

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н. Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

**ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ ГЕТЕРОТРОФНЫХ И
СЕРООКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ НАД ПОДЗЕМНЫМ
ХРАНИЛИЩЕМ ПРИРОДНОГО ГАЗА
АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

Студентки 4-го курса 421 группы
направления 06.03.01 – Биология
биологического факультета
Жандетовой Дианы Набибулловны

Научный руководитель:
профессор кафедры биохимии и биофизики,
д.б.н., доцент _____ Е.В. Плешакова

Заведующий кафедрой биохимии
и биофизики, д.б.н., профессор _____ С.А. Коннова

Саратов 2016

Введение. В результате антропогенной деятельности в окружающую среду поступают различные поллютанты, среди которых наиболее токсичными являются углеводороды (УВ) и их производные, а именно, нефтепродукты [1]. В последние годы проблема нефтяных загрязнений становится все более актуальной. Развитие промышленности и транспорта требует увеличения добычи нефти как энергоносителя и сырья для химической промышленности [2, 3]. Добыча, транспортировка и хранение нефтепродуктов и природного газа приводит к загрязнению окружающей среды. Попадание углеводородов в окружающую среду влечет за собой качественные и количественные изменения почвенной микрофлоры, как на популяционном уровне, так и на уровне микробной клетки [4].

К токсичным компонентам нефти относят серосодержащие соединения, которые чрезвычайно устойчивы в окружающей среде, что представляет опасность для человека и животных. Известно, что в большинстве районов разрабатываются небольшие нефтяные месторождения, приуроченные к отложениям девона и карбона. Продукция месторождений карбона, как правило, содержит сероводород, а пластовые воды девонских отложений – соли железа. Сульфид железа образуется как на стадии совместного транспорта угленосных и девонских нефтей, так и при смешении потоков в сырьевых резервуарах и отстойной аппаратуре.

Почва над подземными хранилищами природного газа может подвергаться загрязнению углеводородами и серосодержащими соединениями, которые негативно влияют на свойства почв и функционирование почвенных биоценозов. Особенно сильно это выражено в тех местах, где проходят нефтепроводы, в районах с предприятиями химической промышленности, использующими в качестве сырья нефть или природный газ, а также на территории хранилищ нефти и газа. В связи с вышесказанным, в почвах над подземным хранилищем газа существует необходимость регулярного проведения почвенно-экологического мониторинга для оценки качества окружающей среды.

Таким образом, целью наших исследований являлась оценка численности индикаторных микроорганизмов в почве над подземным хранилищем природного газа с помощью микробиологического анализа.

Для решения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить общую численность гетеротрофных микроорганизмов в почвенных образцах над подземным хранилищем природного газа.
2. Определить численность сероокисляющих бактерий в исследуемых почвенных пробах.
3. Установить возможность использования показателя численности бактерий исследованных физиологических групп для экологического мониторинга почв в районах газовых хранилищ.

Объектом исследования являлись почвенные пробы, отобранные на территории подземного хранилища природного газа (пос. Степное, Саратовская обл.). Отбор почвенных проб в районе подземного хранилища природного газа производился «методом конверта» в июле 2014 г. в составе группы студентов и преподавателей геологического факультета Саратовского государственного университета имени Н.Г. Чернышевского. Глубина взятия проб составляла 0,1 м. Контрольные (фоновые) пробы отбирали на территории поселка городского типа Степное.

При микробиологическом исследовании образцов почвы изучали численность гетеротрофных и сероокисляющих микроорганизмов. Оценку общей численности гетеротрофных микроорганизмов производили общепринятыми бактериологическими методами на МПА [5]. Для оценки численности нитчатых серобактерий рода *Thiothrix* использовали агаризованную среду Армбрустера [6]. Высевы на селективную среду для учета численности сероокисляющих бактерий производили из разведений 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , из каждого делали по 2 параллельных посева. Колонии микроорганизмов подсчитывали через 5-7 суток инкубации в термостате при температуре 28°C в течение 5-7 суток.

Бакалаврская работа состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материал и методы, результаты исследования), заключения, выводов, списка использованных источников, включающего 53 источника.

Основное содержание работы. Существует несколько методологических подходов к оценке экологического состояния почв, и среди них микробиологический, на наш взгляд, является наиболее чувствительным. Микробиота полифункциональна, и, участвуя в противоположных реакциях, осуществляет стабилизирующую функцию метаболического равновесия в природе. Благодаря большой поверхности контакта со средой, микроорганизмы очень чувствительны к меняющимся условиям существования, а высокая скорость размножения дает возможность в короткий срок выявлять изменения, которые возникают под влиянием экологических факторов.

Над разрабатываемыми газовыми и нефтяными месторождениями авторами [7, 8] установлено повышенное содержание сульфидов железа, увеличение содержания сероокисляющих микроорганизмов и снижение окислительно-восстановительного потенциала в почвенном профиле по сравнению с фоновыми почвами.

В рамках почвенно-экологического мониторинга промышленных и индустриальных ландшафтов совместно с сотрудниками лаборатории геоэкологии СГУ были произведены исследования территории подземного хранилища природного газа (пос. Степное, Саратовская область). На месте данного подземного хранилища газа ранее было месторождение нефти, которая отличалась повышенным содержанием серы.

В ряде исследуемых проб почвы, отобранных в районе Степновского подземного хранилища природного газа, было обнаружено повышенное содержание сульфида железа. В связи с этим, мы предположили, что в такой почве может быть повышенное содержание сероокисляющих бактерий.

Рисунок 1 отображает карту-схему исследованной территории с точками отбора проб почвы.

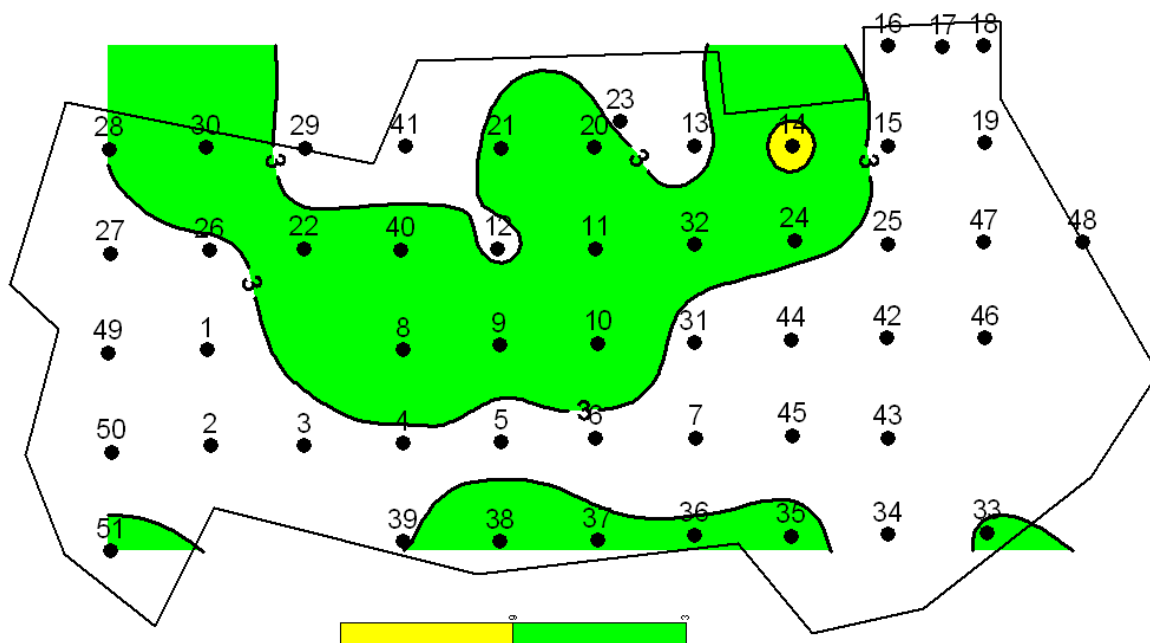


Рисунок 1 – Карта-схема отбора проб почвы в районе подземного хранилища природного газа (Степное, Саратовской обл.) с распределением содержания сульфида железа в почве.

В отобранных почвенных пробах был определен водородный показатель, окислительно-восстановительный потенциал и коэффициент магнитности (K_{mag}) – показатель, отражающий концентрацию железа в почве [9]. Эти данные представлены в таблице 2.

В исследованных нами пробах почвы над подземным хранилищем природного газа общая численность гетеротрофных микроорганизмов различалась в разных вариантах (рисунок 2).

В вариантах № 4, 6, 7 и 10 количество гетеротрофных микроорганизмов составляло около 10×10^5 КОЕ/г почвы. В четырех образцах (№ 1, 5, 8, 9) было несколько ниже – в пределах 2×10^5 КОЕ/г почвы. В варианте № 3 – 17×10^5 КОЕ/г почвы.

И, наконец, один образец почвы отличался повышенной численностью гетеротрофных бактерий, в 5 раз и более выше, чем в других пробах, в варианте № 2 она равнялась 48×10^5 КОЕ/г почвы (рисунок 3).

Таблица 2 – Физико-химические показатели исследованных образцов почв

Номер пробы	pH	Eh, мВ	каппа (10^{-5} ед. СИ)
1	7,56	-11,60	51,9
2	7,97	-33,50	39,8
3	7,88	-26,60	47,8
4	7,70	-19,00	51,7
5	6,88	24,90	53,3
6	7,56	-11,50	46,2
7	7,95	-32,30	41,5
8	7,88	-28,50	58,3
9	7,87	-28,10	70,8
10	8,16	-43,40	58,8

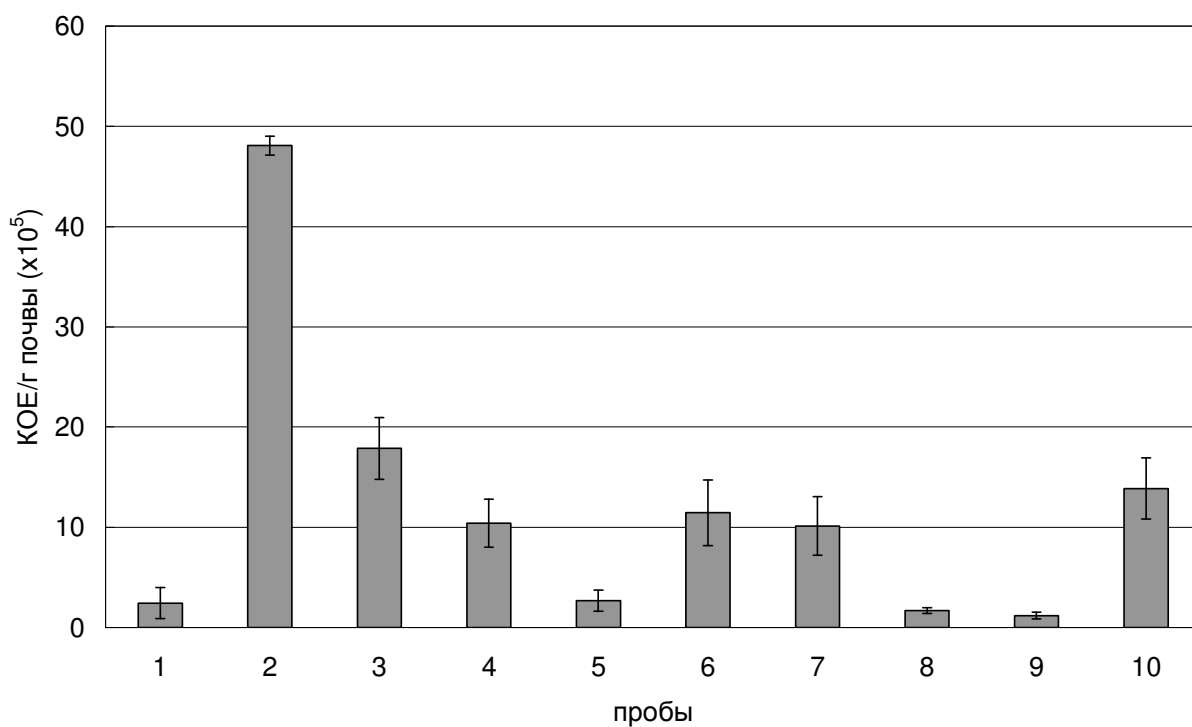


Рисунок 2 – Количественный учет культивируемых гетеротрофных бактерий в исследованных почвенных пробах.



Рисунок 3 – Оценка общей численности гетеротрофных микроорганизмов на МПА при анализе образца почвы № 2 (разведение 10^{-4}).

Для мониторингового анализа нами был выбран также показатель численности сероокисляющих бактерии. Развитие сероокисляющих бактерий на селективной среде в чашках Петри при 28°C становилось заметным на 3-5-е сутки (рисунок 4).

Численность сероокисляющих бактерий в почвенных образцах также варьировала (рисунок 5). В пробах № 1, 2, 5 и 7 количество сероокисляющих бактерий находилось в пределах от 4 до 26×10^3 КОЕ/г почвы.

В пробах 9, 10, 11 и 12 было чуть меньше. Низким содержанием сероокисляющих бактерий отличались пробы № 3, 4 и 6 (<100 КОЕ/г почвы). Максимальное количество сероокисляющих микроорганизмов обнаруживалось в образце № 8 – 82×10^3 КОЕ/г почвы. Следует отметить, что данная почвенная проба находилась в центре зоны повышенного содержания сульфидов железа (рисунок 1).

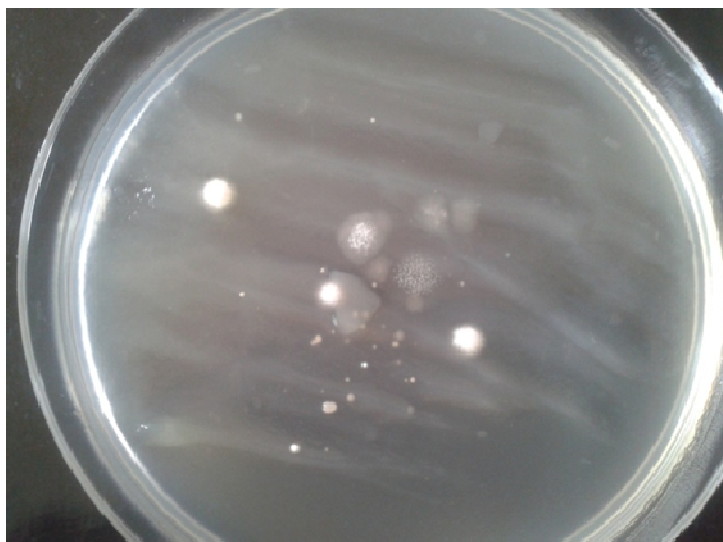


Рисунок 4 – Оценка численности сероокисляющих бактерий на селективной среде при анализе образца почвы № 2 (разведение 10^{-2}).

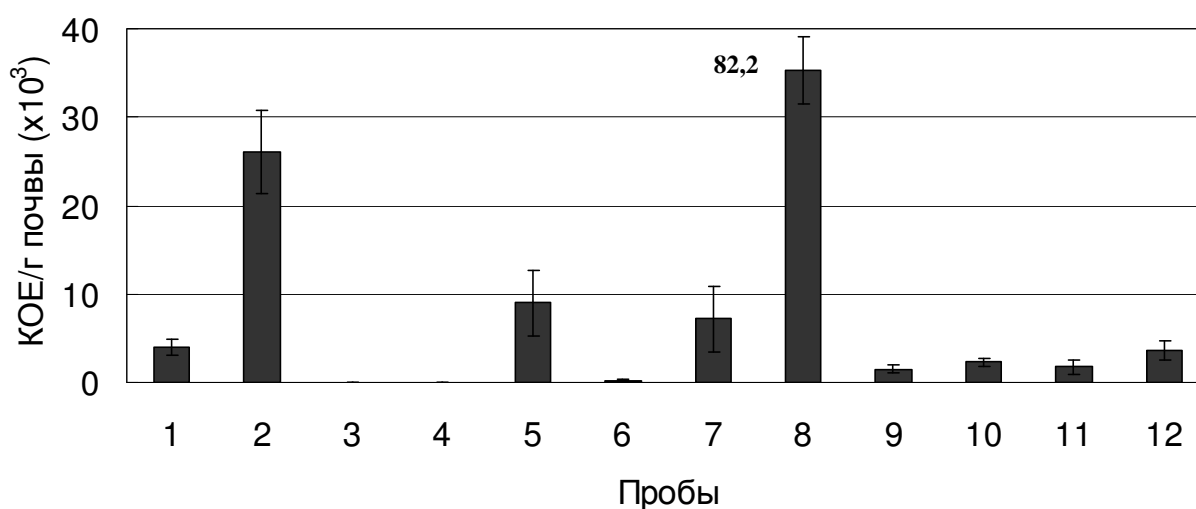


Рисунок 5 – Количественный учет культивируемых сероокисляющих бактерий в почвенных пробах.

Обнаруженное нами в ряде почвенных проб повышенное содержание специализированной микрофлоры связано, на наш взгляд, с селективным воздействием соответствующих субстратов. Поэтому выявленные особенности в почвенных микробценозах могут косвенно свидетельствовать о присутствии в почве серосодержащих соединений.

В контрольных пробах почвы, которые были отобраны за пределами Степновского газового хранилища, сероокисляющие бактерии нами не обнаруживались.

Во всех пробах, которые характеризовались, повышенным содержанием сульфидов железа (пробы №8, 9, 10 и 11), отмечалось наличие сероокисляющих бактерий. А пробы №8 и 9, расположенные в центральной зоне повышенного содержания сульфидов железа, также характеризовались пониженным содержанием гетеротрофных микроорганизмов, что свидетельствует о существенных изменениях в почвенных микробных сообществах.

Таким образом, микробиологическая индикация почвы над Степновским подземным хранилищем природного газа выявила в ряде проб (№ 2, 5, 7, 8) повышенное содержание сероокисляющих бактерий. Показано, что в ряде образцов (пробы № 8, 9, 10, 11) развитие специализированной микрофлоры в верхнем горизонте почв над газовым хранилищем коррелировало с наличием сульфидов железа в повышенной концентрации.

Показана возможность использования показателей численности сероокисляющих бактерий для экологического мониторинга почв в районах газовых хранилищ и месторождений нефти.

Заключение. Нефть и нефтепродукты признаны во всем мире одними из приоритетных загрязнителей окружающей среды. В их состав, помимо углеводородов, которые являются опасными токсикантами, входят серосодержащие соединения, обладающие негативным воздействием на живые организмы. Сера широко распространена в нефтях, углеводородном газе и содержится либо в свободном состоянии, либо в виде соединений, таких как меркаптаны, тиофены, полициклические сульфиды, сероводород. Данные соединения сами обладают повышенной токсичностью, а также способны в процессе трансформации под влиянием внешних факторов образовывать целый ряд вредных побочных продуктов, включая оксид серы.

В почве на разрабатываемых нефтяных месторождениях или подземных хранилищах природного газа, созданных на месте бывших месторождений, образуются токсичные соединения серы, например, сульфид железа. В таких почвах могут произойти изменения численности и видового состава почвенных микроорганизмов.

В связи с вышесказанным, актуальной задачей почвенно-экологического мониторинга в районах подземных газовых хранилищ, является анализ почв по индикаторным микробиологическим показателям.

Было показано, что в образцах почв над подземным хранилищем природного газа (пос Степное, Саратовская обл.) наблюдалось повышенное содержание сульфидов железа в концентрации, превышающих фоновые значения. В рамках почвенно-экологического мониторинга нами была проведена микробиологическая индикация почв над Степновским подземным хранилищем природного газа на основе оценки численности гетеротрофных и сероокисляющих бактерий. В ряде проб обнаружено повышенное содержание сероокисляющих микроорганизмов, тогда как, в образцах почвы, отобранной за пределами газового хранилища, сероокисляющие бактерии не обнаруживались.

Показано, что во всех почвенных образцах с повышенным содержанием сульфидов железа отмечалось наличие сероокисляющих бактерий, а в двух из них наблюдалось пониженное содержание гетеротрофных микроорганизмов. Таким образом, микробиологическая индикация почв позволяет нам судить о степени загрязнения почвы серосодержащими соединениями.

В целом, представляется перспективным использование показателей численности сероокисляющих бактерий для экологического мониторинга почв в районах газовых хранилищ или нефтяных месторождений.

Выводы:

1. Установлено, что общая численность гетеротрофных микроорганизмов варьировала от 2 до 17×10^5 КОЕ/г в большинстве почвенных образцов

над подземным хранилищем природного газа, в одном из них обнаружено повышенное содержание гетеротрофных микроорганизмов – 48×10^5 КОЕ/г почвы.

2. В почвенных образцах над подземным хранилищем природного газа обнаружены сероокисляющие бактерии, численность которых составляла от 4 до 26×10^3 КОЕ/г почвы, в одной пробе содержание сероокисляющих бактерий было выше – 82×10^3 КОЕ/г почвы. В контрольных образцах почвы сероокисляющие бактерии не выявлены.
3. Показано, что во всех почвенных образцах с повышенным содержанием сульфидов железа (№8, 9, 10 и 11) отмечалось наличие сероокисляющих бактерий, а в двух из них наблюдалось пониженное содержание гетеротрофных микроорганизмов.
4. Продемонстрирована возможность использования показателя численности гетеротрофных и сероокисляющих бактерий для экологического мониторинга почв.

Список использованных источников

1. Ларионова, Н. Л. Устойчивость растений к загрязнению почвы углеводородами и эффект фиторемедиации: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Н. Л. Ларионова. Казань, 2005. 153 с.
2. Файзуллин, Т. Н. Нефть: происхождение, состав, методы и способы переработки / Т. Н. Файзуллин. М.: «Москва», 2004. 31 с.
3. Едвардс, Н. Т. Полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) в наземной окружающей среде / Н. Т. Едвардс // Журн. «Качество окружающей среды». 1983. № 12. С. 427-441.
4. Пурмаль, А. П. Антропогенная токсикация планеты / А. П. Пурмаль // Соросовский образовательный журнал. 1998. Ч. 2, № 9. С. 39-45.
5. Нетрусов, А. И. Практикум по микробиологии: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук: под ред. А. И. Нетрусова. М.: Академия, 2005. 608 с.

6. Кузнецов, С. И. Методы изучения водных микроорганизмов / С. И. Корнелиус, Г. А. Дубинина. М.: Наука, 1989. 288 с.
7. Формирование магнитных оксидов железа в почвах над подземными хранилищами газа / Н. В. Можарова [и др.] // Почвоведение. 2007. № 6. С. 707-720.
8. Строганова, М. Н. Магнитная восприимчивость почв урбанизированных территорий (на примере города Москвы) / М. Н. Строганова, А. В. Иванов, М. А. Гладышева // Доклады по экологическому почвоведению. 2012. № 1, Вып. 16. С. 40-80.
9. Решетников, М. В. Магнитная индикация почв городских территорий (на примере г. Саратова) / М. В. Решетников. Саратов: Сарат. гос. тех. ун-т, 2011. 152 с.