аэробной респираторной декомпозиции биомассы, в результате чего выделяется энергия. Эта бактерия может быть использована для производства электричества в биотопливных элементах [20].

В работе Л. Ш. Махмутовой говорится о синтезе витамина В12 для нужд животноводства, при использовании смешанной культуры, в состав которой входят термофильные микроорганизмы. Это даёт возможность говорить о термофилах как о компоненте лекарств в фармакологии [14].

При производстве белков, которые находят широкое применение в пищевой промышленности, а также в фармацевтической и косметической промышленности многие исследователи предполагают использование бактерий рода *Thermomonas* [19].

В своём исследовании Салова Т. Ю., Громова Е. А. сообщают, об использовании смеси, включающую в себя термофильные целлюлолитические микроорганизмы *Clostridium thermocellum* и *Streptomyces sp.*, для утилизации целлюлозосодержащих бытовых отходов [16].

В статье Лян Го и др. говорится об участии термофильных бактерий в

переработке сырья для производства биогаза [18].

При биохимическом производстве могут использоваться бактерии рода *Thermomonas* для производства биополимеров, таких как поли-β-гидроксиалканоаты (РНА), которые могут быть использованы в качестве биоразлагаемых пластиков. Это может помочь сократить нагрузку на окружающую среду, связанную с использованием не биоразлагаемых пластиков [22].

Цзиньинг Чжан, Линь Ли и Юньсин Лю в своей работе пишут об эффективном удалении углекислого газа с помощью термофильного биофильтра при температуре 60 °C [27].

Таким образом, мы можем говорить о существенно важной роли применения термофильных микроорганизмов. Так же можно сказать что бактерии рода *Thermomonas* имеют многообещающие практические применения, которые могут поддерживать устойчивое развитие биотехнологии и помочь сохранить экологическую устойчивость.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Описание объекта исследования

Объект исследования представляет собой микробиологическую культуру штамма SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca*. Данная культура микроорганизмов была выделена из проб подземных вод, отобранных на территории Сибирского химического комбината в 2013 г. из диагностической скважины Б-2/37 сотрудниками Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН.

Территория Сибирского химического комбината — это объединение заводов атомной промышленности. Основным направлением работы предприятия является химическая обработка урана для обеспечения атомной промышленности ядерным топливом. Помимо этого, данный объект является хранилищем жидких радиоактивных отходов. Так для длительного хранения жидких радиоактивных отходов на территории предприятия был создан в 1964 г. подземный гидротехнический резервуар. В 2012 году произошла его консервация. Однако длительное его использование привело к просачиванию радиоактивных отходов в пласты грунтовых вод.

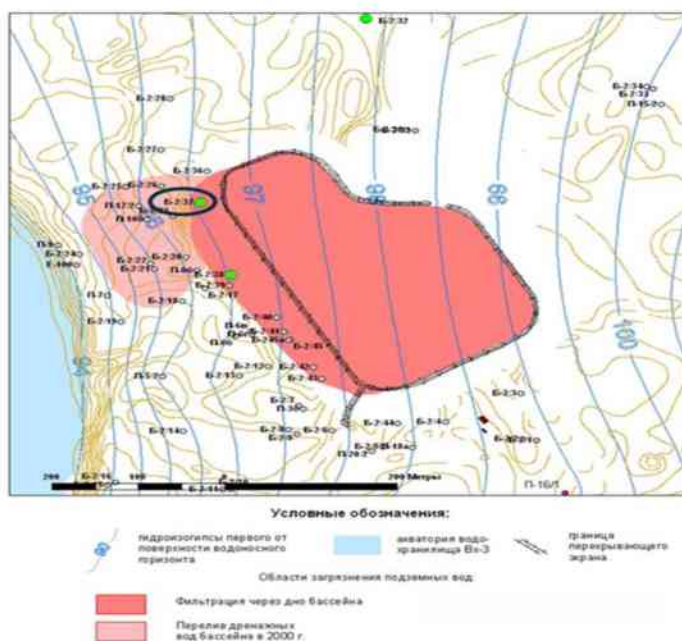


Рисунок. 1. Территория Сибирского химического комбината, диагностическая скважина Б-2/37

Для диагностики загрязнения были пробурены диагностические контрольные скважины (рис. 1). Пробы воды из скважин Б-2/32, Б-2/37 и Б-2/38 были объектами изучения лаборатории нефтяной микробиологии ФИЦ Биотехнологии РАН.

Ранее сотрудниками лаборатории из пластовой воды в районе бассейна Б-2 был выделен целый ряд чистых культур аэробных органотрофных бактерий. Методом анализа гена 16S рРНК в ЦКП «Геном» ИМБ РАН была проведена их идентификация до вида. Выводы о таксономическом положении выделенных штаммов делали по результатам сравнения с последовательностями референтных микроорганизмов из базы данных NCBI Gen Bank.

Из скважины Б-2/37 было выделено более 13 видов бактерий в том числе и *Thermomonas fusca*. Для исследования влияния факторов внешней среды на рост культуры образцы культуры *Thermomonas fusca* штамма SHC 3-19 были переданы студенту ПГУ ФФМЕН Кузнецову Олегу.

Дальнейшее исследование культуры производилось на базе «Пензенского Государственного Университета Педагогического института им. В.Г. Белинского» на факультете «Физико-математических и Естественных наук» в микробиологической лаборатории под руководством к.б.н. доцента Заплата Бориса Петровича.



Рисунок. 2. Колонии штамма SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca*

Колонии штамма SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca* представляют собой округлые однородные структуры с ровным краем, красного – бледно желтого цвета, имеющие блеск (рис. 2). Размер колоний не превышает 2 мм в диаметре и имеют поверхностный рост на плотной питательной среде. По профилю колоний выпуклые, поверхность колоний гладкая. Консистенция исследуемых колоний, густая при снятии с питательной среды не тянется.

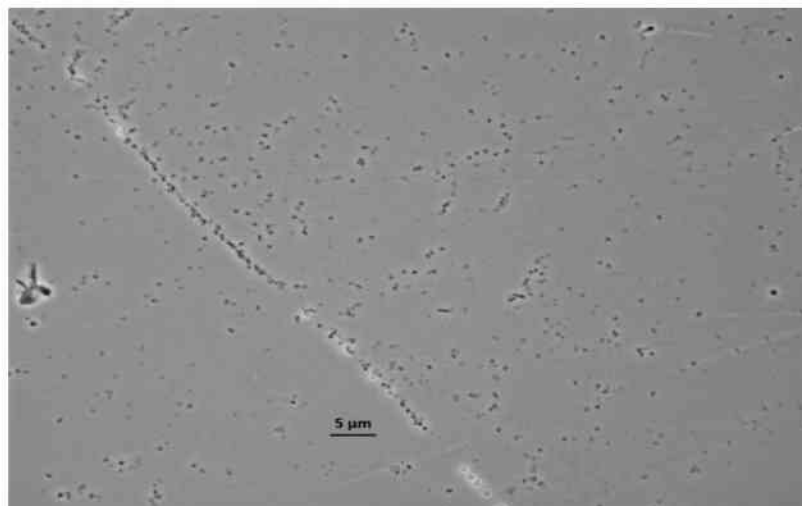


Рисунок. 3. *Thermomonas fusca* штамм SHC 3-19 под микроскопом

При микроскопировании бактерии вида *Thermomonas fusca* имеют вид палочек, размеры которых на плотной агаризованной среде составляют: ширина 0.3-0.5 мкм, длина до 1 мкм (рис. 3).

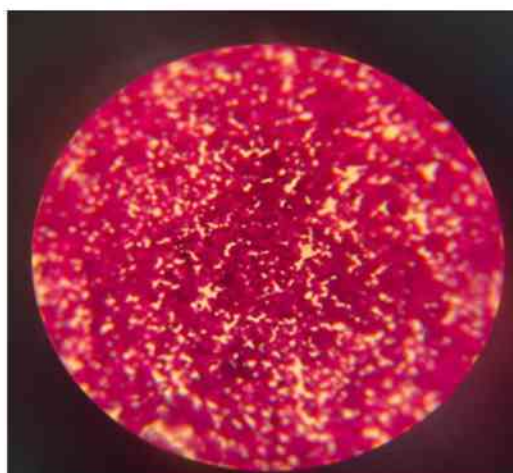


Рисунок 4. Окраска препарата *Thermomonas fusca* по Грамму

Культура подвижна, движения преобладают по прямой что свидетельствует о наличии жгутика, расположенного монотрихально. При окраске по Грамму наблюдаем окрашивание в розовый цвет что говорит о том, что культура SHC 3-19 грамотрицательная (рис. 4).

2.2 Методы исследования.

В ходе работы был использован ряд микробиологических, биохимических и аналитических методов исследования, включая приготовление питательных сред, микробиологический посев на плотную питательную среду, подготовка образцов для световой микроскопии, работа на приборах – микроскопах, рН-метре. Анализ культуральных свойств производился путем визуального наблюдения и оцифровки изображений посевов культуры путем сканирования чашек Петри с последующей работой в фоторедакторе.

Для исследования влияния факторов внешней среды на рост культуры *Thermomonas fusca* таких как: температура, рН среды и влияние различных концентрации NaCl в пит. среде, использовали агаросодержащую твердые питательные среды такие как мясопептонный агар (МПА) и Plate Count Agar (PCA). Стерилизация данных питательных сред производилась с помощью автоклава «Tuttnauer 2540 ML». Последующие посевы бактериальной культуры производились в микробиологическом стерильном боксе «БМБ –II– «Ламинар – С» - 1.2. Последующая инкубация посевов производилась с помощью суховоздушного термостата марки «ТВ – 20 – ПЗ – К» [9].

Для изучения влияния температуры на рост культуры использовался Мясопептонный агар следующего состава на 1 л. мясного бульона(г/л): Пептон – 10.0; NaCl – 5.0; Агар микробиологический – 12.0. рН 6.0 – 7.0 [2].

Посев проводился в одиночной повторности. Инкубация посевов производилась в чашках Петри, стационарно 5-е суток при температуре: 4, 15, 25, 30 и 45°C.

При определении оптимума роста с разным значением pH в твердой питательной среде использовалась агаросодержащая твердая среда Plate Count Agar следующего состава (г/л): Бакто-Пептон – 5.0; Дрожжевой экстракт (Д/э) – 2.5; Глюкоза – 1.0; NaCl – 1.0; Агар микробиологический – 12.0. с Интервалами pH питательной среды от 3.0 – 11.0 включительно. pH доводился при приготовлении среды раствором HCl 39% до значения среды 3.0 и раствором NaOH 10% до значения pH среды 11.0 с помощью pH метра «Мультитест ИПЛ 102» [3].

Посевы производили в одной повторности. Инкубация посевов производилась в чашках Петри, стационарно в термостате в течении 5-е суток при температуре 25–28°C.

Для исследования влияния и роста культуры *Thermomonas fusca* штамма SHC 3-19 при различных концентрациях солей в твердых питательных средах использовался стандартный МРА с добавлением NaCl (0.5, 1, 3, 5, 6, 10, 15 г/л) pH 6.0–7.0.

Посев культуры производился в одиночных повторностях. Инкубация посевов производилась в чашках Петри, стационарно в термостате в течении 5-е суток при температуре 25–28°C.



Рисунок. 5. Визуальное наблюдение и измерение колоний *Thermomonas fusca*

Анализ полученных результатов производился путем визуального наблюдения за ростом культуры и метрическими измерениями с описанием культуральных свойств и их изменений с занесением результатов в таблицы (рис. 5).

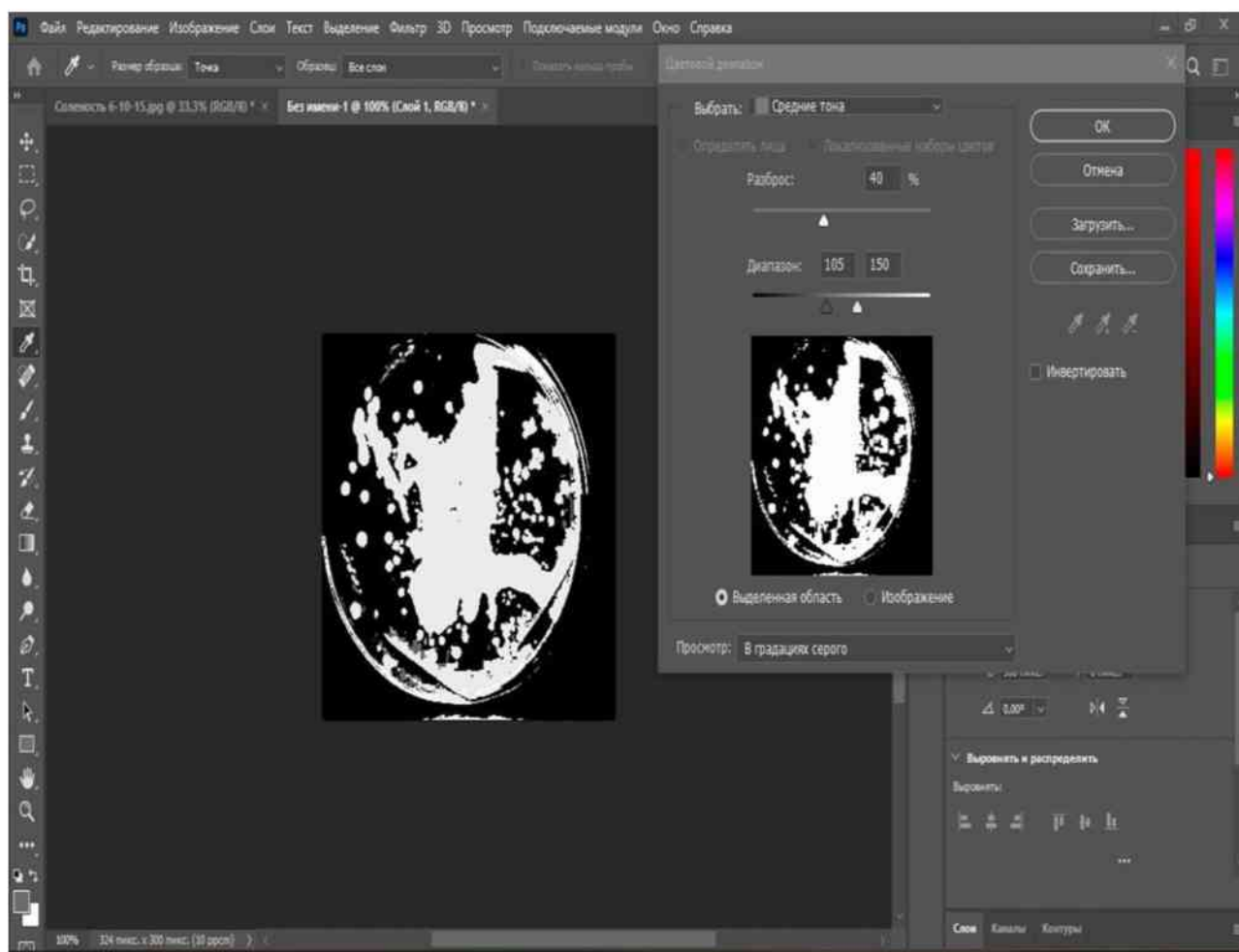


Рисунок 6. Обработка и анализ полученных фото результатов в графической программе Adobe Photoshop

Подсчет выросшей культуральной массы *Thermomonas fusca* производился путем сканирования чашек Петри. Дальнейшая обработка фото результатов происходила в компьютерной программе Adobe Photoshop 2023 года выпуска. Для расчетов производилась фото коррекция полученных фотографий выросших культур. С последующим выделением контуров

колоний и расчетом количества выросшей культуральной массы на 1 см² (рис. 6).

В дальнейшем полученные результаты для простоты обработки были переведены в процентные значения.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Культуральные и морфологические признаки вида *Thermomonas fusca* штамма SHC 3-19

На первом этапе работы была поставлена задача проверки на микробиологическую чистоту и прирост биомассы для последующего исследования штамма SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca* привезенного из Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН ФИЦ Биотехнологии РАН в виде флаконов с культуральной жидкостью, полученные 10.10.2022 г (рис 7).



Рисунок 7. Флаконы с культуральной жидкостью культуры *Thermomonas fusca*

Методом последовательных пересевов единичных колоний на плотные питательные среды при 28°C получены чашки Петри, содержащие однотипные колонии (рис. 8). Были определены культуральные признаки (цвет, форма, консистенция и размер колоний), морфология и размеры клеток полученных культур.



Рисунок 8. Культура *Thermomonas fusca* посев на анализ культуральных свойств и прирост бактериальной массы

Согласно полученным данным полученные посевы культуры *Thermomonas fusca* представляют собой поверхностно растущие, блестящие колонии светло – желтого цвета, с ровным и гладким краем, выпуклые по форме, однородные по структуре размерами не превышающие 3мм.

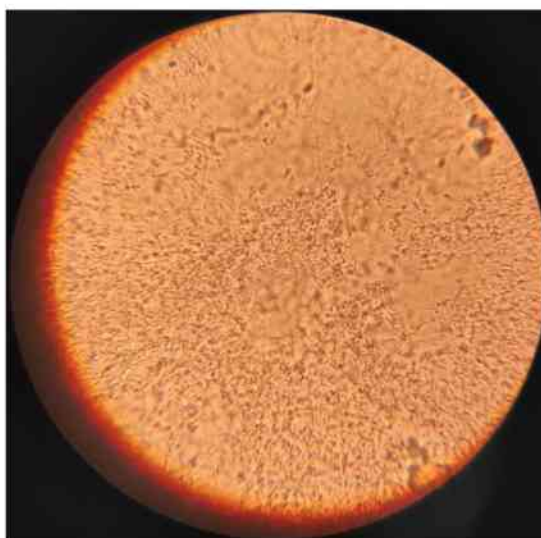


Рисунок 9. Микроскопирование при масляной иммерсии. Живой препарат культуры *Thermomonas fusca* штамма SHC 3-19

Изучение морфологии клеток производилось при световой микроскопии с масляной иммерсией в результате которой было установлено, что бактерии активны имеют прямолинейные движения. Все клетки визуальнo при наблюдении однотипные имеются как одиночные клетки, так и слипшиеся между собой палочки. Что является морфологическими признаками чистоты культуры и является показателем принадлежности бактерий к виду *Thermomonas fusca* (рис. 9).

3.2 Влияние температуры на рост культуры *Thermomonas fusca*.

Для выявления оптимальных температурных условий роста культуры SHC 3-19, а также изменений культуральных свойств и влияния температуры на прирост биомассы. Культуру выращивали на твердой питательной среде МРА при температуре от +4 до +45°C. Изменение культуральных свойств колоний *Thermomonas fusca* после 5 суток культивирования представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Изменение культуральных свойств *Thermomonas fusca* при влиянии температуры

Признак	Температурный режим			
	4°C	25°C	30°C	45°C
Рост на плотной среде	поверхностный	поверхностный	поверхностный	поверхностный
Размер колоний	менее 1 мм	1-3 мм	2-3 мм	менее 1 мм
Цвет колоний	бледно - розовый	бледно - желтый	бледно - желтый	бледно - белый
Форма колоний	округлая	округлая	округлая	округлая
Профиль колоний	выпуклый	выпуклый	выпуклый	выпуклый
Поверхность колоний	гладкая	гладкая	гладкая	гладкая

Продолжение таблицы 1 - Изменение культуральных свойств *Thermomonas fusca* при влиянии температуры

Признак	Температурный режим	блестящая	блестящая	блестящая
Края колоний	4°C	25°C	30°C	45°C
Структура колоний	однородная	однородная	однородная	однородная
Консистенция колоний	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется
Выделение РП**	нет	нет	нет	нет
Рост по штриху	неоднородный с ровным краем	сплошной с ровным краем	сплошной с ровным краем	сплошной с волнистым краем

** – растворимый пигмент

Как видно из данной таблицы при понижении температуры внешней среды происходит уменьшение колоний, изменение окраски и рост по штриху становится неоднородным. Стоит предположить, что данные изменения скорее всего связаны с адаптацией культуры *Thermomonas fusca* к низкой температуре. Изменение цвета колоний связано так же с адаптационными способностями культуры и наличием защитных пигментов.

При повышении температуры окружающей среды так же происходят изменения размера и цвета колоний что скорее всего связано так же с адаптацией культуры к высоким температурам и активацией защитных пигментов.

Анализ полученной биомассы в ходе исследования влияния температуры на рост культуры был представлен в процентном значении в таблице 2.

Таблица 2 - Результат роста культуры при различных изменениях температуры

Температура (°C)	Площадь выращенной культуры (%)
4	4.8
15	10.7
25	31.41
30	44.0
45	36.02

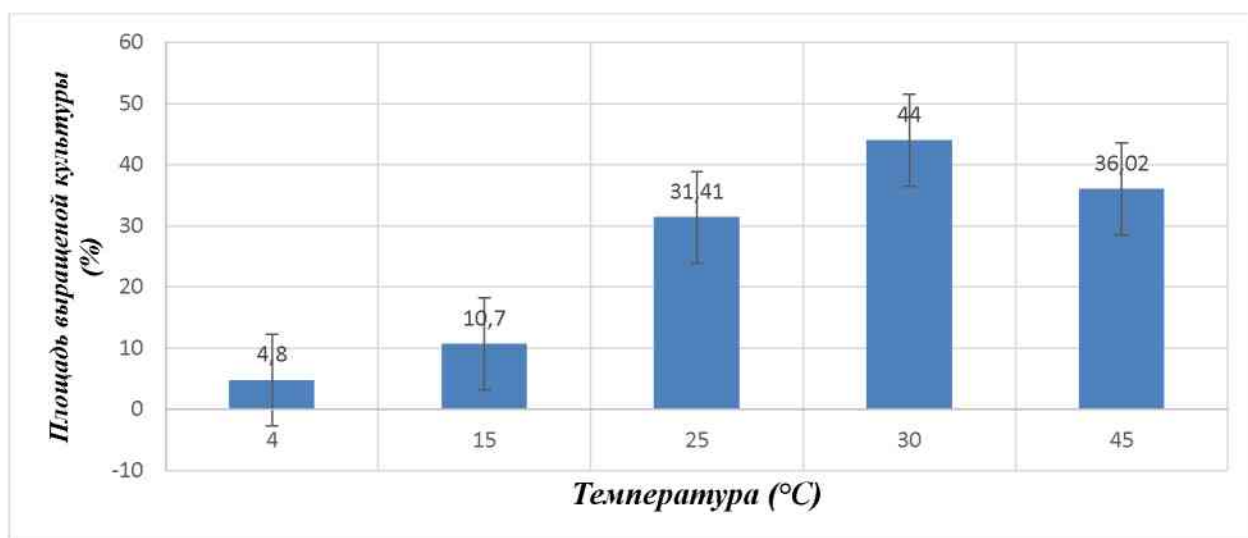


Рисунок 10. Рост штамма SHC 3-19 при различных значениях температуры

Как видно из таблицы 2 и рисунка 10 при снижении температуры внешней среды до +4°C происходит значительное снижение роста клеток и колоний культуры *Thermomonas fusca*. Однако при высокой температуры внешней среды происходит незначительное снижение культуральной массы, но при этом колоний уменьшаются.

Так же было установлено, что наиболее благоприятная температура для роста бактерий штамма SHC 3-19 составляет от +4°C до +45°C. Оптимум роста бактерий отмечен при 25–30°C.

Согласно полученным данным в ходе исследования роста культуры *Thermomonas fusca* при влиянии температурных факторов среды можно предположить, что данная культура является термотолерантным мезофилом.

3.3 Влияние содержания солей на рост культуры *Thermomonas fusca*

При исследовании влияния концентрации солей на рост бактерий штамма SHC 3-19, а также изменений культуральных свойств при различных концентрациях в питательной среде NaCl. Производился ряд посевов на агаросодержащую среду МРА с добавлением соли в различных концентрациях от 0.5 до 15 г/л. Изменения культуральных свойств колоний *Thermomonas fusca* после 5 суток культивирования представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Влияние концентрации NaCl на культуральные свойства *Thermomonas fusca*

Признак	Концентрация NaCl в пит среде			
	1 г/л	6 г/л	10 г/л	15 г/л
Рост на плотной среде	поверхностный	поверхностный	поверхностный	поверхностный
Размер колоний	менее 1 мм	2-3 мм	1-2 мм	менее 1 мм
Цвет колоний	бледно - белый	бледно - желтый	бледно - желтый	бледно - белый
Форма колоний	округлая	округлая	округлая	округлая
Профиль колоний	выпуклый	выпуклый	выпуклый	выпуклый
Поверхность колоний	гладкая	гладкая	гладкая	гладкая
Блеск колоний	матовая	блестящая	блестящая	матовый
Края колоний	гладкие	гладкие	гладкие	гладкие
Структура колоний	однородная	однородная	однородная	однородная

Продолжение таблицы 3 - Влияние концентрации NaCl на культуральные свойства *Thermomonas fusca*

Признак	Концентрация NaCl в пит среде			
	1 г/л	6 г/л	10 г/л	15 г/л
Консистенция колоний	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется
Выделение РП**	нет	нет	нет	нет
Рост по штриху	сплошной с ровным краем	сплошной с ровным краем	сплошной с ровным краем	сплошной с ровным краем

** – растворимый пигмент

Согласно табличным данным при снижении концентрации NaCl в питательной среде происходит уменьшение размеров колоний и изменение цветовой окраски колоний. Также, как и при увеличении концентрации соли в среде. Оптимальная концентрация NaCl для роста колоний *Thermomonas fusca* в питательной среде составляет 5–10 г/л.

Таблица 4 - Влияние концентрации NaCl на рост культуры *Thermomonas fusca*.

Количество NaCl в пит. среде(г/л)	Площадь выращенной культуры (%)
0.5	3.22
1	4.62
3	26.37
5	47.54
6	46.99
10	24.04
15	3.21

Данные полученные в результате исследования влияния концентрации хлорида натрия на прирост биомассы клеток бактерий штамма SHC 3-19 представлены в таблице 4.

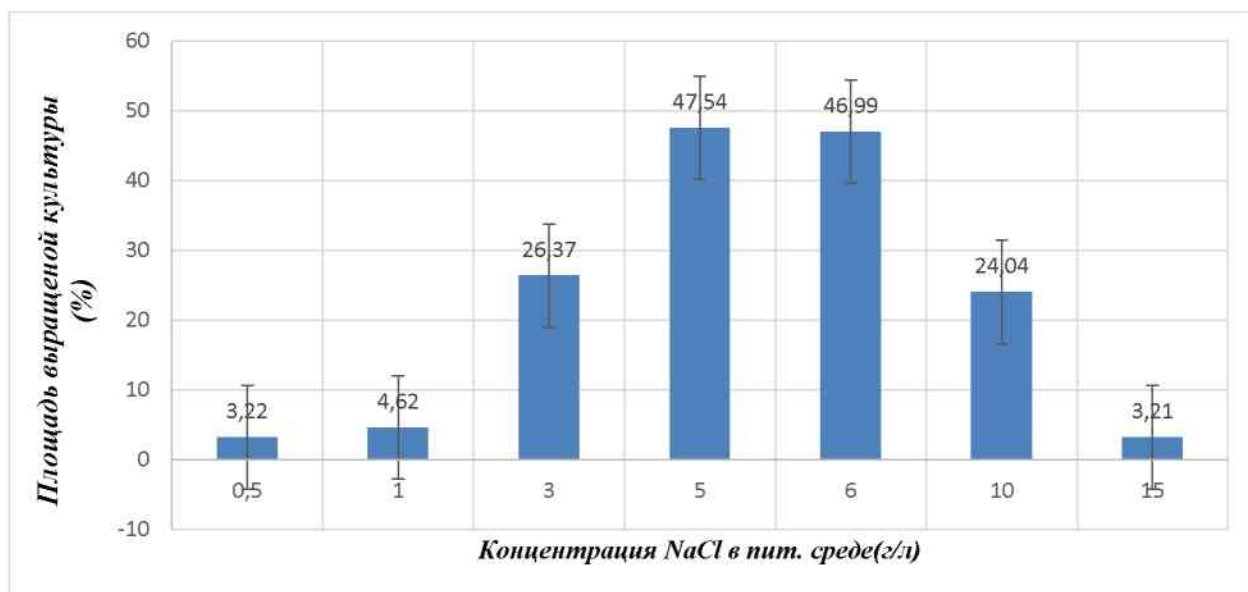


Рисунок 11. Рост штамма SHC 3-19 при различных концентрациях хлорида натрия в среде

Как видно из рисунка 11 и таблицы 8 наиболее благоприятным для роста бактерий штамма SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca* является диапазон концентрации NaCl в твердой питательной среде от 1 – 10 г/л. Оптимум роста культуры наблюдается при концентрациях соли от 3 – 10 г/л. В крайних точках концентрации хлорида натрия в питательной среде наблюдается сниженный и очень слабый рост.

3.4 Влияние изменения pH на рост культуры *Thermomonas fusca*

При анализе влияния pH на рост культуры бактерий, а также изменения культуральных свойств штамма SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca*. Был произведен ряд диагностических посевов на твердую питательную среду PCA с изменением pH в диапазонах кислотности от 3.0 до 11.0. Изменения

культуральных свойств колоний *Thermomonas fusca* после 5 суток культивирования представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Изменение культуральных свойств колоний *Thermomonas fusca* при различных значениях pH среды

Признак	pH			
	3.0	6.0	8.0	11.0
Рост на плотной среде	поверхностный	поверхностный	поверхностный	поверхностный
Размер колоний	менее 1 мм	2-4 мм	1-3 мм	менее 1 мм
Цвет колоний	бледно-розовый	бледно - желтый	бледно - желтый	бледно - белый
Форма колоний	округлая	округлая	округлая	округлая
Профиль колоний	выпуклый	выпуклый	выпуклый	выпуклый
Поверхность колоний	гладкая	гладкая	гладкая	гладкая
Блеск колоний	блестящая	блестящая	блестящая	матовый
Края колоний	гладкие	гладкие	гладкие	гладкие
Структура колоний	однородная	однородная	однородная	однородная
Консистенция колоний	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется	густая, при снятии с агара не тянется
Выделение РП**	нет	нет	нет	нет

Продолжение таблицы 5 - Изменение культуральных свойств колоний *Thermomonas fusca* при различных значениях pH среды

Признак	pH			
	3.0	6.0	8.0	11.0
Рост по штриху	неоднородный с ровным краем	сплошной с ровным краем	сплошной с ровным краем	неоднородный с ровным краем

** – растворимый пигмент

Согласно полученным табличным данным наблюдается ухудшение роста и изменения окраски при снижении или увеличении значения pH в твердой питательной среде. Однако рост культуры при данных значениях все же присутствует. Окраска колоний в этих случаях выступает в роли защитного механизма, связанного с наличием защитных пигментов и механизмов в клетках бактерий. При низких и высоких значениях pH в питательной среде так же наблюдается рост по штриху с неоднородным краем что так же является результатом адаптации к данным условиям среды.

Результаты исследования роста биомассы бактерий *Thermomonas fusca* при разных значениях pH среды представлены в таблице 6.

Таблица 6 - Влияние pH среды на рост клеток культуры *Thermomonas fusca*

pH	Площадь выращенной культуры (%)
3	17.0
4	21.3
5	38.74
6	46.45
7	34.73
8	25.0
9	18.52

Продолжение таблицы 6 - Влияние pH среды на рост клеток культуры *Thermomonas fusca*

10	11.39
11	3.76

По данным таблицы 6 и рисунку 12 было установлено что оптимум роста бактерий приходится на значения pH в питательной среде в диапазоне от 5.0 до 7.0. Наиболее благоприятный pH для роста бактерий в питательной среде составляет от 3.0 до 9.0. Согласно полученным результатам можно предположить, что культура штамма SHC 3-19 *Thermomonas fusca* является кислотоустойчивыми или факультативными ацидофилами, что обусловлено длительными влияниями факторов внешней среды и адаптаций культуры к данным условиям.

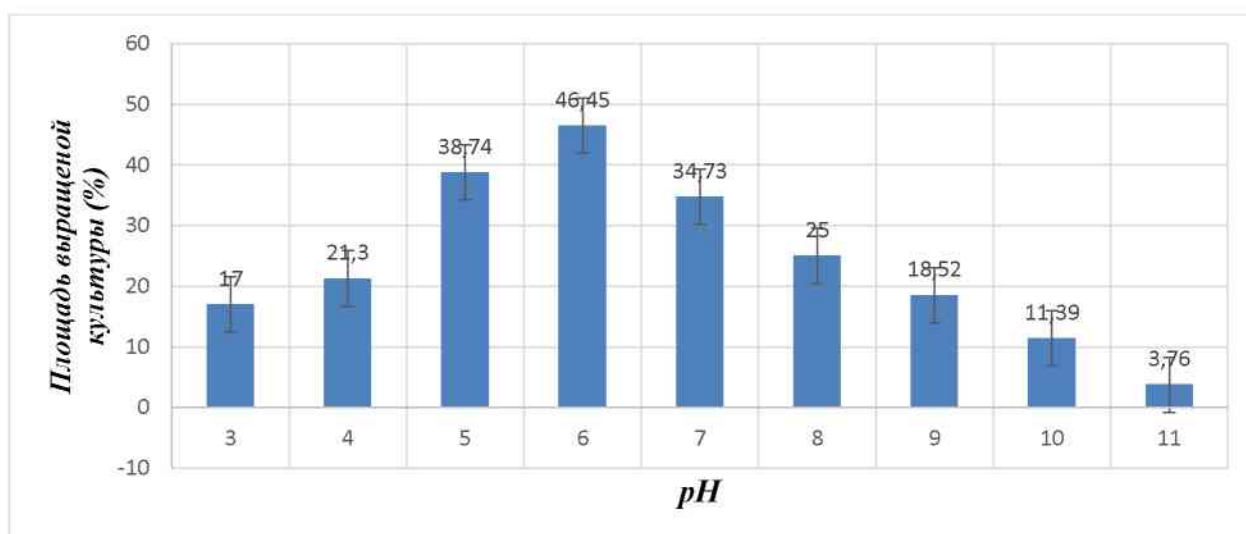


Рисунок 12. Рост штамма SHC 3-19 при различных значениях pH среды

Ранее было установлено, что температура водоносного горизонта в районе бассейна Б-2 на территории СХК составляет 10°C. pH подземных вод близок к нейтральному (6.2–7.5). Окислительно-восстановительные условия характеризуются как микроаэрофильные с переходом в бескислородную область, а значит, не препятствуют протеканию микроаэробных процессов.

Из анализа физико-химических условий пластовых вод и оптимальных режимов роста *Thermomonas fusca* штамм SHC 3-19 следует, что бактерии приспособлены к условиям обитания в подземных пластах и находятся в активном физиологическом состоянии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных исследований было установлено что штамм SHC 3-19 культуры микроорганизмов вида *Thermomonas fusca* находится в активном физиологическом состоянии. А так же имеет ряд особенностей:

1. При морфологическом анализе культуры было выявлено что при микроскопии, все клетки однотипные. Подвижные и не подвижные палочки. Не образуют спор. Есть слипшиеся клетки, при окраске по Грамму наблюдается грамм – отрицательные клетки.
2. Так же было установлено, что наиболее благоприятная температура для роста бактерий штамма SHC 3-19 составляет от +4°C до +45°C. Оптимум роста бактерий отмечен при 25–30°C.
3. Согласно полученным нами данным при исследовании роста культуры *Thermomonas fusca* при различных температурах - данная культура является термотолерантным мезофилом.
4. В ходе исследования было установлено что благоприятным для роста бактерий штамма SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca* является диапазон концентрации NaCl в твердой питательной среде от 1 – 10 г/л. Оптимум роста культуры наблюдается при концентрациях соли от 3 – 10 г/л. В краевых точках концентрации хлорида натрия в питательной среде наблюдается сниженный и очень слабый рост.
5. Так же было установлено, что оптимум роста бактерий приходится на значения pH в питательной среде в диапазоне от 5.0 до 7.0. Наиболее благоприятный pH для роста бактерий в питательной среде составляет от 3.0 до 9.0. Таким образом показано, что культура штамма SHC 3-19 *Thermomonas fusca* является кислотоустойчивыми или факультативным ацидофилом, что обусловлено длительными влияниями факторов внешней среды и адаптаций культуры к данным природным условиям.

В целом, можно отметить, что штамм SHC 3-19 вида *Thermomonas fusca* обнаруженный на территории Сибирского химического комбината в 2013 г. (г.

Северск, Томская обл.) из наблюдательной скважины Б-2/37 находится в оптимальных условиях для роста и физиологического развития.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Арьков Р. В. Улучшение биологической очистки сточных вод на предприятиях нефтехимической промышленности // Наука и современность. 2016. № 1 (7). С. 182 – 188.
2. Асташкина А. П. Приготовление питательных сред и культивирование микроорганизмов. Издательство: Томского политехнического университета. 2015. 18 с.
3. Аникеев В. В., Лукомская К. А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. Москва: Просвещение. 1983. 128 с.
4. Асонов Н. Р. Микробиология. Москва: ВО Агропромиздат. 1989. 230 с.
5. Емцев В. Т. Микробиология: учебник для вузов 5-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа. 2005. 445 с.
6. Есаулов. А. С., Митрофанова Н. Н., Мельников В. Л. Бактериологический метод лабораторной диагностики: учеб. пособие. Пенза: Изд-во ПГУ. 2015. 84 с.
7. Захарук Е. Ю. Микробиологическая конверсия отходов в полезные продукты // техн. конф. студентов и аспирантов, и конкурса по программе «Умник»: Сб. ст. Екатеринбург, 2018. С. 651 – 656.
8. Золотухин А. В. Обеспечение биологической безопасности в арктической зоне // Сборник трудов Международной научно-практической конференции: «Глобальная экологическая безопасность: актуальные проблемы права и практики» Т. II г. Химки: АГЗ МЧС России, 2018. С. 66 – 73.
9. Калганова Т. Н. Практикум по микробиологии и биотехнологии: лабораторные работы. Южно-Сахалинск: СахГУ. 2011. 56 с
10. Корягин Ю. В., Корягина Н. В. Почвенная микробиология: лабораторный практикум. Пенза: РИО ПГСХА. 2006. 205 с.
11. Криштоп В. В., Морозов М. И., Основы морфологии микроорганизмов. СПб: Университет ИТМО. 2021. 98 с.

12. Литусов Н. В. Физиология бактерий. Иллюстрированное учебное пособие. Екатеринбург: Изд-во УГМУ. 2015. 43 с.
13. Лысак В. В., Желдакова Р. А., Фомина О. В. Микробиология. Практикум: пособие. Минск: БГУ. 2015. 115с.
14. Махмутова Л. Ш. Способы получения витамина В12 // Аллея науки. 2017. Т. 5. № 16. С. 132–136.
15. Нетрусов А.И., Котова И.Б. Общая микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений. Москва: Академия. 2007. 220 с.
16. Салова Т. Ю. Способ получения возобновляемых энергетических ресурсов // Научные исследования в современном мире: проблемы, перспективы, вызовы — 2012: Сб. материалов II Международной научной конференции (форума) молодых ученых России и Германии в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» Т. I (Технические науки: Экология, биология) г. Уфа: ФГБОУ ВПО Башкирский ГАУ, 2012. С. 80–85.
17. Сахно О. Н., Трифонова Т. А. Экология микроорганизмов: учеб. пособие. В 3 ч. Ч. 2 / Владим. гос. ун-т. – Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2009. 52 с.
18. Comparison of thermophilic bacteria and alkyl polyglucose pretreatment on two-stage anaerobic digestion with waste sludge: Biogas production potential and substrate metabolism process / G. Liang, [and other] // Bioresource Technology. 2018. Vol. 249. pp. 694–703.
19. Isolation and Characterization of Thermophilic Bacteria from Jordanian Hot Springs: *Bacillus licheniformis* and *Thermomonas hydrothermalis* Isolates as Potential Producers of Thermostable Enzymes / Balsam T. Mohammad, [and other] // International Journal of Microbiology. 2015. Vol. 12. pp. 5 – 10.
20. Prokaryotes of renowned Karlovy Vary (Carlsbad) thermal springs: phylogenetic and cultivation analysis / Tereza Smrhova, [and other] // Environmental Microbiome. 2022. pp. 3 – 9.

21. Simultaneous fermentation of cellulose and current production with an enriched mixed culture of thermophilic bacteria in a microbial electrolysis cell / B. G. Lusk [and other] // Microbial biotechnology. 2018. Vol. 11. pp. 63–73.
22. *Thermomonas carbonis* sp. nov., isolated from the soil of a coal mine / Liang Wang, [and other] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2014. pp. 3631 – 3634.
23. *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly(ϵ -caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas* / Joris Mergaert, [and other] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2003. pp. 1961 – 1965.
24. *Thermomonas haemolytica* gen. nov., sp. nov., a γ -proteobacterium from kaolin slurry / H.-J. Busse, [and other] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2002. pp. 472 – 476.
25. *Thermomonas hydrothermalis* sp. nov., A New Slightly Thermophilic γ -Proteobacterium Isolated from a Hot Spring in Central Portugal / Marta P. Alves // System. Appl. Microbiol. 2003. Vol. 26. pp. 70 – 73.
26. *Thermomonas koreensis* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from a ginseng field / Myung Kyum Kim, [and other] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2006. Vol. 56. pp. 1615 – 1619.
27. Thermophilic biofilter for SO₂ removal: Performance and microbial / Zhang J, [and other] // Bioresource Technology. 2015. Vol. 180. pp. 106 – 111.