

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯ НА ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ
ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 4 курса 421 группы

Направления 06.03.01 Биология

Биологического факультета

Просвировой Юлии Александровны

Научный руководитель:
доцент, к.б.н

(подпись, дата)

Е. С. Тучина

Зав. кафедрой биохимии и биофизики.
д.б.н., профессор

(подпись, дата)

С.А. Степанов

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

Почва – структура, которая является основной физической средой, экономическим базисом, выступающим как предмет и орудие труда одновременно, на котором людьми возводят различного рода промышленные производства и используют под сельскохозяйственные угодья.

Понимая важность данного ресурса, проблема загрязнения почв нефтью становится все более актуальной и чаще обсуждаемой, ведь сеть промысловых трубопроводов значительно расширяется.

Угроза попадания нефти в почву актуальна для города Саратова, так как на территории области имеются нефтеперерабатывающие заводы - Саратовский НПЗ, «Саратоворгсинтез».

О влиянии нефтезагрязнения на почву типа Чернозем южный представлено много интересных научных работ, так как данный тип почвы достаточно широко распространен и имеет высокую ценность для сельскохозяйственного использования.

На территории нашего региона данный тип почвы также широко распространен. Именно поэтому вышеописанный и вызывает достаточно большой интерес к изучению свойств автохтонной микрофлоры при обычных условиях и аллохтонной при влиянии продуктов нефтезагрязнения.

Цель и задачи исследования. целью проделанной работы являлась оценка влияния нефти Уральская темная на основные группы микроорганизмов почвы типа Чернозем южный.

Для достижения данной цели перед нами были поставлены следующие задачи:

1. Изучить динамику численности основных групп почвенных микроорганизмов (гетеротрофных бактерий, актиномицетов, плесневых грибов, нитрифицирующих бактерий) при нефтезагрязнении.

2. Выявить доминирующие группы микроорганизмов в нефтезагрязненной почве.

3. Провести отбор штаммов гетеротрофных бактерий из нефтезагрязненной почвы с целью их идентификации и изучения деструктивной активности.

Структура бакалаврской работы:

Работа состоит из списка сокращений, введения, основной части, заключения, выводов и списка литературных источников. Литературный обзор написан с использованием 23 источников, в нем были освещены следующие аспекты: проблемы загрязнения почв нефтепродуктами, характеристика основных групп почвенных микроорганизмов, способность к деструкции нефти у различных представителей почвенной микрофлоры.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. В качестве основных объектов исследования были использованы:

- почва типа Чернозем южный, отобранная в лесополосе села Синенькие Красноармейского района.

- нефть типа Уральская темная, предоставленная Саратовским Государственным Техническим университетом имени Гагарина Ю.А.

Характеристика нефти: данный образец содержит в своем составе большое количество ароматических углеводородов, а также, в сравнении с другими видами нефтепродуктов, отличается высоким удельным весом, которого не теряет даже при увеличении глубины залегания.

Далее в разделах были описаны основные методы, использованные в работе: очистка почв в лабораторных условиях от крупных частиц, внесение в опытную пробу 10%-й концентрации нефти.

Для последующего выделения микроорганизмов были применены методы: последовательных разведений и поверхностных высевов на плотные питательные среды (временной диапазон высевов: 1-е, 10-е, 30-е, 60-е и 90-е сутки); далее следовало наблюдение за динамикой численности основных групп почвенных микроорганизмов в двух типах проб.

Следующий этап - отбор штаммов, наиболее устойчивых к

нефтезагрязнению, изучение их морфологических, культуральных и биохимических свойств с последующей идентификацией.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследования осуществлялось наблюдение за динамикой численности гетеротрофных бактерий.

Показано, что численность гетеротрофов в контрольных пробах с первых суток и до 90-х постепенно возрастает и выходит на плато. В контрольных пробах с отметки $7,3 \lg \text{КОЕ/г}$ численность последовательно с каждым высевом возрастала до уровня $8,6-8,7$ а впоследствии оставалась неизменной до окончания опыта. Показатель численности в опытных пробах достоверно отличался от контрольных проб на протяжении всего исследования. Рост численности до максимального значения $8,4 \lg \text{КОЕ/г}$ наблюдался в период до 30-х суток, а затем постепенно снизился в незначительной степени превышая показатели посева с 1-х суток - $7,4 \lg \text{КОЕ/г}$.

Анализируя полученные результаты при наблюдении за группой нитрифицирующих бактерий, можно сказать, что их численность постепенно увеличивалась в двух типах проб. Такое парадоксальное увеличение количества представителей, возможно, могло быть обусловлено содержанием определенных веществ в образце нефти или же с почвенными характеристиками.

В контрольных пробах численность нитрифицирующих бактерий при посевах до 60-х суток продолжает стремительно нарастать от $5,3 \lg \text{КОЕ/г}$ до $7,2 \lg \text{КОЕ/г}$ и далее остается неизменным. В опытных пробах также наблюдается тенденция последовательного нарастания количественных показателей от посева к посеву – с 1-х суток и уровня $5,3 \lg \text{КОЕ/г}$ возрастает до $6,9 \lg \text{КОЕ/г}$, далее лишь незначительно снижается к 90-м суткам, составляя $6,7 \lg \text{КОЕ/г}$.

При исследовании динамики численности плесневых грибов достоверных различий не было выявлено. Показано, что в контрольных пробах численность возрастает в период с 10-х суток от $4,5$ до $4,7 \lg \text{КОЕ/г}$, а затем показатель выходит на плато и составляет $4,6 \lg \text{КОЕ/г}$.

В опытных пробах, как в и контроле, наблюдается рост численности до уровня $4,3 \lg \text{КОЕ/г}$, который на протяжении отрезка времени с 60-х и до 90-х суток не изменяется.

По сравнению с группой плесневых грибов количественные показатели группы актиномицетов сильно незначительно варьируют на протяжении периода до 30-х суток только в опытных пробах. В контрольных пробах в то же время, достоверных различий в показателях не было выявлено.

Так численность в контрольных пробах на 10-е сутки составляла $6,1 \lg \text{КОЕ/г}$, далее следует незначительное повышение до максимального уровня к 90-м суткам $6,1 \lg \text{КОЕ/г}$.

В опытных пробах количество микроорганизмов постепенно возрастает от $4,6 \lg \text{КОЕ/г}$, достигает максимальной отметки в $6,1 \lg \text{КОЕ/г}$ и к 90-м суткам незначительно снижается.

Следующий этап - выделение и изучение, отобранных штаммов с высокой вероятностью выживания в условиях нефтезагрязнения. Всего было отобрано 14 штаммов.

Результаты изучения биохимических активностей представлены в таблице 3 и 4. На данных приведенных в таблицах видно, что выделенные штаммы в большинстве обладают каталазной активностью, оксидазную активность проявляют лишь немногие. У половины наблюдается способность к редукции нитратов, утилизации цитрата, но ни один из штаммов не способен к образованию ацетоина при ферментации глюкозы. Отсутствует проявление активности при образовании из пептона аммиака (NH_3) и сероводорода (H_2S). Большая часть обладают протеолитическими свойствами - способны к гидролизу крахмала и в гораздо меньшей степени гидролизуют желатину.

Также для идентификации использовались индикаторные тесты со средами Гисса, с помощью которых выявлялась способность микроорганизмов к образованию кислоты из различных углеводов (таблица 5, 6). По результатам, приведенным в таблицах можно сделать вывод, что сахаролитические свойства у выделенных штаммов хорошо выражены. В

большей степени полученные микроорганизмы способны использовать сахарозу и маннит. Для незначительной части более предпочтительным вариантом является глюкоза.

Наличие устойчивости штаммов к различным условиям среды проверялось культивированием их при критических показателях температуры (10°C и 43°C), различных рН среды (5, 10), концентрациях NaCl в среде 7 и 10%, и рост в анаэробных условиях (таблица 7,8).

По данным таблиц видно, что для выделенных микроорганизмов оптимальная температура культивирования 10 °С. Это может быть обусловлено тем, что для данной среды обитания эта температура является нормой. А при повышении температурного показателя до 43 °С, только 5 культур из 14 способны к росту.

Диапазон рН от 5 до 10 является допустимым для роста культур на плотных питательных средах. Только 1 штамм проявил низкую способность к росту при рН равной 10. Данные микроорганизмы можно считать галотолерантными, так как оптимальной концентрацией NaCl для их культивирования является 7 и 10%.

На завершительном этапе был определен видовой состав и встречаемость данных видов в разных типах проб. Также была изучена динамика численности каждого из идентифицированных видов. Наиболее высокие показатели численности были отмечены у видов *B. circulans*, *B. drentensis*, *B. psychrotolerans* и *P. putida*. В то же время самыми низкими показателями характеризовались виды *L. grayi*, *L. murrayi* и *P. rustigianii*.

Таблица 9 – Видовой состав и встречаемость отобранных штаммов в контрольной и опытной пробах

Виды	Lg КОЕ/г			
	1-е сутки		90-е сутки	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
<i>Acinetobacter</i>	6	7	6	5

<i>radioresistens</i>				
<i>Bacillus circulans</i>	7	7	9	8
<i>Bacillus drentensis</i>	6	7	8	9
<i>Bacillus psychrotolerans</i>	6	6	8	7
<i>Bacillus soli</i>	5	4	7	6
<i>Jonessia denitrificans</i>	4	5	5	4
<i>Kurthia sibirica</i>	4	4	4	3
<i>Listeria grayi</i>	3	4	4	4
<i>Listeria murrayi</i>	2	4	3	3
<i>Rothia kristinae</i>	3	4	5	6
<i>Providencia rustigianii</i>	4	3	4	4
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	6	6	6	7
<i>Pseudomonas putida</i>	7	6	9	8

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенной работы было установлено, что показатели численности основных групп почвенных микроорганизмов на протяжении всего опыта с 1-х до 90-х суток претерпевали отличные друг от друга изменения по количественным показателям.

У гетеротрофных бактерий резкого роста или снижения численности не наблюдалось, достигнув к 60-м суткам максимальной отметки, численность более не изменялась.

Также стоит отметить парадоксальный рост численности нитрифицирующих бактерий в опытных пробах. Пик численности пришелся на промежуток времени с 30-х по 60-е сутки.

Численность плесневых грибов и актиномицетов также достаточно сильно разнится в показателях. Количество представителей группы плесневых грибов постепенно увеличивается до 10-х суток и далее выходит на плато. У актиномицетов показатели незначительно изменяются на протяжении всего опыта, достигая пиковой отметки к 90-м суткам.

Из опытного образца в период исследования было выделено и

идентифицировано 14 штаммов гетеротрофных бактерий, принадлежащих к 8 родам и 13 видам. Большая часть выделенных бактерий относилась к роду *Bacillus*. Также преобладали два других рода - *Listeria* и *Pseudomonas*.

Выделили по одному представителю родов *Acinetobacter*, *Jonessia*, *Kurthia*, *Rothia* и *Providencia*.

По литературным данным бактерии вышеперечисленных родов обладают наиболее высокой устойчивостью к нефтезагрязнению могут быть использованы в качестве микроорганизмов-деструкторов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что на 30-е сутки после внесения нефти Уральской темной в концентрации 10% в почву типа Чернозем южный происходит увеличение числа КОЕ таких групп микроорганизмов как гетеротрофы (на 1.2 log КОЕ/г) и нитрификаторы (на 1.5 КОЕ/г).

2. Установлено, что доминирующими среди гетеротрофных бактерий, выживших условиях нефтезагрязнения, являются 3 рода бактерий - *Bacillus* (4 вида), *Listeria* (2 вида), *Pseudomonas* (2 вида); единичными видами были представлены: *Acinetobacter* (*A.radioresistens*), *Jonessia* (*J.denitrificans*), *Kurthia* (*K.sibirica*), *Rothia* (*R. kristinae*) и *Providencia* (*P.rustigianii*).

3. Выявлено, что в течение 90 суток в почве, загрязненной нефтью Уральская темная, сохраняется в значимых количествах (1-1,5 log КОЕ/г) представители таких видов как *B. circulans*, *B. drentensis*, *B. psychrotolerans* и *P. putida*.