

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова
«__» _____ 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

ВЛИЯНИЕ СОРБЕНТОВ СЕРИИ «УНИСОРБ» НА
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ И
НЕ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

Руководитель	_____	д.б.н., профессор	С. В. Прудникова
	подпись, дата	должность, ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____		А.П. Андрущенко
	подпись, дата		инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «ВЛИЯНИЕ СОРБЕНТОВ СЕРИИ «УНИСОРБ» НА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ И НЕ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ» представлена в объеме 42 страниц, включает в себя 3 таблицы, 9 иллюстраций, а также список использованной литературы, состоящий из 31 источника, 6 из которых на иностранных языках.

Ключевые слова: БИОРЕМЕДИАЦИЯ, НЕФТЯНОЕ ЗАГРЯЗНЕНИЕ, БИОДЕГРАДАЦИЯ, НЕФТЬ И НЕФТЕПРОДУКТЫ, СОРБЕНТЫ СЕРИИ «УНИСОРБ»

Цель: оценка микробиологических показателей почвы при проведении очистки от нефтезагрязнений с помощью сорбентов

Задачи: 1) определить численность микроорганизмов (бактерий и микромицетов) в почве, загрязненной нефтью, и свободной от загрязнения при внесении сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био», 2) определить ферментативную активность нефтезагрязненной и не загрязненной почвы при внесении сорбентов, 3) выделить из нефтезагрязненной почвы микроорганизмы, устойчивые к загрязнению нефтепродуктами, и провести их идентификацию.

Актуальность выбранной темы обусловлена тем, что нефть является одним из основных загрязнителей окружающей среды, в связи с чем существует необходимость применения новых методов восстановления загрязненных почв и вод, одним из которых является применение полимерных сорбентов.

Основные выводы и результаты исследования:

1. Исследование микрофлоры образцов почвы, загрязненной нефтью, показало, что концентрации нефти 12 вес.% и 16 вес.% стимулировали рост общей численности бактерий в 1,1-1,5 раз по сравнению с не загрязненной почвой, в то же время, общая численность микромицетов в почве, загрязненной нефтью, достоверно не изменялась.

2. В почвах с добавлением сорбента Унисорб-Био численность бактерий и микромицетов была выше по сравнению с добавлением сорбента Унисорб.

3. Инвертазная активность почвы снижалась под действием загрязнителя во всех вариантах опыта, независимо от типа сорбента. На изменения уреазной активности повлияли оба фактора – и загрязнение почвы нефтью и тип внесенного сорбента, однако четких закономерностей по годам исследования не выявлено.

4. Было выделено и идентифицировано 12 видов бактерий, устойчивых к нефтяному загрязнению

Работа выполнена в рамках хоздоговора НИЧ СФУ № 31222 от 02.03.2020 г. «Определение показателей биodeградации сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био» в чистых и нефтезагрязненных почвогрунтах»

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Характеристика нефти и вредное воздействие нефтепродуктов на почву и живые организмы.....	7
1.2 Методы борьбы с нефтяными загрязнениями	8
1.3 Биоремедиация и роль микроорганизмов в очищении почвы от нефтепродуктов.....	11
1.4 Свойства и функции биопрепаратов.....	12
1.5 Углекислородфиксирующие микроорганизмы	14
2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	16
2.1 Объекты исследования	16
2.2 Схема эксперимента	16
2.3 Метод определения общей численности микроорганизмов	17
2.4 Выделение и идентификация бактерий	18
2.5 Определение уреазной активности почвы	19
2.7 Определение инвертазной активности почвы	20
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	22
3.1 Влияние сорбентов на численность микроорганизмов	22
3.2 Влияние сорбентов на ферментативную активность почвы	24
3.3 Идентификация микроорганизмов, доминирующих в нефтезагрязненной почве.....	27
3.4 Характеристика видов бактерий, устойчивых к нефтяному загрязнению	29
ВЫВОДЫ.....	38
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	39

ВВЕДЕНИЕ

Для многих стран мира нефтедобыча является приоритетным направлением в экономике государства. Нефть – это один из основных загрязнителей природы. Если пренебрегать мерами безопасности и правилами добычи, переработки и хранения нефти, то это наносит огромный ущерб состоянию окружающей среды. На сегодняшний день, территории, где производится добыча нефти, особенно подвержены этому загрязнению. В результате такого загрязнения, критически видны нарушения во флоре, фауне и микробиоте экосистем [1].

Скорость антропогенного загрязнения может превышать скорости процесса «самоочищения» внутри экосистемы, именно поэтому необходимо принимать меры для восстановления окружающей среды и предотвращения глобального антропогенного загрязнения.

На данный момент, разработаны различные методы восстановления окружающей среды в местах добычи и местах аварийного разлива нефти. Эти методы имеют как свои преимущества, так и недостатки: дороговизна ремедиационной технологии, большое количество времени на восстановление и недостаточная очистка от нефтяных загрязнений [2].

Биоремедиация является одним наиболее безопасным и эффективным методом очистки загрязненных почв и вод углеводородами нефтепродуктов. Биоремедиация – это один из современных методов, благодаря которому, можно очистить почву, грунт и воду от органических отходов и загрязнений углеводородами [3]. Одной из разновидностей этого метода является выделение активных штаммов микроорганизмов-деструкторов, способных к эффективной переработке нефти, и создание на их основе микробных препаратов, которые внедряют в загрязненную экосистему. Для различных систематических групп микроорганизмов характерна способность усваивать углеводороды нефти. Наибольшую активность при разложении нефти способны проявлять бактерии-деструкторы. Они используют опасные и

вредные соединения в качестве источника энергии для жизнедеятельности. Микроорганизмы перерабатывают загрязняющие вещества в продукты собственного метаболизма — углекислый газ, воду и минеральные соли, которые безопасны для окружающей среды [4].

Для повышения эффективности биоремедиации и создания благоприятных условий для работы микроорганизмов-деструкторов, при нефтяных разливах и авариях используют сорбенты, которые поглощают избыток нефти на поверхности почвы и воды и содействуют ее лучшему окислению бактериальными штаммами.

Поскольку микроорганизмы играют важную роль в биодegradации нефтяных загрязнений, целью данной работы являлась оценка микробиологических показателей почвы при проведении очистки от нефтезагрязнений с помощью сорбентов. В задачи исследования входило:

1. Определить численность микроорганизмов (бактерий и микромицетов) в почве, загрязненной нефтью, и свободной от загрязнения при внесении сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био».
2. Определить ферментативную активность нефтезагрязненной и не загрязненной почвы при внесении сорбентов.
3. Выделить из нефтезагрязненной почвы микроорганизмы, устойчивые к загрязнению нефтепродуктами, и провести их идентификацию.

Работа выполнена в рамках хоздоговора НИЧ СФУ № 31222 от 02.03.2020 г. «Определение показателей биодegradации сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био» в чистых и нефтезагрязненных почвогрунтах»

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика нефти и вредное воздействие нефтепродуктов на почву и живые организмы

Нефть – это сложная смесь органических соединений, таких как: алканы, циклоалканы, азотистые, сернистые и кислородные соединения, а также ароматические углеводороды различной молекулярной массы. На экосистему воздействие нефти и нефтепродуктов определяется совокупностью содержащихся в них компонентов. В процентном соотношении, если говорить об характерных загрязняющих веществах, образующихся в процессе добычи нефти и нефтепродуктов, то это: углеводороды (48 %), оксид углерода (32 %), твёрдые вещества (20 %). Также, высокотоксичной считается сырая нефть, которая являются смесью различных органических соединений. Отработанные нефтепродукты представляют собой токсичные отходы, которые состоят из различных сочетаний определенных углеводородов, входящих в их состав. В частности, олефинов, аренов (ароматических углеводородов), соединений серы, азота и кислорода [1].

Большую опасность на окружающую среду оказывает воздействие нефтяной промышленности. Негативное влияние распространяется по всей планете, затрагивая водную, воздушную, почвенную среду и, следовательно, все живые организмы. Существуют огромные риски загрязнения нефтепродуктами окружающую среду, на всех этапах добычи нефти, начиная от исследовательской деятельности, заканчивая переработкой полученных материалов. Так, например, большинство предприятий размещают свои промышленные зоны вблизи водоемов, так как при их эксплуатации требуется большое количество воды. В случае несоблюдения мер безопасности или чрезвычайных происшествий, это может привести к загрязнению этого источника. [5]

Также, существуют различные другие негативные воздействия:

1. Усиление парникового эффекта.
2. Появление кислотных дождей.
3. Загрязнение грунтовых вод.
4. Образование значительных объёмов отходов.
5. Снижение качества воды.
6. Потеря биоразнообразия.

При эксплуатации скважин зачастую используются поверхностно-активные вещества, концентрированные растворы различных кислот, что тоже непосредственно наносит вред окружающей среде. На территориях с сопутствующими токсическими веществами от нефтепромыслов, почвы, поверхностные и подземные воды превращают плодородные земли в экологически критические экосистемы, так как загрязняются нефтью и нефтепродуктами. Если говорить про загрязнённый углеводородами грунт, то он отличается своей маслянистостью. Это делает его невозможным в использовании для сельскохозяйственных целей. [2]

1.2 Методы борьбы с нефтяными загрязнениями

Одной из серьезных проблем окружающей среды является очистка почв, воды, загрязненных углеводородами нефти. В мире, для утилизации нефтяных отходов, существует множество различных методов:

- механические методы утилизации,
- биохимическое разложение,
- физико-химические способы,
- термические методики,
- комбинированные способы, где сочетаются несколько методик. [3]

Первоначально для того, чтобы выбрать оптимальный метод очистки участка от нефти и нефтепродуктов определяется характер загрязнения, тип загрязненной среды (почва, грунт), уровень и глубина загрязнения.

Нефтяные загрязнения в зависимости от глубины проникновения разделяются на:

- поверхностные загрязнения (глубина до 5 см),
- подповерхностные загрязнения (глубина проникновения до 30 см),
- глубинные загрязнения (до 1 м),
- а также, загрязнения с проникновением нефти и нефтепродуктов до уровня грунтовых вод (глубина от 1 до 5 м и более).

В зависимости от глубины проникновения загрязнений используют различные методы борьбы с опасными веществами. До 1 м используют методы с нагнетанием или откачкой воды и воздуха через скважины. При глубине 0,3–1 м в почвы и грунта применяются механические методы. Суть механических методов состоит в том, что почвы и грунты, загрязненные нефтью и нефтепродуктами, извлекают при помощи землеройной техники, либо вручную. [6]

Сорбция является одним из наиболее эффективных и доступных методов быстрого сбора нефти. Она происходит за счет сорбентов, которые при контакте с нефтью образуют агломераты в процессе сорбции [7].

С помощью сорбентов с любой поверхности можно осуществлять сбор и удаление нефти и нефтепродуктов. Это происходит несколькими способами:

1. С помощью нанесенного на рабочую поверхность специальных валков сорбирующего материала
2. С помощью нанесения формованных или дисперсных сорбентов методом простого расстилания

В настоящее время можно использовать более двух с половиной сотен сорбентов для ликвидации разливов нефти. [8]

Одним из определяющих подходом к очистке почв от нефти является создание оптимальных условий для жизнедеятельности нефтеразлагающих бактерий, путём внесения полимерных сорбентов. В одном из исследований было доказано, что полимерный сорбент «Унисорб-БИО» не вызывает

негативных последствий. Применение сорбента улучшает динамику снижения нефти и нефтепродуктов в нефтяном шламе, это производится путем добавления его в смеси с удобрениями и биодеструкторами. [3]

Сорбент «Унисорб-БИО» — это сорбент искусственного происхождения, состоящий из мезопористого, полимерного материала с открытой, ячеистой структурой и удельной поверхностью. Сорбент «Унисорб-БИО» был получен путем иммобилизации ассоциированных нефтеокисляющих микроорганизмов и адаптированных биокультур на полимерный носитель пороаминопласт. При использовании данного сорбента восстанавливается активность микроорганизмов и снижается уровень нефтяного загрязнения. Благодаря сорбенту «Унисорб-БИО» осуществляется сбор и биоразложение нефтепродуктов в природе (в воде, в почве, в грунте). Разлагает нефтепродукты благодаря биопрепарату в структуре сорбента и разлагается сам, поэтому не требует сбора и утилизации. [9]

Также, одним из сорбентов, который часто используют в исследованиях, является «Унисорб-Ф». Он представляет собой вспененный карбамид, быстро производит сорбцию агрессивных соединений. В составе содержит наполнитель – шелуху ореха фундук, включения до 15% мелко помолотых частиц размером 0,1 мм. Также существенно ослабляет негативные последствия нефтепродуктов. [9]

Сорбент «УНИСОРБ» — это композиционный материал. В его основе активные, тонкодисперсные, резиновые порошки с высокоразвитой поверхностью. Благодаря данному сорбенту осуществляется сбор с поверхности воды и почвы сырой нефти и жидких нефтепродуктов. Набухание и адсорбция нефти и нефтепродуктов, это одно из отличительных особенностей сорбента. Чем больше молекулярная масса углеводородов, тем выше степень извлечения. Нетоксичный и непатогенный сорбирующий материал. [10]

1.3 Биоремедиация и роль микроорганизмов в очищении почвы от нефтепродуктов

Использование микроорганизмов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов является одной из наиболее перспективных работ повышения эффективности борьбы с опасными загрязнениями. Так как использование микроорганизмов не вызывает нарушения структуры и функций почв, в отличие от механических и физико-химических способов очистки [11].

Биоремедиация – это один из современных методов очищения различных уровней окружающей среды (очищение почвы, грунта и воды) от вредных, органических углеводородных загрязнений и отходов. В его основу входит добавление в загрязненную экосистему живых и активных микроорганизмов-деструкторов. [3]

В настоящее время, чтобы очистить почву и воду от нефти и нефтепродукты, активно применяют биологические препараты, включающие в себя микроорганизмы, ферменты и поверхностно-активные вещества. Состав биопрепаратов подбирается специально, чтобы улучшить и повысить процесс естественного разложения органических загрязнений.

Препараты для биоремедиации содержат живые бактерии, которые в качестве источника жизнедеятельности используют нефтепродукты (загрязняющие вещества), и перерабатывая их, получают безопасные продукты для окружающей среды. Ферменты бактерий и биосурфактанты существенно облегчают усвоение загрязняющего вещества, так как они являются катализаторами и ускоряют биологический процесс переработки нефтепродуктов. [4]

Фиторемедиация – это один из методов биоремедиации. Он включает в себя использование растений и микроорганизмов. Данный метода основан на взаимовыгодном симбиозе между растениями и бактериями (деструкторами), которые перерабатывают нефть. Под влиянием кислорода и органических

веществ, продуцируемых и выделяемых растениями, улучшается эффективность процесса бактериальной деструкции [12].

Влияние микроорганизмов в процессе фиторемедиации разделяют на:

1. Прямое, когда в процессе деструкции загрязнителей бактериями опасные соединения перерабатываются и после усваиваются растениями
2. Косвенное, когда, благодаря микроорганизмам, понижается чувствительность растений к загрязнению

Метод биоремедиации является эффективным методом очистки почв, грунта и поверхностных вод, а также подпочву и грунтовые воды. [10]

Преимуществом метода биоремедиации является:

1. Целенаправленное применение.
2. Высокая скорость усвоения.
3. Переработка вредных загрязнителей на безопасные продукты жизнедеятельности бактерий.
4. Экологическая безопасность.

Различными исследованиями было установлено положительное влияние микробно-растительных комплексов на очистку окружающей среды от полициклических ароматических углеводородов, синтетических поверхностно активных веществ, нефти, хлорорганических, нитроароматических и фосфорорганических соединений, а также от других ксенобиотиков [13].

1.4 Свойства и функции биопрепаратов

Биологические препараты включают в свой состав объединение бактерий-нефтедеструкторов. Микроорганизмы могут окислять большое количество разнообразных углеводородов нефти и нефтепродуктов, начиная от длинноцепочечных алканов и заканчивая полиароматическими соединениями.

Важнейшими свойствами биологических препаратов являются:

1. Комплекс мер по удалению парафиновых отложений скважин, технических резервуаров.
2. Очистка сточных вод промышленной территории, где происходит добыча и переработка нефти.
3. Восстановление работы самоочищения почвы и водоемов.
4. Очистки окружающей среды от вредных загрязнителей промышленных и автотехнических предприятий.
5. Очистки почвы, грунта сточных и глубинных вод от нефти и нефтепродуктов.

В настоящее время проводятся исследования по использованию биопрепаратов для очистки нефтяных загрязнений. По их данным было установлено, что при разработке биопрепаратов желательно использовать не один штамм микроорганизмов, а несколько штаммов бактерий-нефтедеструкторов. Нефть считается сложным компонентом, поэтому для полной очистки нужно использовать несколько организмов, которые обладают всеми нужными ферментами, для полной переработки большого количества вредных химических соединений нефти. Доказывается, что при биодegradации, используя комплекс нескольких штаммов бактерий-деструкторов, можно добиться полной деструкции нефти. [14]

Для разработки биологических препаратов, выбираются следующие штаммы, которые соответствуют определенным критериям:

1. Высокой активностью окисления нефти и нефтепродуктов
2. Непатогенностью для живых организмов
3. Устойчивостью к солям тяжелых металлов
4. Условиями обитания в аэробной и факультативно-анаэробной среде
5. Нетоксичностью выбранных штаммов для окружающей среды

Также, в биопрепаратах клетки бактерий обязаны обладать высокой жизнеустойчивостью, чтобы при утилизации нефтепродуктов быть способными к росту, в различных условиях окружающей среды (в различном диапазоне температуры, рН среды, влажности, нехватки различных питательных элементов). [15]

Оптимальные условия работы биопрепаратов: это рН от 5 до 9, температура от 10 до 40 °С. При температуре ниже 10 °С рост бактерий замедляется, вплоть до его полного прекращения [2].

1.5 Углевородоксиляющие микроорганизмы

Использование микроорганизмов для очистки окружающей среды от нефти и нефтепродуктов является одной из наиболее перспективных работ повышения эффективности борьбы с опасными загрязнениями. Очень важно знать, какие виды организмов можно использовать для эффективной биоремедиации.

Таксономический состав водных углевородоксиляющих микроорганизмов очень обширен и разнообразен, описано 14 родов грибов и 28 родов бактерий. В составе микрофлоры чаще всего встречаются: *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Frankia*, *Nocardiopsis*, *Brevibacterium*, *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Pseudonocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, дрожжи родов *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporom*, мицелиальные грибы родов *Aspergillus*, *Penicillum*, *Gunninghamella*, *Cladosporum*. [14]

Таксономический состав почвенных микроорганизмов-деструкторов представлен, в основном, бактериями и грибами. Описано 22 рода бактерий, 19 родов дрожжей и 24 рода микроскопических мицелиальных грибов. Обитателями почв являются виды родов: *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium*, *Brevibacterium*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Achromobacter*, *Micrococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacterium*, *Beierinckia*, *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Xanthomonas* и др. [16]

В биоценозах от природы нефти и нефтепродуктов зависит состав доминирующих родов микроорганизмов. Доминирующими углеводородокисляющими микроорганизмами в загрязненных экосистемах являются:

1. Представители рода *Rhodococcus*
2. Представители рода *Pseudomonas*
3. Представители рода *Acinetobacter*
4. Представители рода *Arthrobacter*.

Остальные рода микроорганизмов деструкторов занимают второстепенное положение. [17,18]

2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования являлась микрофлора образцов почвы, загрязненной нефтью, и не загрязненной почвы при внесении сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био». Сорбенты были предоставлены «ООО НПФ Экосорб». Эксперимент проводили в условиях мелкоделяночного опыта в течение двух вегетационных сезонов 2019 и 2020 гг. на опытном участке в микрорайоне Ветлужанка г. Красноярска. Анализировали общую численность бактерий и микромицетов, а также ферментативную активность почвы – уреазную и инвертазную.

Из почв, загрязненных нефтью, были выделены в чистую культуру доминирующие виды бактерий и проведена их идентификация.

2.2 Схема эксперимента

На опытном участке были выделены 4 пробные площадки размером 60×60×20 см (рис. 1). На двух площадках почву смешивали с нефтью, а другие две площадки оставляли чистыми. В чистую почву и загрязненную нефтью был внесен один из типов сорбента – «Унисорб» или «Унисорб-Био».

В натурном эксперименте 2019 г. концентрация нефти в почве составляла 12 вес. %, эксперимент длился с 12 мая по 4 октября; в 2020 г. концентрация нефти в почве составляла 16 вес. %, эксперимент длился с 13 июня по 15 октября. В конце вегетационного периода (август, октябрь) проводили отбор образцов почвы для определения микробиологических показателей (табл. 1). Готовили смешанный образец почвы: на каждой делянке проводили отбор почвы с 5 точек (методом конверта) из верхнего слоя почвы 0-5 см и тщательно их перемешивали.



Рисунок 1 – Расположение пробных площадок: справа – чистая почва, слева – загрязненная нефтью

Таблица 1 – Сроки отбора почвенных образцов в натурном эксперименте

Год	Дата начала эксперимента	Даты отбора	Срок экспозиции, сутки
2019	12 мая	07 августа	87
		4 октября	152
2020	13 июня	26 августа	73
		15 октября	123

2.3 Метод определения общей численности микроорганизмов

Для определения общей численности микроорганизмов использовали общепринятые методы почвенной микробиологии. Использовался метод высева микроорганизмов на плотные питательные среды. Общую численность определяли на мясопептонном агаре (Nutrient agar, HiMedia), для выделения микромицетов использовали среду Сабуро (Sabouraud agar, HiMedia). Для этого заранее были подготовлены стерильная питательная среда, посуда и образцы почвы для исследования. В конические колбы со 100 мл воды вносили 1 г образцов почвы. Затем производили десятикратные разведения почвенных

суспензий от 10^2 до 10^7 . Посев суспензии производили поверхностным способом. Перед посевом разлили питательную среду в стерильные чашки Петри по 20-25 мл в каждую. Чашки оставили на горизонтальной поверхности в стерильных условиях для застывания среды. В чашки Петри со стерильной застывшей средой, вносили по 0,1 мл образца соответствующего разведения. Стеклянным шпателем распределяли его по поверхности. Каждое разведение делали в трёх параллельных посевах. После посева чашки помещали в термостат с температурой $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ для бактерий и $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ для микромицетов. Подсчёт колоний производили на 7 день культивирования. Численность микроорганизмов (N) в исходной почве определяли по формуле (1):

$$N = \frac{\bar{X} \times 10^n}{m \times V} \quad (1)$$

где \bar{X} – среднее количество колоний на чашке при посеве из соответствующего разведения;

10^n – степень разведения почвенного образца;

m – масса почвенного образца, взятого для приготовления разведений (г);

V – объем суспензии, внесенной в чашку Петри (мл).

2.4 Выделение и идентификация бактерий

Для получения чистых культур микроорганизмов были приготовлены пробирки со скошенным питательным агаром. При посеве из разведений образцов нефтезагрязненной почвы на чашки Петри с МПА были получены изолированные колонии. Были отобраны доминирующие колонии из наиболее часто встречающихся морфотипов. Из таких колоний, захватив петлей каплю материала, зигзагообразными движениями был нанесен материал на скошенный агар. Посев производился в 2 параллельных посева. Каждый раз брали изолированную колонию стерильной петлей. После выдержки в течение

7 суток в термостате при 30 °С производили проверку чистоты культуры методом истощающего посева.

Для получения чистых культур микроорганизмов использовали метод истощающего посева. При этом для каждого образца было подготовлено по 1 пробирке со стерильной водой и 5-6 чашек Петри с МПА. В пробирку вносили одну петлю исследуемого образца, перемешивали. Суспензию из пробирки петлёй вносили в чашку, после этого стерильным шпателем равномерно распределяли по площади чашки. Не обжигая и не стерилизуя шпатель, провели те же манипуляции с остальными чашками. Чашки инкубировали в термостате в течение 7 суток при температуре 30 °С крышками вниз. Чистые культуры вырастали как однотипные колонии без постороннего роста. При микроскопировании все клетки в препарате были одного морфотипа. Изолированные колонии пересеивали на скошенный агар для последующей идентификации.

Идентификацию выделенных культур микроорганизмов проводили методом МАЛДИ времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI TOF MS) на масс-спектрометре Microflex («BrukerDaltonics», Германия) в клинко-диагностической лаборатории КГБУЗ «Красноярский краевой клинический центр охраны материнства и детства».

2.5 Определение уреазной активности почвы

Фермент уреазы является одним из важных почвенных ферментов, характеризующих азотный метаболизм и определяющих плодородие почвы. Уреаза гидролизует мочевины до аммиака углекислого газа. Аммиак в свою очередь служит источником азотного питания для высших растений. Для исследования уреазной активности использовали метод Т. А. Щербаковой [19]. Суть метода состоит в том, что при гидролизе мочевины, образуется аммиак, путем связывания его в окрашенные комплексы с реактивом Несслера, который в последствии измеряется.

В колбу емкостью 100 мл с притертой пробкой вносили 5 г воздушно-сухой почвы, приливали 20 мл 2% раствора мочевины в фосфатном буфере (рН 6,7) и 200 мкл толуола. Закрытую плотно колбу помещали в термостат на 4 часа при температуре 37 °С. Далее охлаждали содержимое колб до комнатной температуры после экспозиции. В охлажденную колбу приливали 1 мл 50 % раствора трихлоруксусной кислоты. Всё тщательно перемешивали и для прекращения ферментативной реакции выдерживали 5 минут. После приливали 50 мл раствора хлористого калия (рН 5,6-6,0), чтобы вытеснить из почвы поглощенный аммиак. Образец встряхивали 3 мин и отфильтровывали. В мерную колбу на 50 мл помещали фильтрат объемом 2 мл далее приливали 30 мл дистиллированной воды и добавляли 2 мл 50 % раствора сегнетовой соли и тщательно перемешивали. После добавляли 2 мл реактива Несслера и тщательно перемешивали, добавляли дистиллированную воду и доводили до метки, затем снова тщательно перемешивали. Через 15 мин, колориметрировали в кювете 10 мм окрашенный раствор на фотоколориметре, со светофильтром синего цвета, при длине волны 400 нм. Ставили контроли с реактивами с почвой без субстрата и без почвы. После экспозиции в оба контроля также добавляли трихлоруксусную кислоту. По стандартной кривой рассчитывалось содержание аммиака в фильтрате. При дальнейших расчетах вычитали из оптической плотности опытных растворов, сумму оптических плотностей обоих контролей: это раствор мочевины без почвы и почву в буферном растворе. Уреазную активность выражали в миллиграммах N-NH₄ за 4 часа на 1 г почвы.

2.7 Определение инвертазной активности почвы

Инвертаза является гидролитическим ферментом. Она определяет мобилизацию легкогидролизуемого углевода сахарозы, расщепляет ее на эквимольные количества глюкозы и фруктозы [19]. Обнаруживают инвертазу

во всех почвах. Инвертаза характеризует биологическую активность почвы, содержание гумуса и плодородие.

Методом Гоффмана и Паллауфа определяли инвертазную активность, измеряя количество редуцирующих гексоз (глюкозы и фруктозы), которые образуются при гидролизе сахарозы. [20]

В колбу помещали 5 г почвы, добавляли 5 мл ацетатного буфера (рН 5,5) и 5 мл 20 % раствора сахарозы. После содержимое колбы тщательно перемешивали. Полученный раствор инкубировали 180 минут при температуре 37 °С в термостате. Далее в колбу добавляли 40 мл дистиллированной воды (температурой 38-40°С). Содержимое колбы хорошо перемешивали и проводили фильтрацию через плотный складчатый фильтр. В мерную колбу на 50 мл добавляли 10 мл фильтрата и 4 мл медного реактива, для того чтобы определить количество восстанавливающих сахаров. На водяной бане кипятили раствор 25 минут. После кипячения быстро охлаждали (водопроводной водой). Далее последовательно вносили раствор двухзамещенного фосфорнокислого натрия (2 мл 0,2М) и 5 мл 2,5 % раствора молибденово-кислого аммония. После колбу тщательно перемешивали до полного улетучивания углекислого газа. Оставляли на 60 минут реакцию смесь для проявления окраски. После проявления окраски доводили до метки. Готовые образец в кювете на 1 см колориметрировали при 620 нм. Находили количество инвертированных сахаров по эталонной кривой, составленной из равных смесей глюкозы и фруктозы. Активность инвертазы выражали в мг глюкозы на 1 г почвы.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изъято 16 страниц

ВЫВОДЫ

1. Исследование микрофлоры образцов почвы, загрязненной нефтью, показало, что концентрации нефти 12 вес.% и 16 вес.% стимулировали рост общей численности бактерий в 1,1-1,5 раз по сравнению с не загрязненной почвой, в то же время, общая численность микромицетов в почве, загрязненной нефтью, достоверно не изменялась.

2. В почвах с добавлением сорбента Унисорб-Био численность бактерий и микромицетов была выше по сравнению с добавлением сорбента Унисорб.

3. Инвертазная активность почвы снижалась под действием загрязнителя во всех вариантах опыта, независимо от типа сорбента. На изменения уреазной активности повлияли оба фактора – и загрязнение почвы нефтью и тип внесенного сорбента, однако четких закономерностей по годам исследования не выявлено.

4. Было выделено и идентифицировано 12 видов бактерий, устойчивых к нефтяному загрязнению:

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Никонов А.Н., Потапова С.О. Нефтяная промышленность, как один из серьезных загрязнителей окружающей среды // Пожарная безопасность: проблема и перспективы. – 2018. – С. 667-672.
2. Мокеева А.В., Алексеев А.Ю., Емельянова Е.К. и др. Ассоциация штаммов бактерий-нефтедеструкторов для ремедиации нефтезагрязненных территорий // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2011. – Т. 9. – Вып. 3. – С. 27-33.
3. Ересько Т.В., Митриковский А.Я., Морозова Е.В. Влияние полимерного сорбента «унисорб-био» и других изучаемых компонентов на динамику изменения содержания нефтепродуктов и в нефтяном шламе// Тюменский индустриальный университет. – 2019. – С. 240-243.
4. Корольченко Д.А. Современные биоремедиационные технологии // Пожаровзрывобезопасность. – 2007. – №5. – С. 75-78.
5. Куликова, И. Ю. Микробиологические способы ликвидации последствий аварийных разливов нефти в море / И. Ю. Куликова, И. С. Держинская // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2008. – Вып. 5. – С. 24–29.
6. Сопрунова, О. Б. Способы очистки почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами, применяя микробные биотехнологии // Молодой ученый. – 2015. – № 7 (87). – С. 240-242.
7. Дегтярев В.А., Лакина Т.А. Сорбирующий материал для сбора нефти и нефтепродуктов, способ его получения. Патент РФ No2166362.
8. Аренс В.Ж., Гридин О.М., Яншин А.Л. Нефтяные загрязнения: как решить проблему // Экология и промышленность России. – 1999. – №9. – С. 33–36.
9. Алексеева А.А. Фомин А.Н. Каталитическая активность нефтезагрязненного почвогрунта после применения сорбента «Унисорб-био» // Молодая нефть – 2016. – С. 278-281.

10. Собгайд Н.А. Сорбционные материалы для очистки сточных и природных вод от нефтепродуктов // Вестник ХНАДУ. – 2011. – Вып. 5. – С. 120-124.
11. Han G., Cui B. X., Zhang X.X., Li K. R. The effects of petroleum-contaminated soil on photosynthesis of *Amorpha fruticosa* seedlings // International Journal of Environmental Science and Technology. – 2016. – V. 13. – P. 2383-2392.
12. Kamath R., Rentz J.A., Schnoor J.L., Alvarez P.J.J. Phytoremediation of hydrocarboncontaminated soils: principles and applications // Studies in Surface Science and Catalysis. – 2004. – V. 151. – P. 447-478.
13. Назаров А. В., Иларионов С. А. Потенциал использования микробно-растительного взаимодействия для биоремедиации // Биотехнология. – 2005. – № 5. – С. 54.
14. Bartha R., Atlas R.M. The microbiology of aquatic oil spills // Advances in Applied Microbiology. – 1977. – P. 225–266.
15. Стабникова Е.В., Селезнева М.В., Рева О.Н., Иванов В.Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводов для очистки нефтезагрязненных почв // Прикладная биохимия и микробиология. – 1995. – Т. 31, – № 5. – С. 534–539.
16. Atlas R.M. Microbial hydrocarbon degradation – bioremediation of oil spills // J. Chem. Technol. Biotechnol. – 1991. – P. 149–156.
17. Гоголева О.А., Немцева Н.В. Углерододокисляющие микроорганизмы природных экосистем // Бюллетень Оренбургского научного центра. УрО РАН. – 2012. – № 2. – С. 1–7.
18. Коронелли Т.В. Принципы и методы интенсификации биологического разрушения углеводов в окружающей среде (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 1996. – Т. 32, № 6. – С. 579–585.
19. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии / Ф.Х. Хазиев. – Москва: Наука. – 2005. – 252 с.

20. Алимова Ф. К. Методы определения гидролаз почв и почвенных микроорганизмов: Учебно-методическое пособие / Ф.К. Алимова, Р.И. Тухбатова, Д.И. Газетдинова. – Казань: Казанский университет, 2010. – 67 с.
21. Новосёлова Е. И. Ферментативная активность почв в условиях нефтяного загрязнения и её биодиагностическое значение / Е. И. Новосёлова, Н.А. Киреева //Теоретическая и прикладная экология. – 2009. – № 2. – С. 4-12.
22. Швакова Э. В. Использование показателей ферментативной активности почв в почвенно-экологическом мониторинге / Э.В Швакова. //Потенциал современной науки. – 2015. – №. 4. – С. 62-66.
23. Каримуллин Л. К. Биохимическая активность дерново-подзолистых почв в условиях нефтяного загрязнения / Л. К. Каримуллин, А.М. Петров, А.А. Вершинин //Устойчивое развитие регионов: опыт, проблемы, перспективы. – Казань, 2017. – С. 296-300.
24. Исмаилов Н.М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязнённых почв // Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 42-57.
25. Priest F.G. Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Hoch J.A., Losick R., editors. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. – Washington DC: ASM Press; 1993.
26. Shivaji S., Chaturvedi P., Suresh K. *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2006. – V. 56. – P. 1465–1473
27. Лямин А.В., Жестков А.В., Никитина Т.Р., Трофимов А.Р., Исматуллин Д.Д. Общая характеристика и клиническое значение представителей родов *Nocardia* и *Gordonia* // Инфекция и иммунитет. – 2019. – Т. 9. – № 3-4. – С. 429-436.

28. Трапезникова Б. В., Иванова Т.Н., Кожедуб А.П. Бактерии рода *Rhodococcus*: клиническое значение, диагностика и возможности антибактериальной терапии // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2013. – С. 178-181.

29. Лихошвай А.В. Микробные сообщества в районах естественных выходов нефти на озере Байкал / О.Н. Павлова, А.В. Ломакина, А.В. Лихошвай, Г.А. Фёдорова, Т.А. Шишлянникова, Е.С. Корнева, С.В. Букин, Т.И. Земская // Успехи наук о жизни. – 2010. – №2. – С. 169-172.

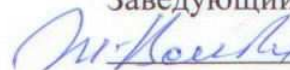
30. Пат 2115727 Россия, МПК6 С12Н 1/26, С02Р 3/34 Способ очистки объектов окружающей среды от углеводородов нефти и масел / Капотина Л.Н., Морщакова Г.Н., Дедовец С.А. № 97102054/13; Заявл. 17.02.97; Опубл. 20.07.98

31. Васильев Д.А. [и др.]. Выделение и типирование бактерии *Pseudomonas putida*. //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2009. – Т. 3 – Вып. 10.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

« 29 » июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология

ВЛИЯНИЕ СОРБЕНТОВ СЕРИИ «УНИСОРБ» НА
МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ И
НЕ ЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

Руководитель


подпись, дата

д.б.н., профессор
должность, ученая степень

С. В. Прудникова
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

А.П. Андрущенко
инициалы, фамилия

Красноярск 2021