

**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 ДИЗЕЛЬНОГО  
ТОПЛИВА НА ОСНОВНЫЕ ГРУППЫ ПОЧВЕННЫХ  
МИКРООРГАНИЗМОВ**

**АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ**

Студентки 2 курса 241 группы  
направления подготовки магистратуры 06.04.01 – Биология  
Биологического факультета  
Филиппова Ильи Дмитриевича

Научный руководитель

к.б.н., доцент

\_\_\_\_\_

А. М. Петерсон

Заведующий кафедрой

д.б.н., профессор

\_\_\_\_\_

С. А. Степанов

## Введение

**Актуальность темы.** Дизельное топливо является сложной смесью парафиновых (10-40%), нафтеновых (20-60%) и ароматических (14-30%) углеводородов и их производных [1] и активно используется как в России, так и за рубежом. В Саратовской области дизельное топливо производится на Саратовском нефтеперерабатывающем заводе. Отсюда дизельное топливо транспортируется либо речным транспортом, либо железнодорожным или автомобильным транспортом в специальных цистернах. Поэтому вопрос воздействия на почвенную микробиоту дизельного топлива для нашего региона особенно актуален.

Нефть и нефтепродукты, при попадании в почву вызывают в ней глубокие необратимые изменения: подавляется рост полезных микроорганизмов, наблюдается деградация почвы. Естественное самоочищение природных объектов от нефтяного загрязнения – длительный процесс, Поэтому перспективным направлением исследования является возможность разработки биопрепаратов и использование их для очистки нефтезагрязненных территорий. Такой метод очистки почв наиболее безопасен для окружающей среды и экономически выгоден [2].

Деструктивная активность почвенной микрофлоры по отношению к загрязнению дизельным топливом уже неоднократно изучалась. Было показано, что эффективность биодеструкции во многом зависит от типа почвы. В работах, проведённых ранее, изучалась деструкция дизельного топлива в дерново-подзолистых [3], дерново-карбонатных, серых лесных почвах [4].

В связи с этим, целью работы являлось изучение токсического воздействия дизельного топлива на основные группы почвенных микроорганизмов в условиях южного чернозема. Для решения указанной цели были поставлены и решены следующие задачи:

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

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

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

**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 настоящего исследования послужили чистая почва типа чернозем южный, которая была собрана в окрестностях лесополосы села Синенькие, Саратовского района, Саратовской области.

Дизельное топливо было получено от изготовителя ПАО «Саратовский НПЗ», Российская Федерация, г. Саратов.

Проводили выделение основных групп почвенных микроорганизмов: гетеротрофных бактерий, актиномицетов, плесневых грибов и нитрифицирующих бактерий. Высевы делались в определенные сроки: на 1-е, 10-е, 30-е и 120-е сутки с момента внесения дизельного топлива в почву. Из опытных и контрольных проб почвы высевы проводились на специальные селективные среды. После чего проводили изучение динамики численности основных групп почвенных микроорганизмов.

Были изучены биологических свойств выделенных гетеротрофных бактерий и проведена их идентификация.

Культуральные свойства изучали на ГРМ-агаре по стандартным методикам [5]. Отмечали размер, форму колоний, цвет, характер поверхности и др.

При изучении морфологических свойств использовали микроскоп Биолам с общим увеличением 1350 раз. Определяли форму клеток, их взаимное расположение, отношение к окраске по Граму, подвижность, наличие спор [6].

Для изучения сахаролитических свойств применяли среды Гисса с добавлением глюкозы, сахарозы, арабинозы, лактозы, мальтозы, сорбита и маннита. Проводили тесты на каталазную и оксидазную активность. Использование цитрата выявляли на среде Симмонса. Гидролиз желатины выявляли посевом уколом в мясо-пептонную желатину (МПЖ). Способность к гидролизу крахмала выявляли с помощью посева на среду с крахмалом (МПА + 1% крахмала). Способность к фиксации молекулярного азота определяли посевом на безазотистую среду Эшби [7].

Определяли чувствительность бактерий к различным абиотическим факторам. Диапазон температурной устойчивости определяли культивированием при +10, +28, +43оС [8]. Устойчивость к хлориду натрия определяли культивированием на ГРМ-агаре с добавлением 2, 5, 7, 10 и 15% NaCl. Определяли кислототолерантность культивированием на ГРМ-агаре при значениях рН 5, рН 9 и рН 10.

Идентификация проводилась по определителю бактерий Берджи путем анализа фенотипических признаков [9].

Были изучены Методы измерения массовой доли нефтепродуктов в образцах почвы. Измерения в образцах почвы проводили по стандартной методике с помощью ИК-спектрометрии [10].

**Структура и объём работы.** Работа изложена на 47 страницах, включает в себя введение, 3 главы, заключение, выводы, список использованных источников. Работа проиллюстрирована 6 таблицами и 10 рисунками. Список использованных источников включает 61 наименование.

**Научная новизна.** Впервые изучена микробная деструкция дизельного топлива в условиях чернозёма южного. Выявлены гетеротрофные бактерии, хорошо адаптированные к условиям обитания в этом типе почв и способные использовать компоненты дизельного топлива в качестве единственного источника углерода.

**Научная значимость.** Проведенное комплексное изучение бактерий, выделенных из образцов нефтезагрязненной почвы, открывает перспективы для дальнейшего использования данных видов в качестве нефтеструкторов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. При попадании дизельного топлива в чернозём южный (1% от массы почвы) численность основных групп почвенных микроорганизмов восстанавливается к 30-м суткам, после чего количество гетеротрофных бактерий и грибов в загрязнённой почве начинает увеличиваться по сравнению с контролем.

2. Гетеротрофные бактерии, выделенные из загрязнённых образцов чернозёма южного, способны использовать компоненты дизельного топлива в качестве единственного источника углерода.

#### **Основное содержание работы**

В главе «Обзор литературы» представлен анализ литературных данных об основных характеристиках дизельного топлива и уровнях загрязненности пораженных территорий, рассмотрены современные методы очистки, проведен обзор самих бактерий-нефтеструкторов и создаваемых на их основе биопрепаратов, а также рассмотрены особенности биodeградации дизельного топлива.

В главе «Результаты исследования» изложены экспериментально полученные данные об динамике численности основных групп почвенных микроорганизмов в условиях загрязнения дизельным топливом и выделен видовой состав гетеротрофных бактерий, выживающих в условиях загрязнения.

При сравнительном анализе динамики численности основных групп почвенных микроорганизмов в загрязнённых образцах чернозёма южного на 1-е, 10-е, 30-е и 120-е сутки было установлено, что показатели численности гетеротрофных бактерий достигали максимума к 30-м суткам и держались на таком высоком уровне вплоть до окончания эксперимента. Плесневые грибы планомерно увеличивали свою численность вплоть до 120-х суток. Численность актиномицетов и нитрифицирующих бактерий в почвах, загрязнённых дизельным топливом, не имела статистически значимых различий в разные периоды исследования

В ходе исследования было выделено 48 штаммов гетеротрофных бактерий, которые были отнесены к 4 родам и 5 видам (*Bacillus simplex*, *Bacillus pseudomycooides*, *Kurthia zopfii*, *Rothia kristinae* и *Microbacterium lacticum*).

Для начала были рассмотрены биологические свойства бактерий, выделенных из загрязнённых образцов почв. Все гетеротрофные бактерии проявляли видимый бактериальный рост на агаровых средах уже на первые и вторые сутки культивирования при +28°C. В мазках наблюдали крупные и мелкие грамположительные споровые палочки, грамотрицательные палочки, кокки.

При изучении биохимической активности штаммов, выделенных из почвы загрязнённой дизельным топливом, было выявлено, что все штаммы обладали каталазной активностью.

Большинство выделенных микроорганизмов были способны к редукции нитратов.

Немногие микроорганизмы способны к утилизации цитрата.

У большинства штаммов способность фиксировать азот проявлялась слабовыражено.

Сахаролитические свойства у выделенных штаммов хорошо выражены. У всех видов наблюдалась высокая ферментативная активность при использовании глюкозы, не способны использовать маннит и арабинозу.

Меньше всего в качестве источника углерода использовали лактозу (14%) и сахарозу (20 %). Многие изучаемые бактерии способны использовать мальтозу (55 %) и сорбит (50 %).

Большинство штаммов хорошо гидролизуют желатин (50 %) крахмал (90 %).

При изучении устойчивости выделенных микроорганизмов из опытного образца почвы к физико-химическим факторам были получены следующие результаты. Оптимальной температурой культивирования выделенных микроорганизмов является +28°C. При данной температуре все виды давали хороший рост уже через 24 часа. В условиях повышенной температуры +43°C 40% штаммов проявляли способность к росту. При понижении температуры до +10°C только 20% культур были способны к размножению.

Факультативные анаэробы были представлены в меньшей степени (40%), чем облигатные аэробы (60%).

pH 5 являлся допустимым для роста некоторых культур. Подавляющее большинство выделенных штаммов оказалось способным к росту на pH 9 (90%) и pH 10 (86%).

Низкая концентрация NaCl в питательной среде (2 %) является оптимальной для культивирования выделенных штаммов. С повышением концентрации до 15 % наблюдается угнетение роста, следовательно, среди полученных видов бактерий нет галлофилов.

Далее была прослежена динамика численности каждого идентифицированного вида. По результатам можно сказать, что видовой состав гетеротрофных бактерий, выживающих в условиях загрязнения, остаётся относительно стабильным с 1 по 120 сутки после внесения дизельного топлива, изменяется лишь количественное содержание отдельных видов.

На следующем этапе исследования изучали выживаемость бактерий при различных концентрациях дизельного топлива в среде и их способность

использовать компоненты дизельного топлива в качестве единственного источника углерода. По результатам исследования способность выдерживать различную концентрацию дизельного топлива в среде наблюдалась у всех 5 видов, а их способность использовать дизельное топливо в качестве единственного источника углерода изучалась на безуглеродной среде М9. Согласно полученным результатам, при любой концентрации топлива в среде, ее способны использовать в качестве единственного источника пищевого субстрата все 5 видов бактерий: *Bacillus simplex*, *Bacillus pseudomycooides*, *Kurthia zopfii*, *Rothia kristinae* и *Microbacterium lacticum*.

На последнем этапе мы определяли оценка влияния микробиоты почвы типа чернозем южный на деградацию дизельного топлива.

Исходя из полученных данных, был сделан вывод, что концентрация нефтепродуктов в опытном образце почвы за 120 суток культивирования уменьшилась на 30%.

### **Выводы**

1. В первые сутки после внесения в образцы чернозёма южного 1% дизельного топлива, наблюдалось подавление роста гетеротрофных и нитрифицирующих бактерий, актиномицетов и плесневых грибов. К 30-м суткам численность всех исследованных групп восстановилась. Гетеротрофные бактерии и плесневые грибы планомерно увеличивали свою численность вплоть до 120-х суток. Численность актиномицетов и нитрифицирующих бактерий в почвах, загрязнённых дизельным топливом, не имела статистически значимых различий в разные периоды исследования.

2. Гетеротрофные бактерии, выживающие в условиях загрязнения дизельным топливом, были представлены родами *Bacillus* (*B. simplex*, *B. pseudomycooides*), *Rothia* (*R. kristinae*), *Kurthia* (*K. zopfii*) и *Microbacterium* (*M. lacticum*).

3. Перспективными нефтедеструкторами могут быть все выделенные гетеротрофные бактерии: *Bacillus simplex*, *B. pseudomycooides*,

*Microbacterium lacticum*, *Rothia kristinae* и *Kurthia zopfii*. которые были способны выдерживать концентрации дизельного топлива в среде от 1 до 10%, а также успешно использовали его в качестве единственного источника углерода.

4. В результате деятельности микробиоты чернозёма южного концентрация дизельного топлива в почве за 120 суток уменьшилась на 30%.

### **Список использованных источников**

1. Бойко, Е.В. Химия нефти и топлив. Учебное пособие. / Е.В. Бойко. – Ульяновск, 2007. – 60 с.
2. Гилязов, М.Ю. Естественная деградация нефти в черноземах лесостепи Закамья Татарстана / М.Ю. Гилязов, И.А.Гайсин, Л.Г. Шамсиева // Достижения науки – сельскохозяйственному производству. – Казань, 2002. – С. 89–90.
3. Углерод микробной биомассы и микробное продуцирование двуокси углерода дерново-подзолистыми почвами постагрогенных биогеоценозов и коренных ельков Южной тайги (Костромская область) / Н.Д. Ананьева [и др.] // Почвоведение. – 2009. – №9. – С. 1108–1116.
4. Состав микробных сообществ при различном содержании нефтепродуктов в серых лесных почвах / Т.В. Кузнецова [и др.] // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т.19, №14. – С. 165–168.
5. Garrity, G. M. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. / G. M. Garrity, J. A. Bell, T. G. Lilburn. – USA: Springer, 2004. – 399 p.
6. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, И. Крига, П. Синта, Д. Стейми: в 2 Т. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.
7. Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, И. Крига, П. Синта, Д. Стейми: в 2 Т. – М.: Мир, 1997. – Т. 2. – 368 с.

8. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.- USA, Springer, 2001, Vol. 3. - 1450 p.

9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. - USA, Springer, 2007, Vol. 2. - 1136 p.

10. 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-спектрометрии. – М.: ФБУ ФЦАО, 2005. – 18 с.