

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

Кафедра микробиологии и физиологии растений

**ОЦЕНКА ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕФТИ НА ОСНОВНЫЕ
ГРУППЫ ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

Студентки 2 курса 241 группы

Направление подготовки магистратуры 06.04.01 Биология

Биологического факультета

Дементьевой Наталии Андреевны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук

А. М. Петерсон

Зав. кафедрой:

профессор, доктор биол. наук

С. А. Степанов

Саратов 2021

Введение

Актуальность темы. Нефть и нефтепродукты являются одними из самых распространенных веществ, загрязняющих окружающую среду. Нефть наносит непоправимый вред экосистемам, зачастую приводя к настоящим экологическим катастрофам.

Нефтяные углеводороды при попадании в почву вызывают в ней глубокие необратимые изменения физических, физико-химических и микробиологических свойств [1]. Подавляется рост полезных микроорганизмов основных физиологических групп, снижается активность окислительно-восстановительных и гидролитических ферментов, ухудшаются агрофизические, агрохимические свойства почвы, снижается обеспеченность почвы подвижными формами азота и фосфора. Наблюдается угнетение или деградация растительного покрова, снижается биоразнообразие [2].

В связи с этим, в настоящее время активно разрабатываются методы очистки нефтезагрязненных территорий.

Наиболее безопасными для окружающей среды и экономически выгодными являются биологические методы ремедиации почв, основанные на использовании потенциала микроорганизмов [3, 4]. В настоящее время развитие наиболее эффективных препаратов-нефтедеструкторов находятся в состоянии разработки. Анализ литературы показал, что изучение аборигенных бактерий – обитателей нефтезагрязненных почв, способных утилизировать углеводороды нефти, является необходимым для дальнейшего развития метода биоремедиации и создания бактериальных препаратов-нефтедеструкторов.

Проблема нефтезагрязнения актуальна и для Саратовской области. На нашей территории имеются нефтеперерабатывающие заводы, которые производят жидкое топливо и продукты нефтехимии (Саратовский НПЗ мощностью 10 млн т нефти в год, «Саратоворгсинтез»), нефтесклады, нефтепроводы и другие объекты. Саратовский НПЗ выпускает более 20 видов

продукции: неэтилированные бензины, дизельное топливо, мазут всех основных марок, битумы, вакуумный газойль, техническую серу и др. В области разведано более 40 малых нефтяных и газовых месторождений [5].

На территории нашего региона преобладают черноземные и каштановые почвы [6]. В большинстве исследований, посвящённых участию микроорганизмов в биоремедиации почв Саратовской области, использовались черноземы типичные или обыкновенные [7]. Объектом нашего исследования послужил чернозем южный, который на территории Саратовской области встречается в следующих районах: Северо-Восточном (Волго-Хвалынском), Центральном (Татищевском), Южном (Красноармейской), Заиргизском (Балаково-Ивантеевском). Он отличается по свойствам от чернозема типичного меньшим содержанием гумуса и слабой щелочной реакцией (рН 7,8) [8]. Поэтому можно предположить, что микробиологические процессы при нефтезагрязнении здесь будут иметь свои особенности.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение токсического воздействия нефти на основные группы почвенных микроорганизмов южного чернозема.

Для решения указанной цели были определены следующие задачи.

1. Определить динамику численности основных групп почвенных микроорганизмов (гетеротрофных бактерий, актиномицетов, плесневых грибов, нитрификаторов) в условиях нефтезагрязнения.

2. Выделить из нефтезагрязнённых образцов почв гетеротрофные бактерии, идентифицировать их, изучить их биологические свойства и адаптационные возможности, оценить перспективы их использования в качестве нефтеструкторов.

3. Дать оценку влияния микробиоты почвы типа чернозем южный на деградацию нефти.

Материал и методы исследования. Работа проводилась на базе кафедры микробиологии и физиологии растений Саратовского

национального исследовательского государственного университета имени Н. Г. Чернышевского, а также на базе кафедры экологии и техносферной безопасности Саратовского государственного технического университета имени Гагарина Ю. А. в период с 2019 г. по 2021 г.

Объектом исследования являлась почва типа чернозем южный, отобранная в окрестностях лесополосы села Синенькие Саратовского района Саратовской области.

Также объектом исследования послужила нефть Соколовогорская светлая (Волго-Уральский нефтяной бассейн), которая была предоставлена нам сотрудниками кафедры экологии и техносферной безопасности Саратовского государственного технического университета имени Ю. А. Гагарина.

Микробиологические исследования осуществляли стандартными методами, такими как: методы последовательных разведений и поверхностного посева на плотные питательные среды, изучение биологической активности выделенных штаммов, идентификация выделенных штаммов, статистическая обработка результатов, определение массовой доли нефтепродуктов с помощью ИК-спектрометрии [9, 10, 11, 12].

Структура и объем работы. Работа изложена на 61 странице, включает в себя сокращения, введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 10 рисунками и содержит 9 таблиц. Список использованных источников из 83 наименований.

Научная новизна. Впервые проведена оценка воздействия нефти на микробиоту южного чернозема Саратовской области и произведено комплексное изучение бактерий, выделенных из образца нефтезагрязненной почвы, которое открывает перспективы использования данных видов в качестве нефтеструктуров

Научная значимость. В настоящее время влияние нефти на почвенные микроорганизмы южного чернозема изучено крайне слабо. Поэтому полученные нами данные расширяют представления о влиянии

нефтезагрязнений на микробиоту разных типов почв. Выделен консорциум гетеротрофных бактерий, хорошо адаптированных к обитанию в условиях чернозёма южного и обладающий деструктивной активностью в отношении нефти.

Положения, выносимые на защиту.

1. При внесении в чернозём южный 1% нефти подавление почвенной микробиоты происходит только в первые сутки после загрязнения. К 10-м суткам численность всех исследованных групп восстанавливается. В последующие 6 месяцев численность гетеротрофных бактерий и плесневых грибов в нефтезагрязнённой почве превышает их численность в контрольной пробе.

2. Наиболее перспективными нефтеструкторами могут быть *Bacillus mojavensis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*,

3. В результате деятельности микробиоты почвы типа чернозём южный массовая концентрация нефтепродуктов в почве за 6 месяцев снижается на 43%.

Основное содержание работы

В главе «Основная часть» представлен анализ литературных данных о составе и физико-химических свойствах нефти, ее влиянии на свойства почв, технологии восстановления нефтезагрязненных территорий. Описан биологический метод рекультивации почв с помощью микроорганизмов-нефтеструкторов.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные о динамике численности основных групп почвенных микроорганизмов в условиях нефтезагрязнения, о видовом составе гетеротрофных бактерий, выживающих в условиях нефтезагрязнения и их биологических свойствах. Представлены данные о выживаемости бактерий при различных концентрациях нефтезагрязнения и их способности использовать нефтяные углеводороды в качестве единственного источника

углерода. Дана оценка влияния микробиоты почвы типа чернозем южный на деградацию нефти.

В ходе проведенных исследований, были получены следующие данные, отражающие динамику изменения основных групп почвенных микроорганизмов в нефтезагрязненной почве.

На 1-е сутки были выявлены более низкие показатели численности всех групп изучаемых микроорганизмов (гетеротрофные бактерии, плесневые грибы, актиномицеты, нитрифицирующие бактерии) в опытной пробе почвы по сравнению с контрольной.

На 10-е сутки выявленная тенденция сохранилась для большинства исследуемых групп почвенных микроорганизмов за исключением нитрифицирующих бактерий. Эта физиологическая группа по литературным данным является наиболее чувствительной к нефтезагрязнению. Однако в нашем эксперименте именно она первая сумела восстановиться после внесения в почву нефти, и уже через 10 суток численность нитрифицирующих бактерий в опытных и контрольных пробах не имела статистически достоверных различий.

На 30-е сутки микробиота нефтезагрязнённой почвы полностью восстановилась, а у некоторых групп (гетеротрофные и нитрифицирующие бактерии) количественные показатели в загрязнённой почве стали статистически достоверно превышать таковые в контрольных пробах.

На 60-е сутки также выявленная тенденция сохранилась: численность плесневых грибов и актиномицетов в опытных и контрольных пробах не имела статистически достоверных различий, а численность гетеротрофных и нитрифицирующих бактерий была выше в нефтезагрязнённых образцах.

На 180-е сутки большая часть исследуемых групп почвенных микроорганизмов не отличалась по численности в опытных и контрольных пробах. Только численность гетеротрофных бактерий в нефтезагрязнённых образцах по-прежнему существенно превышала таковую в контрольных пробах.

При сравнительном анализе динамики численности основных групп почвенных микроорганизмов в нефтезагрязнённых образцах чернозёма южного было установлено, что показатели численности гетеротрофных бактерий и плесневых грибов достигали максимума к 30-м суткам и держались на таком высоком уровне вплоть до окончания эксперимента. Пик численности актиномицетов и нитрифицирующих бактерий наблюдался в период с 30-х по 60-е сутки, после чего наблюдался спад их численности.

В ходе проведения экспериментов из нефтезагрязнённых почв типа чернозём южный было выделено 63 штамма гетеротрофных бактерий, которые в ходе проведённой идентификации были отнесены к 3 родам и 10 видам. Все выделенные изоляты принадлежали к филумам Actinobacteria, Firmicutes и Proteobacteria. Большая часть выделенных гетеротрофных бактерий принадлежала к роду *Bacillus*. Также было выделено по одному виду родов *Micrococcus* и *Serratia*.

При изучении биологических свойств выделенных из нефтезагрязнённых образцов почвы штаммов гетеротрофных бактерий видимый бактериальный рост на агаровых средах был виден на первые и вторые сутки культивирования при +28°C. В мазках обнаруживались крупные и мелкие грамположительные споровые палочки, грамотрицательные палочки, кокки. Во всех посевах преобладали грамположительные споровые палочки.

При изучении биохимической активности штаммов, выделенных из нефтезагрязнённой почвы, было выявлено, что все штаммы обладают каталазной активностью. Большинство выделенных микроорганизмов было способно к редукции нитратов. Тест Фогес-Проскауэра показал, что большинство штаммов было способно образовывать ацетон при ферментации глюкозы. Немногие микроорганизмы были способны к утилизации цитрата. Способность фиксировать азот не была выявлена ни у одного штамма. Сахаролитические свойства у выделенных штаммов хорошо выражены. У всех видов высокую ферментативную активность наблюдали

при использовании глюкозы, многие были способны использовать маннит (43 %). Меньше всего в качестве источника углерода использовались лактоза и сахароза (14 %). Некоторые изучаемые бактерии были способны использовать арабинозу (36 %) мальтозу (21 %) и сорбит (21 %). Лишь некоторые штаммы гидролизировали желатин (50 %) крахмал (21 %), т.е. обладали протеолитическими свойствами.

При изучении устойчивости выделенных микроорганизмов из опытного образца почвы к физико-химическим факторам были получены следующие результаты. Оптимальной температурой культивирования выделенных микроорганизмов являлась +28°C. При данной температуре все виды давали хороший рост уже через 24 часа. В условиях повышенной температуры +43°C лишь 29% штаммов проявляли способность к росту. При понижении температуры до +8°C только 14% культур были способны к росту. Факультативные анаэробы были представлены в меньшей степени (29%), чем облигатные аэробы (71%). pH 5 являлся допустимым для роста некоторых культур. Подавляющее большинство выделенных штаммов оказалось способным к росту на pH 9 и pH 10. Низкая концентрация NaCl в питательной среде (2 %) являлась оптимальной для культивирования выделенных штаммов. С повышением концентрации до 15 % наблюдается угнетение роста, следовательно, среди полученных видов бактерий нет галлофилов.

При изучении динамики численности каждого идентифицированного вида было выявлено, что наиболее стабильно в течение всего периода исследований из нефтезагрязнённых образцов изолировались виды *B. mojavensis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *Micrococcus luteus*. Причём количественные показатели присутствия этих видов в нефтезагрязнённых образцах в течение эксперимента существенно увеличивались: с 10^2 до 10^3 - 10^4 КОЕ/г, что говорит о способности этих видов успешно размножаться в условиях нефтезагрязнения. Наиболее высокие количественные показатели отмечались у видов *B. mojavensis* и *B. megaterium* (10^4).

Некоторые виды (*B. circulans*, *B. halmapalus*, *B. niacini*, *B. simplex*, *Serratia plymothica*) изолировались только в отдельные периоды исследования.

При изучении диапазона выживаемости выделенных бактерий при различных концентрациях нефтезагрязнения на плотной питательной среде МПА были получены следующие результаты. Способность выдерживать 5 и 10%-ную концентрацию нефти в среде наблюдалась у 8 видов: *B. halmapalus*, *B. mojavensis*, *B. coagulans*, *B. niacini*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*, *Serratia plymothica*. При низкой концентрации нефти у этих видов видимый рост наблюдался уже через 24 часа культивирования. Способность к росту при 15%-ной концентрации загрязнителя в среде наблюдался у 4 видов: *B. coagulans*, *B. niacini*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*.

Согласно полученным результатам, при 5%-ной концентрации нефти в среде, ее способны использовать в качестве единственного источника пищевого субстрата 5 видов бактерий: *B. mojavensis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*. При увеличении концентрации нефти, вплоть до 15%, способность к ее использованию сохранил только вид *Micrococcus luteus*.

Таким образом, если нефтезагрязнение составляет не более 5% от массы почвы, то наиболее перспективными нефтедеструкторами могут быть *B. mojavensis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*. При увеличении содержания нефти в почве успешную деструкцию нефти может осуществлять только *Micrococcus luteus*.

Исходная концентрация нефти в опытном образце почвы составляла $1430 \pm 3,58$ мг/кг почвы. На 1, 10, 30, 60 и 180 сутки культивирования была рассчитана концентрация нефти в почве и построена диаграмма, отражающая динамику снижения её концентрации. Исходя из полученных данных, был сделан вывод, что концентрация нефтепродуктов в опытном образце почвы за 180 суток культивирования уменьшилась на 43%.

Выводы

1. В первые сутки после внесения в образцы чернозёма южного 1% нефти наблюдалось подавление роста гетеротрофных и нитрифицирующих бактерий, актиномицетов и плесневых грибов. К 10-м суткам численность всех исследованных групп восстанавливалась. Показатели численности гетеротрофных бактерий и плесневых грибов достигали максимума к 30-м суткам и держались на таком высоком уровне вплоть до окончания эксперимента (180 суток). Пик численности актиномицетов и нитрифицирующих бактерий наблюдался в период с 30-х по 60-е сутки, после чего их количество снижалось.

2. Среди гетеротрофных бактерий, выживающих в условиях нефтезагрязнения, преобладали бактерии рода *Bacillus* (8 видов), единичными видами были представлены роды *Micrococcus* (*Micrococcus luteus*) и *Serratia* (*Serratia plymothica*).

3. Наиболее перспективными нефтедеструкторами могут быть *Bacillus mojavensis*, *B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *Micrococcus luteus*, которые увеличивали свою численность в нефтезагрязнённой почве с 10^2 до 10^3 - 10^4 КОЕ/г, были способны выдерживать высокие концентрации нефти в среде (10-15% от массы), а при концентрации нефти в среде 5% успешно использовали её в качестве единственного источника углерода. При увеличении содержания нефти в среде до 10-15% успешную деструкцию нефтепродуктов осуществлял только *Micrococcus luteus*.

4. В результате деятельности микробиоты чернозёма южного концентрация внесённых нефтепродуктов за 180 суток уменьшилась на 43%.

Список использованных источников

1. Исакова, Е. А. Особенности воздействия нефти и нефтепродуктов на почвенную биоту / Е. А. Исакова // Colloquium-journal. – 2019. – № 12. – С. 7-10.
2. Шамраев, А. В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А. В. Шамраев, Т. С. Шорина // Вестник ОГУ. – 2009. – № 6. – С.642-645.
3. Зиннатшина, Л. В. Экологическая оценка влияния натуральных сорбентов на эффективность биоремедиации нефтезагрязненной серой лесной почвы: автореф. дис. на соискание ученой степени канд. биол. наук / Л. В. Зиннатшина.- Пушино, 2019. – 24 с.
4. Сопрунова, О. Б. Перспективные технологии биоремедиации нефтезагрязненных, объектов аридных территорий / О. Б. Сопрунова // Известия Самарского научного центра. - 2011. – Т 13, № 5. – С. 191-193.
5. Титов, В. Н. Анализ негативного воздействия нефтеперерабатывающей промышленности на природные комплексы в условиях Саратовской области / В. Н. Титов, Н. В. Медведева // Вестник Саратовского государственного социально-экономического университета. – 2014. – С. 108-110.
6. Болдырев, В. А. Полевые исследования морфологических признаков почв: учебное пособие / В. А. Болдырев, В. В. Пискунов. - Саратов: Изд-во Саратовского национального исследовательского государственного университета, 2006. – 55 с.
7. Меркулова, М. Ю. Анализ почв антропогенно нарушенных городских территорий по микробиологическим и биохимическим показателям (на примере г. Саратова) / М. Ю. Меркулова, О. В. Абросимова. - Модели, системы, сети в экономике, технике, природе и обществе. – 2013.– С. 226-229. Это журнал или сборник?
8. Степина, Е. В. Эколого-генетические аспекты гумусообразования

черноземов западного правобережья Саратовской области / Е. В. Степина, Е. Б. Смирнова, А. И. Золотухин // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3. – С. 309-312.

9. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в минеральных, органогенных, органо-минеральных почвах и донных отложениях методом ИК-спектromетрии. - М.:ФБУ ФЦАО, 2005. - 18 с.

10. Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Подготовка проб, исходной суспензии и десятикратных разведений для микробиологических исследований: ГОСТ Р ИСО 68872 – 2013. - Москва: Стандартиформ, 2014. - 4 с.

11. Лабинская, А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А. С. Лабинская. - Москва: Медицина, 2004. - С. 56–59.

12. Теппер, Е. З. Практикум по микробиологии / Е. З. Теппер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверезева. - М.: Колос, 1993. - 175 с.