

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСНОГО СПОСОБА ОЧИСТКИ
ВОДОЁМОВ ОТ НЕФТИ С ПОМОЩЬЮ МИКРООРГАНИЗМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 422 группы
Направления подготовки бакалавриата
06.03.01 Биология
Биологического факультета
Лысовой Евгении Витальевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

О.Ю. Ксенофонтова

Зав. кафедрой:

профессор, док. биол. наук

С.А. Степанов

Саратов 2020

Введение. Одной из важнейших задач человечества является охрана водных ресурсов планеты от загрязнения нефтью и нефтепродуктами. На современном этапе развития нефть является основным загрязнителем внутренних водоемов. Несмотря на проводимые в последнее время работы по предупреждению и ликвидации последствий аварийных разливов нефти и нефтепродуктов, данная проблема остается актуальной. В целях снижения дальнейших негативных последствий требуется особое внимание к изучению способов локализации и ликвидации нефтяных загрязнений на водоёмах. Первые меры по ликвидации аварийных разливов нефти должны быть направлены на локализацию пятен вследствие дальнейшего распространения загрязнения новых участков и уменьшения площади загрязнения.

Но современные способы очистки не идеальны, не совсем экологичны и не полностью могут устранить загрязнения. А этот минус влечет за собой нарушение экологии, массовую гибель флоры и фауны водоемов, и прежде всего рыба с ее кормовыми объектами – планктоном и бентосом. То есть такие загрязнения приносят сильный экологический и экономический ущерб. А так как это не всегда решается обычными способами, то требуется другой более эффективный метод.

В настоящее время уделяется много внимания новым, высокоэффективным технологиям, которые базируются на применении бактериальных препаратов совместно с биосорбентами, объединяющих между собой достоинства комплексного метода ликвидации нефтяных загрязнений. Биодеструктивные сорбенты локализуют нефтяные загрязнения и разрушают адсорбированные нефтепродукты биологическим методом. При таком сочетании методов можно достичь весьма высокой эффективности очищения загрязнений при оптимальных условиях.

Применение сорбента совместно с бактериальным препаратом ускоряет деструкцию нефти в водоемах, уменьшает содержание нефтепродуктов во всех формах нахождения – в пленке, в воде, в донных отложениях, что соответствует современным взглядам на проблему по использованию

недорогих простых методов очистки сред от нефти, активизирующих природные процессы самоочищения.

Описание структуры работы. Бакалаврская работа изложена на 50 стр. Включает главы: обзор литературы, материалы и методы исследования, и, результаты и обсуждения. В работе 14 рисунков и 3 таблицы. Список использованных источников включает 44 работы.

Целью работы являлось изучение эффективности комплексного способа очистки водоёмов от нефти с помощью микроорганизмов.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить численность водных микроорганизмов в нефтезагрязнённой воде с помощью различных методов ремедиации;
2. Выделить и идентифицировать доминирующие штаммы микроорганизмов в нефтезагрязнённой воде;
3. Исследовать эффективность биологического и физико-химического методов ремедиации.

Материалы исследований. Исследования были проведены в 2019 году на кафедре микробиологии и физиологии Саратовского национального исследовательского государственного университета.

Материалом исследований служила *вода* из открытого водоёма (р. Волга) объёмом 1-2л. Отбор проводили 22 июня 2019 года. Пробы отбирали в стерильные стеклянные флаконы на глубине 10 см, ниже поверхности воды. Для отбора воды использовали одинаковые, стандартные, прозрачные, стерильные бутылки ёмкостью 1 литр. Перед отбором пробы бутылку несколько раз споласкивали речной водой. Воду в бутылку наливали под самое горлышко и закручивали пробку так, чтобы в бутылке не было пузырька воздуха. Каждую пробу подписывали, где указывали дату, время и место отбора. Пробу воды сразу доставляли в лабораторию для анализа.

Также в данной работе нами были изучены группы *водных микроорганизмов* (тионовые, фототрофные, нитрификаторы, железобактерии

и органотрофные микроорганизмы), которые послужили основным материалом исследований.

В работе использовали *биопрепарат «Дестройл»*, предоставленный Белгородским техническим университетом строительных материалов имени Шухова.

«Дестройл» – биологический препарат, представляющий собой порошок или пасту, состоящего из клеток микроорганизмов, которые обладают углеводородокисляющей активностью с концентрацией не менее 100000000 клеток в 1 грамме препарата, остатков питательной среды. Обладая высоко выраженной окисляющей активностью препарат способен переводит углеводороды нефти и нефтепродукты в экологически нейтральные соединения.

Продуценты исследуемого биологического препарата - нефтеокисляющие аэробные непатогенные бактерии *Acinetobacter speivs SN-2*. Применение данного препарата обуславливает разложения до экологически нейтральных соединений углеводов нефти прямой, разветвленной и циклической структур, включая бенз(а)пирен, смолы и асфальтены.

Acinetobacter speivs – свободноживущие аэробные грамотрицательные палочки, неспоровые, неподвижные, очень короткие и толстые.

В ходе исследований был использован *комплексный сорбент – магнетит* с магнитными свойствами для удаления углеводов из водных сред. 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 магнетите преобладающее содержание оксидов железа (Fe₂O + Fe₂O₃ = 94,6 %) свидетельствует о его высокой магнитной восприимчивости. Дисперсность компонентов составляла менее 100 мкм [42].

Методы исследования. *Подготовка проб воды для исследований.*

Исследуемую воду разливали в 4 стеклянных сосуда, объемом по 250 мл в каждый и моделировали различные приёмы ремедиации для каждого сосуда.

Первый сосуд содержал исходную воду и являлся контролем, во второй сосуд вносили нефть (условия самоочищения), в третий сосуд вносили нефть и биопрепарат «Дестройл» (биологический метод ремедиации), в четвертый сосуд вносили нефть, биопрепарат «Дестройл» и сорбент магнетит (физико-биологический метод ремедиации).

Внесение нефти. В 3 сосуд (№ 2, №3, №4) вносили по 30 г нефти, создавая 10%-ое нефтяное загрязнение. Данная концентрация нефти является максимальной для использования биологического метода ремедиации с применением препарата «Дестройла».

Внесение препарата «Дестройл». Биологический препарат «Дестройл» вносили в виде суспензии. Для внесения Дестройла готовили суспензию:

1) согласно инструкции, рекомендовано вносить 2,0 – 5,5 кг/га препарата на 1 га загрязненной территории. Мы решили использовать максимальное значение – 5,5 кг/га.

Рассчитывали площадь поверхности воды в ёмкости по формуле: $S=\pi R^2$, где $R=4$ см, получаем $S=3,14*4^2=50,24$ см². Затем, рассчитывали какое количество биопрепарата необходимо взять для нашего исследования: 5 кг расходуется на 1 га или 10 000 м², площадь поверхности воды в исследуемом сосуде равна 102 см²

Следовательно, делаем пропорцию:

$$5,5 \text{ кг} = 5\ 500 \text{ г используется на } 1\ 000\ 000 \text{ см}^2$$

$$5\ 500 \text{ г} - 50,24 \text{ см}^2$$

$$X \text{ г} - 1\ 000\ 000 \text{ см}^2$$

3) $5\ 500 \text{ г} * 50,24 \text{ см}^2 / 1\ 000\ 000 \text{ см}^2 = 276 \text{ г}$ должны внести суспензии.

Суспензия, приготовленная из сухого препарата, подвергалась далее предварительной активации. Для этого обеспечивали ее аэрацию при комнатной температуре в течение суток. Эту навеску, равную 276 г

«Дестройла» добавляли в сосуд №3 (биологический метод ремедиации) и в сосуд №4 (физико-биологический метод ремедиации).

Внесение сорбента – магнетита. В сосуд №4 внесли «Дестройл» согласно расчетам, описанным в главе 2.2.3 и магнетит в количестве 10 г на 250 мл воды (согласно рекомендациям производителя). Магнетит взвешивали на весах, полученную навеску наносили на поверхность нефтяной пленки не перемешивая, чтобы он адсорбировал нефть.

Таким образом, мы подготовили следующие пробы воды.

№1 (К) – исходная проба воды;

№2 (Н) – вода, загрязненная нефтью. При нефтезагрязнении нами были созданы условия для самоочищения воды.

№3 (НД) – в нефтезагрязненную воду мы внесли биопрепарат «Дестройл» (биологический метод ремедиации).

№4 (НДМ) – в нефтезагрязненную воду, в которую уже добавили биопрепарат «Дестройл», мы также добавили в качестве сорбента магнетит. В данной пробе мы сможем определить эффективность комплексного способа очистки воды от нефти.

Исследование микробиологической активности воды при использовании различных методов ремедиации. Микробиологическую активность воды учитывали путем подсчета численности основных групп микроорганизмов при использовании различных условий ремедиации. Для выделения микроорганизмов использовали метод последовательных разведений и глубинный метод.

Для высева исследуемых проб использовали селективные среды. Для выделения органотрофных организмов использовали ГРМ – агар, тионовые – Сильвермана, железобактерии – Лиске, фототрофные – Громова, нитрификаторы – Виноградского.

Изучение морфологических и биохимических признаков микроорганизмов. Для изучения морфологических признаков микроорганизмов мы готовили фиксированные препараты. Их получение

включало в себя приготовление мазка, высушивание, фиксацию и окраску по Граму.

Для более точного определения Грам^{+/-} бактерий был использован *метод тяжа с КОН*. Для определения подвижности был использован *метод раздавленной капли*. Сахаролитическую активность проверяли на средах Гисса с глюкозой, сахарозой, арабинозой, лактоза, манит, мальтоза.

Помимо этих тестов проводили изучение восстановления нитратов на нитратном бульоне и тест Фогест-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. Изучение численности основных групп водных микроорганизмов из различных проб воды (1 сутки) (лето 2019 года). На данном этапе проводили учет динамики численности из разных проб воды после их высева на различные питательные среды (среда Лиске, среда Сильвермана, среда Виноградского, ГРМ.)

В контрольной пробе воды на селективных средах удалось выделить все группы водных микроорганизмов – тионовые, нитрификаторы, железобактерии и фототрофные бактерии. Учет результатов проводили через 5 дней после высева проб воды на питательные среды.

Анализируя полученные данные, можно сделать вывод, что в контрольной пробе воды на селективных средах вырастают все группы микроорганизмов, ранее изученные нами – тионовые, нитрификаторы, железобактерии и фототрофные бактерии.

После загрязнения исследуемой воды нефтью наблюдается уменьшение численности микроорганизмов всех изученных групп, а также, снизились численные показатели органотрофных бактерий.

Помимо этого, были проведены микроскопические исследования в ходе которых было обнаружено, что наиболее часто встречаемые бактерии в пробах с нефтью биопрепаратом и магнетитом - это грамм положительные палочки со спорами в субтермальном положении.

Изучение численности водных микроорганизмов после 2 месяцев контакта воды с нефтью и различных приёмов ремедиации. При исследовании микробиологической активности 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.

Исходя из полученных данных, видно, что спустя два месяца в контрольной пробе воды численность органотрофов равна $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, во всех пробах, в которые вносили нефть, численность органотрофов несколько раз больше, чем в контрольной пробе. Также можно видеть увеличение численности микроорганизмов при использовании методов ремедиации: пробе только с нефтью средняя численность составила $3,1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, в пробе с биопрепаратом «Дестройл» численность оказалась больше – $6,2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, а в пробе, где применяли физико-химический метод ремедиации с тем же биопрепаратом и сорбентом магнетитом, численность равна $7,6 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

Отбор доминирующих штаммов по численности из каждой пробы. При выборе подходящей культуры ей было присвоено лабораторный шифр, в котором первая буква обозначала пробу ((К) – исходная проба воды; (Н) – вода, загрязненная нефтью; (НД) – нефтезагрязненная вода с биопрепаратом «Дестройл»; (НДМ) – нефтезагрязненная вода с биопрепаратом «Дестройл» и сорбентом магнетитом), из которой делали высев; второе число – порядковый номер, третья буква(ы) А/АН означало аэробность или анаэробность; четвертое число – разведение. Для последующих экспериментов отобрали 5 штаммов: НД₂А₉, НДМ₂А₁₀, НДМ₃А₉, НДМ₁А₆, НД₁А₆. Далее выделялись чистые культуры данных штаммов. Определение видов осуществлялось

исходя из результатов биохимических тестов, описанных ранее, по «Определителю Берджи».

Таким образом, в нефтезагрязненной воде через 9 месяцев выделяются бактерии родов: *Acinetobacter* (микроорганизмы «Дестройла» и штаммы рода: *Marinosoccus* и *Salinosoccus* из аборигенной микрофлоры воды.

Изучение динамики численности водных микроорганизмов после 9 месяцев контакта воды с нефтью, «Дестройлом» и магнетитом.

Высев проб воды осуществлялся на все селективные среды, представленной в таблице 1, для количественного подсчета микроорганизмов и определения микробной активности в каждой пробе воды. Окраска по Граму, микроскопирование и учет результатов проводили через 5 дней после культивирования посева. Результаты высева на селективных средах для выделения тионовых, фототрофных, железобактерий и нитрификаторов ничего не выросло.

Таким образом, можно сделать вывод, после девяти месяцев мы наблюдали, что во всех пробах, загрязненных нефтью численность водных микроорганизмов была меньше, чем в контрольной пробе. В контроле численность составила $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Мы увидели увеличение численности микроорганизмов при использовании методов ремедиации после загрязнения нефтью: в пробе только с нефтью средняя численность составила $6,8 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, в пробе с биопрепаратом «Дестройл» численность равна – $12,9 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, а в пробе, где мы применяли комплексный метод ремедиации численность составила $18,3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

Выводы

1. Внесение нефти в воду ингибировало размножение тионовых, фототрофных, железобактерий и нитрификаторов на 2 сутки. Численность органотрофов в нефтезагрязненной воде слабо отличалась от контрольных значений и составила $(1,4-1,7) \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

2. В нефтезагрязненной воде через 9 месяцев выделяются бактерии родов: *Acinetobacter* (микроорганизмы «Дестройла» и штаммы рода: *Marinococcus* и *Salinococcus* из аборигенной микрофлоры воды.

3. Установлено что применение биопрепарата «Дестройл» в сочетании с сорбентом магнетитом увеличивает численность органотрофных микроорганизмов устойчивых к нефтяному загрязнению по сравнению с другими и составила $18,3 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. В условиях самоочищения численность органотрофов соответствовала $6,8 \cdot 10^5$ КОЕ/мл, при использовании биологического метода – $12,9 \cdot 10^5$ КОЕ/мл.

