

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.
ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕХНОЛОГИИ РЕМЕДИАЦИИ
НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ С ПОМОЩЬЮ БИОПРЕПАРАТА
«ДЕСТРОЙЛ» И СОРБЕНТА МАГНЕТИТА**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 422 группы

Направления подготовки бакалавриата 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Молочко Виктории Николаевны

Научный руководитель:

к.б.н., доцент

_____ О.Ю. Ксенофонтова

дата, подпись

Зав. кафедрой:

д.б.н., профессор

_____ С.А. Степанов

дата, подпись

Саратов 2020

Введение. Почва является основой для сельского хозяйства, ее состояние и качество влияет на эффективность аграрного сектора экономики. С каждым годом проблема загрязнения почв нефтью становится все более глобальной.

При добыче, транспортировке, хранении и переработке нефти происходит загрязнение окружающей среды, в том числе и почв. Углеводороды нефти, попадая в почву, влияют на почвообразовательные процессы, приводят к нарушению экологического равновесия, меняются свойства почвы, ухудшается ее плодородие, которое напрямую связано с жизнедеятельностью микроорганизмов почвы.

Загрязнение нефтью и нефтепродуктами приводит к гибели живых организмов, находящихся на загрязненной территории, или их количество сокращается до 1% и менее от общего фона. Уменьшение численности или исчезновение одной из физиологических групп почвенных микроорганизмов, которые участвуют в процессе разложения органического вещества, может привести к снижению потенциала самоочищения почвы [6].

Таким образом, загрязнение природной среды нефтью и нефтепродуктами – острейшая экологическая проблема во многих регионах России и во всем мире. Очищение почв от нефти является сложным физикохимическим и биохимическим процессом. Скорость и направленность этого процесса зависят от ряда факторов, таких как температура окружающей среды, свойства почв (в том числе влажность), активность микрофлоры, концентрация нефти (нефтепродуктов) в почве и применяемые технологии очистки. Поэтому восстановление загрязненных нефтью земель является одной из актуальнейших на данный момент экологических проблем. На данный момент существуют различные методы ремедиации нефтезагрязненной почвы, ведутся разработки наиболее экологичных методов, одним из которых является биологический, основанный на использовании микроорганизмов, а так же разрабатываются комплексные методы восстановления земель для достижения большего эффекта.

Описание структуры работы. Бакалаврская работа изложена на 56 стр. Включает главы: обзор литературы, материалы и методы исследования и результаты исследования. В работе 6 рисунков и 5 таблиц. Список использованных источников включает 57 работ.

Целью работы являлось определение эффективности комплексного метода ремедиации нефтезагрязненной почвы с использованием биопрепарата «Дестройл» и сорбента магнетита.

Для достижения данной цели перед нами были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве в условиях самоочищения, при использовании биологического метода и физико-биологического методов ремедиации;
2. Выделить доминирующие группы микроорганизмов в нефтезагрязненной почве;
3. Определить эффективность биологического (внесение биопрепарата «Дестройл») и физико-биологического (внесение биопрепарата «Дестройл» и сорбента магнетита) методов ремедиации по микробиологической активности почвы.

Материалы исследований. *Почвенные микроорганизмы.* Микроорганизмы почвы стали основным материалом нашего исследования. Нами были изучены различные группы микроорганизмов:

- азотфиксирующие микроорганизмы, симбиотирующие с высшими растениями, способны усваивать из воздуха свободный кислород и, в процессе своей жизнедеятельности, осуществлять восстановление молекулярного азота (N_2) до аммонийного ($-NH_2$), переводя его в доступную для растений форму;
- аммонифицирующие микроорганизмы – это микроорганизмы, способные использовать аминокислоты и белки для того, чтобы получить энергию. Минерализация этих соединений микроорганизмами почвы получила название — аммонификация.

- целлюлозоразлагающие микроорганизмы, продуцирующие комплекс гидролитических ферментов – целлюлаз. Они гидролизуют целлюлозу, являющуюся самым распространенным биополимером на Земле, и образуют растворимые органические соединения, которые в дальнейшем используются аэробными и анаэробными деструкторами;

- нитрифицирующие микроорганизмы необходимую для синтетических процессов энергию извлекают в ходе последовательного окисления неорганических соединений азота (нитрификации): $\text{NH}_3 \rightarrow \text{HNO}_2 \rightarrow \text{HNO}_3$. Нитрификаторы 1 порядка (*Nitrosomonas* sp.) окисляют аммиак до азотистой кислоты, образуя нитриты ($\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$). Нитрификаторы 2 порядка (*Nitrobacter* sp.) превращают азотистую кислоту в азотную и нитраты ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$).

- денитрифицирующие микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности они используют связанный кислород нитратов и нитритов, восстанавливая их последовательно до образования молекулярного азота: $\text{HNO}_3 \rightarrow \text{HNO}_2 \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$.

Помимо этих групп, также рассматривались плесневые грибы, органотрофы и фосфоорокисляющие бактерии.

«Дестройл» - порошок или паста, состоит из клеток углеводородокисляющих микроорганизмов, концентрация которых составляет более 100 млн. клеток в 1 гр. Биопрепарата [31].

Продуценты исследуемого биологического препарата – непатогенные нефтеокисляющие аэробные бактерии *Acinetobacter speivs* SN-2. Он применяется для разложения до экологически нейтральных соединений углеводов нефти прямой, разветвленной и циклической структур, включая бенз(а)пирен, смолы и асфальтены [50].

Грамотрицательные бактерии рода *Acinetobacter* — свободноживущие гетеротрофы, обнаруженные в почве, воде, сточных водах и пище. Некоторые представители *Acinetobacter* присутствуют в составе кожной микрофлоры человека. Их метаболическая универсальность означает, что *Acinetobacter* в

составе микробных сообществ может играть важную роль в биологическом разложении ряда веществ, загрязняющих окружающую среду, разлагая соединения, токсичные для большинства микроорганизмов. Некоторые представители рода способны выделять полимеры, которые эмульгируют углеводороды и нефть, делая эти субстраты доступными для разложения в водной среде. Отмершие клетки культуры-продуцента образуют нетоксичную биомассу, которая легко утилизируется создавая основу для формирования гумуса в почве [51].

Препарат работает в диапазоне температур от +10° до +42° С, сохраняя жизнеспособность клеток в почве. Оптимальные условия нефтеокисляющего действия препарата: температура 24±5°С, рН среды 6,0-8,0. При благоприятных погодных условиях через 20-30 дней нефть и нефтепродукты утилизируются на 60-90% [53].

Сорбент магнетит. В качестве сорбента-носителя нефтеокисляющего биопрепарата выбран комплексный адсорбент с магнитными свойствами. Он состоит из самораспадающегося шлака сталеплавильного производства и железорудного концентрата мокрого магнитного обогащения.

По химическому составу в шлаке преобладают CaO (45%) и SiO₂ (55%), что определяет их адсорбционную способность по отношению к нефтепродуктам, а присутствие оксидов железа способствуют проявлению магнитных свойств. В железорудном концентрате преобладающее содержание оксидов железа (Fe₂O + Fe₂O₃ = 94,6 %) свидетельствует о его высокой магнитной восприимчивости. Дисперсность компонентов составляла менее 100 мкм [54].

Методы исследования. Подготовка почвы.

Почва была предоставлена НИИ СХ «Юго-Восток». В лаборатории почву подвергали очистке от крупных частиц и просеивали через стерильное сито. Подготовленный материал поместили в 4 контейнера по 300 г в каждый. В контейнер №1 более ничего не вносили, это служило контролем.

Внесение нефти. В 3 контейнера (№2, №3, №4) с почвой произвели внесение нефти в количестве 30 г (10 %-е загрязнение), которую предоставил Институт химии СГУ им. Н. Г. Чернышевского.

Внесение биопрепарата «Дестройл». Биологический препарат «Дестройл» вносили в виде суспензии. Для её приготовления суспензии мы взяли 0,765 г «Дестройла», который растворили в 50 мл водопроводной воды. Суспензия, приготовленная из сухого препарата, подвергалась далее предварительной активации. Для этого обеспечивали ее аэрацию при комнатной температуре в течение суток. Эту суспензию внесли в контейнер №3 и №4.

Внесение в почву магнетита. Магнетит — природный комплексный адсорбент с магнитными свойствами. Предварительной подготовки для внесения в пробу не требовалось. Магнетит в количестве 3 г внесли в пробу №4 (НДМ).

Таким образом, мы заложили следующие 4 пробы:

№1 – Контроль (К) – исходная проба почвы, которая служит контролем;

№2 - Нефть (Н) – проба почвы, в которую внесли нефть. При нефтезагрязнении нами были созданы условия самоочищения почвы, т.е. очищение при помощи аборигенной микрофлоры;

№3 Нефть + «Дестройл» (НД) – проба почвы, в которую мы внесли нефть и биопрепарат «Дестройл» для изучения численности микроорганизмов при биологическом методе ремедиации;

№4 Нефть + «Дестройл» + магнетит (НДМ) – проба почвы, в которую мы внесли нефть, биопрепарат «Дестройл» и сорбент магнетит для изучения численности микроорганизмов при комплексном физико – биологическом методе очистки.

Выделение почвенных микроорганизмов для определения численности.

Для выделения почвенных микроорганизмов с последующей целью идентификации был применен метод последовательных разведений, метод глубинного посева на плотные питательные среды и метод посева в жидкую питательную среду.

Для посева почвенной суспензии использовались элективные питательные среды. Для выделения органотрофных микроорганизмов использовался ГРМ – агар, азотфиксирующих – среда Эшби, целлюлозоразлагающих – среда Хетчинсона – Клейтона, фосфооокисляющих – среда Пиковской, нитрифицирующих – среда Виноградского, плесневых грибов – ПДА. Для выделения денитрификаторов использовалась жидкая среда Березовой. Посев на питательные среды осуществлялся трехкратно: через сутки после загрязнения нефтью, через 2 и через 9 месяцев.

Изучение морфологических признаков микроорганизмов. Для изучения морфологических признаков микроорганизмов мы готовили фиксированные препараты. Их получение включало в себя приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску по Граму.

Изучение биохимических признаков микроорганизмов. Для более точного определения окраски по Граму был применен таяж с КОН. Подвижность определяли методом раздавленной капли. Сахаролитическая активность исследовалась на средах Гисса с добавлением: глюкозы, сахарозы, арабинозы, лактозы, маннита, мальтозы. Для исследования ферментативной активности относительно желатины использовали МПБ с добавлением 12% желатины.

Для определения температурного диапазона роста использовали среду ГРМ-агар, на которую по секторам засеивали культуры штрихом, и ставили в термостат на 43 °С, а так же в холодильник при 10 °С. Помимо этого мы изучали способность роста микроорганизмов на ГРМ-агаре с добавлением 7% NaCl.

Помимо этих тестов проводилось изучение восстановления нитратов на нитратном бульоне. Для выявления ацетоина был проведен тест Фогеса – Проскауэра.

Для обработки полученных данных и идентификации выделенных микроорганизмов использовался «Определитель Берджи».

Методы статистической обработки. Обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 10 RU. Для определения точности выборочной оценки среднего значения исследуемого показателя вычислялась ошибка среднего.

Результаты исследования. При исследовании микробиологической активности почвенных микроорганизмов спустя сутки после загрязнения нефтью, мы засеивали почвенную суспензию проб на селективные среды.

Подсчет результатов был осуществлен спустя 5 дней после высева проб почв на питательные среды. Для определения микробной обсемененности мы определяли показатель КМАФАнМ.

Исходя из полученных данных, мы выяснили, что в контрольной пробе почвы на селективных средах растут все группы изучаемых нами почвенных микроорганизмов – органотрофы $((16,0 \pm 2,3) \cdot 10^6$ КОЕ/мл), азотфиксаторы $((16,1 \pm 1,3) \cdot 10^6$ КОЕ/мл), фосфороокисляющие бактерии $((16,5 \pm 1,4) \cdot 10^6$ КОЕ/мл), целлюлозоразлагающиеся бактерии $((2,2 \pm 0,6) \cdot 10^6$ КОЕ/мл), нитрификаторы $((9,5 \pm 2,4) \cdot 10^6$ КОЕ/мл), плесневые грибы $((7,9 \pm 1,5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл) и денитрификаторы $((4,3 \pm 0,1) \cdot 10^6$ КОЕ/мл).

В пробах № 2-4 мы наблюдали рост только органотрофных и азотфиксирующих микроорганизмов, а так же плесневых грибов, рост остальных групп микроорганизмов не наблюдался. После внесения нефти (проба №2 (Н)) резко сократился диапазон бактерий, растущих на этой почве: удалось выделить только органотрофов $((2,6 \pm 0,4) \cdot 10^6$ КОЕ/мл), азотфиксаторов $((1,5 \pm 0,1) \cdot 10^6$ КОЕ/мл) и плесневые грибы $((0,25 \pm 0,05) \cdot 10^6$ КОЕ/мл).

В пробе №3 (НД), где мы применяли биологический метод ремедиации, количество органотрофных бактерий составило $(11,2 \pm 2,5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл,

азотфиксирующих - $(4,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл, плесневых грибов - $(7,5 \pm 0,3) \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

В пробе №4 (НДМ), где мы использовали комплексный физико – биологический метод ремедиации количество органотрофных бактерий составило $(20,0 \pm 1,3) \cdot 10^6$ КОЕ/мл, азотфиксирующих - $(3,7 \pm 0,7) \cdot 10^6$ КОЕ/мл, плесневых грибов - $(2,9 \pm 0,4) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Помимо уменьшения диапазона групп микроорганизмов, также наблюдается уменьшение численности выросших групп по сравнению с их количеством в контрольной пробе.

При исследовании микробиологической активности почвенных микроорганизмов спустя 2 месяца после загрязнения нефтью на селективных средах мы наблюдали рост только органотрофных микроорганизмов на ГРМ-агаре. Подсчет результатов проводился через 5 дней после посева.

В контрольной пробе почвы мы наблюдали наибольшую численность, она составила $(35,0 \pm 3,2) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В условиях самоочищения численность резко снизилась и составила $(3,6 \pm 0,1) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. При биологическом способе ремедиации численность составила $(16 \pm 1,9) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Наиболее эффективным оказался комплексный физико – биологический способ ремедиации, при его применении численность составила $(23,7 \pm 2,9) \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

При исследовании микробиологической активности почвенных микроорганизмов спустя 9 месяцев после загрязнения нефтью на селективных средах мы так же наблюдали рост только органотрофных микроорганизмов на ГРМ-агаре. Подсчет результатов проводился через 5 дней после посева.

Наибольшая численность микроорганизмов наблюдалась в контрольной пробе почвы и составила $(55,0 \pm 4,5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В условиях самоочищения мы увидели наименьшую численность, которая составила $(5,5 \pm 1,7) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В пробе, где применялся биологический метод очистки, численность составила $(16,7 \pm 3,2) \cdot 10^6$ КОЕ/мл. В пробе, где применялся комплексный физико – биологический метод, численность составила $(27,5 \pm 2,5) \cdot 10^6$ КОЕ/мл.

Для дальнейшей работы были отобраны доминирующие штаммы микроорганизмов из проб почвы, изучены их морфологические и биохимические признаки. Каждой выбранной культуре был присвоен свой лабораторный шифр, в котором первая буква обозначает пробу, из которой делали высеив; второе число – разведение, третья буква А означает аэробность; четвертое число – порядковый номер. Для дальнейших исследований было отобрано 11 штаммов: К6А1, К6А2, К10А3, Н6А4, Н6А5, Н9А6, НД6А7, НД9А8, НДМ6А9, НДМ6А10, НДМ10А11. Далее выделялись чистые культуры данных штаммов. Определение видов осуществлялось исходя из результатов биохимических тестов, описанных ранее, по «Определителю Берджи».

Таким образом, с каждой из 4-х проб нам удалось идентифицировать доминирующие культуры:

- с пробы №1 (К) удалось выявить *Caryophanon latum*, *Bacillus horikoshii*, *Kurthia gibsonii*;
- с пробы №2 (Н) - *Micrococcus luteus*, *Jonesia dentrificans*, *Bacillus halmapalus*;
- с пробы №3 (НД) - *Bacillus horikoshii*, *Brochothrix thermosphacta*;
- с пробы №4 (НДМ) - *Marinococcus halophitus*, *Bacillus halodurans*, *Aureobacterium liquefaciens*.

Выводы

Внесение нефти в почву на вторые сутки резко сокращает численность аммонификаторов, азотфиксаторов и плесневых грибов. Наиболее чувствительными оказались фосфороксиляющие, нитрифицирующие и целлюлозоразлагающие группы микроорганизмов.

1. Доминирующими штаммами в нефтезагрязненной почве являются: *Micrococcus luteus*, *Jonesia dentrificans*, *Bacillus halmapalus*, *Bacillus horikoshii*, *Bacillus halodurans*, *Brochothrix thermosphacta*, *Marinococcus halophitus*, *Aureobacterium liquefaciens*.

2. Установлено, что использование физико-биологического метода ремедиации (внесение биопрепарата «Дестройл» и сорбента магнетита)

увеличивает микробиологическую активность почвы, что отражается в увеличении численности органотрофных бактерий.