

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ Т. Г. Волова

«__» _____ 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

**Биодеградация сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-био» почвенной
микрофлорой**

Руководитель _____ д.б.н. С.В. Прудникова

Студент ББ18-34Б _____ К.Д. Бондаренко

Красноярск 2022

Реферат

Выпускная квалификационная работа по теме «Биодеградация сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-био» почвенной микрофлорой» представлена в объеме 38 страниц, включает в себя 2 таблицы, 22 иллюстрации и список литературы, состоящий из 32 источников.

Ключевые слова: СОРБЕНТЫ, БИОРЕМЕДИЦИАЦИЯ, НЕФТЕПРОДУКТЫ, БИОДЕГРАДАЦИЯ, ПОЧВЕННАЯ МИКРОФЛОРА.

Цель: оценка биодegradуемости полимерных сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био» под действием почвенных микроорганизмов.

Задачи работы включали выделение микроорганизмов способных разрушать сорбенты типа «Унисорб»; изучение их свойств, идентификация и оценка эффективности деструкции сорбентов, данными микроорганизмами.

Актуальность работы обусловлена тем, что одним из лучших методов очистки нефтезагрязнений является биоремедиация. Применение сорбентов увеличивает ее эффективность. Однако сорбент не удаляется из почвы долгое время, что затрудняет полную очистку территорий.

Основные выводы и результаты работы: 1) Из почвы, загрязненной нефтью, было выделено 6 штаммов бактерий, способных использовать сорбент «Унисорб» в качестве субстрата и 5 штаммов бактерий, способных использовать сорбент «Унисорб-Био» в качестве субстрата. 2) Видовой состав микроорганизмов, выделенных из двух накопительных культур различался и не имел общих видов. Однако все бактерии обладали потенциалом к деградации сложных соединений. 3) Удельная скорость биодеградации сорбента «Унисорб» составила в среднем $0,017 \pm 0,002$ г/сут, а «Унисорб-Био» $0,028 \pm 0,007$ г/сут.

Работа выполнена в рамках хоздоговора № х/д 31222 НИЧ СФУ от 02.03.2020 «Определение показателей биодеградации сорбентов «Унисорб», «Унисорб-Био» в чистых и нефтезагрязненных почвогрунтах».

Оглавление

Введение.....	4
1. Обзор литературы.....	6
1.1. Воздействие нефтепродуктов на почву и микроорганизмы.....	6
1.2. Методы борьбы с нефтяными загрязнениями	7
1.2.1. Физико-химические методы очистки от нефтяных загрязнений	7
1.2.2. Микробиологический метод.....	9
1.3. Применение сорбентов при очистке от нефтяных загрязнений 11	
2. Объекты и методы исследования	15
2.1. Объекты исследования	15
2.2. Постановка накопительных культур.....	15
2.3. Выделение чистых культур микроорганизмов из накопительных культур.....	17
2.4. Изучение свойств выделенных микроорганизмов и их идентификация	17
2.5. Анализ способности бактерий использовать сорбент в качестве субстрата	20
3. Результаты.....	21
3.1. Анализ биодegradации сорбента в накопительных культурах	21
3.2. Выделение и идентификация бактерий	21
3.3. Биодegradация сорбента под действием выделенных штаммов бактерий	21
Выводы.....	22
Список литературы	23

Введение

В связи с увеличением объемов добываемой нефти, нефтепродукты попадают в окружающую среду в большом количестве, и ученые разрабатывают различные методы для борьбы с подобными загрязнениями. Одним из таких способов является биоремедиация (очистка почвы с использованием метаболического потенциала микроорганизмов). Основным компонентом нефти являются углеводороды, поэтому для данного метода используют микроорганизмы способные использовать углеводороды в качестве субстрата, а также употреблять их в качестве источника энергии для своей жизнедеятельности. Метод биоремедиации основан на стимулировании роста и активности природных микроорганизмов (биостимуляция) или внесении в почву селекционированных микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация) [1].

Микробиологическая биоремедиация имеет важные преимущества перед другими методами: она гарантирует экологическую безопасность, возможность постоянной обработки «хронических» загрязнений, более высокую степень очистки, относительную дешевизну, и возможность использования в труднодоступных зонах [2].

Помимо микроорганизмов для очищения почвы используют сорбенты, которые консервируют нефтепродукты, предотвращают их вымывание и выветривание. Деструкция нефти происходит за счет физико-химических факторов окружающей среды и естественных процессов природного самоочищения, которое активируется биосорбентом.

Эффективность процесса биодеструкции возрастает при иммобилизации микроорганизмов на полимерный сорбент. Основным способом функционирования сорбентов в природных условиях является прочное взаимодействие микроорганизмов и твердого пористого материала. Иммобилизация способствует повышению ферментативной активности и устойчивости микроорганизмов к неблагоприятным факторам окружающей среды, а также закреплению в загрязненной экосистеме, и ускорению

процессов биодegradации нефтяных углеводородов [3]. Однако сорбент не удаляется из почвы долгое время, что затрудняет полную очистку территорий.

В связи с этим, целью данной работы явилась оценка биодegradуемости полимерных сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-Био» под действием почвенных микроорганизмов.

Были поставлены следующие задачи:

1. Из почвы, загрязненной нефтью, выделить микроорганизмы, способные разрушать сорбенты типа «Унисорб» и использовать их в качестве субстрата;
2. Изучить физиолого-биохимические и культуральные свойства выделенных микроорганизмов и провести идентификацию;
3. Сравнить видовой состав микроорганизмов, выделенных из накопительных культур с сорбентом «Унисорб» и с сорбентом «Унисорб-Био»;
4. Оценить эффективность деструкции сорбентов, выделенными микроорганизмами.

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

1. Обзор литературы

1.1. Воздействие нефтепродуктов на почву и микроорганизмы

Одними из основных источников загрязнения окружающей среды нефтяными углеводородами являются добыча, хранение, транспортировка, переработка и утилизация ископаемого топлива. Установлено, что нефтяное загрязнение значительно искажает все звенья естественных биоценозов [3].

В первую очередь следует отметить изменения морфологических признаков почвы. При нефтяном загрязнении почвы имеют более темный цвет по сравнению с незагрязненными, маслянистые и радужные пленки по граням структурных частей, большую плотность, а также появляются столбчатые структуры в нижней части почвенного массива. Гидрофобные условия в почве приводят к бесплодию почв. Понижение концентрации кислорода способствует развитию анаэробных микроорганизмов. После разливов нефти преобладающей в почве становится углеводородокисляющая микрофлора, она осуществляет подготовительный этап метаболизма углеводов. [4].

Кроме этого, при загрязнении почвы небольшими концентрациями нефти наблюдается достоверное увеличение активности ферментов класса оксидоредуктаз: каталазы и пероксидазы, в то время как высокие дозы поллютанта снижают активность данных ферментов. Помимо этого, большая концентрация нефти снижает интенсивность биохимических процессов [5].

Нефтяные углеводороды уменьшают пористость почвы и препятствуют образованию почвенных агрегатов, тем самым разрушая естественную структуру почвы. Эти загрязнители влияют на такие свойства почвы, как содержание кислорода, pH, ионообменная емкость, влажность и степень насыщения катионами. Из-за этого биологическое равновесие в почве нарушается отрицательно, что ухудшает рост растений. [6]

Изучив научную литературу, можно сделать вывод, что в небольших количествах нефть может стимулировать развитие отдельных видов

микроорганизмов. Некоторые виды способны окислять углеводороды или использовать минеральные формы азота, которые наряду с аммонификаторами могут служить индикаторами изменения условий среды обитания при концентрации нефти в почве. При загрязнении чернозема нефтью микроорганизмы образуют ряд: актиномицеты> аммонифицирующие бактерии> спорообразующие бактерии> грибы (по степени увеличения их численности) [7]. Однако при больших концентрациях углеводородов количество питательных веществ уменьшается и микроорганизмы погибают.

1.2. Методы борьбы с нефтяными загрязнениями

На данный момент существует несколько основных методов борьбы с техногенными загрязнениями. Они основаны на различных способах удаления углеводородов из окружающей среды, но при использовании любого метода соблюдают некоторые правила. Например, все работы по очистке водного или наземного участка проводятся в кратчайшие сроки; операции по ликвидации разлива топлива не должны принести больший экологический ущерб, чем сама авария [2].

Для минимизации воздействия нефтяных углеводородов на окружающую среду и рисков, которые они представляют для здоровья человека, разработаны физико-химические и биологические методы рекультивации загрязненных нефтяными углеводородами участков.

1.2.1. Физико-химические методы очистки от нефтяных загрязнений

Основные методы очистки нефтезагрязнений:

1. Термический метод;
2. Химический метод;
3. Механический метод;
4. Микробиологический метод

Вышеперечисленные методы относятся к принудительной ликвидации нефтезагрязнений. Термический и химический способы очистки нефтезагрязнений относятся к физико-химическим методам. В основе термического метода лежит контролируемое сжигание нефтяного разлива, этот способ самый простой. Однако, в связи с тем, что при разливе нефти на водной поверхности загрязнение распространяется очень быстро и нефтяное пятно невозможно сконцентрировать в одном месте, то толщина слоя становится малой, в следствии чего горение прекращается. Помимо этого, сжигание нефти наносит довольно серьезный урон окружающей среде, так как испаряются летучие органические и канцерогенные вещества, образуется облако дыма и нагревается поверхность на которой произошел разлив. Рекультивация почв после использования такого метода происходит довольно долго. Также стоит отметить, что термический метод требует больших финансовых затрат [6].

Химический метод подразумевает использование различных растворителей, диспергирующих средств, либо сорбентов. Сущность способа удаления нефтепродуктов с помощью химических веществ заключается в том, что вносимое вещество реагирует с нефтепродуктами, в результате разрушая их структуру, способствуя биохимическому разложению. Минусы использования данного метода: длительное биоразложение нефти после обработки, многие реагенты пожароопасны, необходимость внесения в окружающую среду дополнительных токсичных веществ. Наиболее перспективным методом является использование органических сорбентов [1].

Механический метод- это технология сбора нефтепродуктов с поверхности почвогрунта или воды при помощи специального оборудования, например, насосов, либо собирающих установок вакуумного типа. Недостатком данного метода является не полная очистка территорий, нарушение естественных ландшафтов и необходимость последующей утилизации нефтепродуктов [2].

1.2.2. Микробиологический метод

Микробиологические способы очистки от нефтезагрязнений являются наиболее экологичными, они основаны на стимулировании роста и активности природных микроорганизмов (биостимуляция) или внесении в почву селекционированных микроорганизмов-деструкторов (биоаугментация) [1]. По сравнению с процессами физической и химической обработки биоремедиация использует микроорганизмы (включая грибы, бактерии и водоросли) в качестве свободных клеток, биопленок или агрегатов и играет важную роль в обеспечении более экологичного, экономически эффективного и устойчивого решения для очистки загрязненной воды, воздуха и почвы.

Многочисленные наблюдения за микроорганизмами, обитающими на месте техногенной аварии, показывают, что видовой состав организмов меняется. Не все микроорганизмы способны разлагать углеводороды, но устойчивые выживают и приспосабливаются к изменившимся условиям среды. Впоследствии произойдет изменение генома, повысится выживаемость, сформируются механизмы адаптации, позволяющие им использовать загрязняющее вещество в качестве субстрата [8]. На эффективность биоремедиации TPH в загрязненных почвах могут влиять характеристики загрязняющих веществ (биодоступность и токсичность), пространственное распределение микробов и их метаболическая способность. [9]

Для увеличения эффективности деятельности микроорганизмов и повышения скорости разложения углеводородов необходима внешняя помощь, например, добавление питательных веществ. Также для использования данного метода необходимо учитывать факторы окружающей среды, такие как, температура, освещенность, наличие различных веществ в почве и другие. Как показывают многие исследования процессы биоремедиации протекают лучше, при биоаугментации почв.

Недостаток метода заключается в медленном протекании процесса. Среди достоинств данного метода необходимо выделить большую эффективность при малых концентрациях нефтепродуктов и экологическую безопасность. [2].

Наиболее часто в нефтезагрязненных почвах развиваются бактерии родов: *Rhodococcus*, *Nocardia sp.*, *Brevibacterium*, *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Pseudonocardia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, дрожжи родов *Candida*, *Rhodotorula*, *Trichosporom*.

Микробиологический состав почв зависит от природы нефтепродукта. Характерно доминирование видов рода *Rhodococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Arthrobacter*. В хронически загрязненных экосистемах безусловным доминантом являются *Rhodococcus*, а остальные виды занимают второстепенное положение.

При загрязнении водоема дизельным топливом на начальных этапах деструкции доминируют виды *Acinetobacter sp.*, *Arthrobacter sp.*, затем их сменяют микроорганизмы вида *Rhodococcus sp.*, через четыре недели к ним присоединяются *Pseudomonas sp.*

Специфическим и обязательным структурным компонентом клеточных стенок некоторых бактерий являются миколовые кислоты. Угнетение их синтеза приводит к потере способности к окислению углеводов, поскольку они осуществляют транспорт таких молекул в клетки [10]. Было доказано, что эффективность биоремедиации возрастает при использовании смешанных культур, а не чистых бактериальных культур.

Для идентификации используют метод хромато-масс-спектрометрии, происходит распознавание микроорганизмов на основании сведений о массах характеристических белков [3].

Помимо непосредственной очистки участка от нефтепродуктов не стоит забывать и о восстановлении района, подвергшегося загрязнению. Для этого мобилизуют внутренние ресурсы загрязненной экосистемы. Используют биосурфактанты. Они служат источником углерода, который

способствует стимуляции роста клеток и микробной активности и ускоряет процесс биодegradации. [9] Технология полной очистки и восстановления включает механическую обработку, захоронение, испарение, распыление и промывку [11].

Одновременное использование нефтеокисляющих микроорганизмов и питательных добавок может эффективно восстановить всхожесть семян на загрязненной нефтью почве. Производят посев сельскохозяйственных трав на техногенно-нарушенных территориях, так как это эффективный способ для восстановления функциональности почв [12]. Прорастание семян является важной фазой жизненного цикла растений и очень чувствительно к окружающей среде. Следовательно, если прорастание семян в биоремедируемой почве имеет место, это можно рассматривать как признак восстановления всхожести почвы, что, в свою очередь, указывает на улучшение состояния почвы. [6]

1.3. Применение сорбентов при очистке от нефтяных загрязнений

Метод для очистки территории от загрязнения нефтью зависит от того насколько глубоко проникли углеводороды и от типа поверхности. При этом следует учесть, что сорбенты и биопрепараты эффективны только при невысоких уровнях загрязнения и тогда, когда механический сбор нефти затруднен или невозможен. [13] Одним из преимуществ полимерных сорбентов является возможность возврата собранных нефтепродуктов в оборот после отжима.

Материал-носитель должен быть биоразлагаемым, нерастворимым, нетоксичным для иммобилизованных клеток и окружающей среды, легкодоступным, недорогим, обладать доступностью в больших количествах, стабильным и пригодным для регенерации. Сочетание технологических свойств экологически чистых сорбентов с их способностью вмещать в себя биоразлагаемую биопленку, позволяет получать биоразлагаемые биопленки-

биосорбенты, способные удалять нефть с высокой эффективностью и экономичностью.

Адсорбционная способность нефти в основном зависит от двух факторов: поверхностной адсорбции и капиллярных сил. При увеличении толщины мембраны поверхностная адсорбция становится менее интенсивной, а эффективность удаления нефти снижается. Адсорбционная способность биосовместимых мембран дополняет способность бактерий к биодegradации нефти, которые при иммобилизации на этих структурах имеют лучшие условия для своей катаболической активности. Носитель обеспечивает стабильное микроокружение бактерий, в котором иммобилизованные клетки защищены от неблагоприятных факторов окружающей среды. Улучшается сродство между бактериальными клетками и гидрофобным субстратом, стимулируя механизм поглощения углеводов микроорганизмами и решая проблему низкой биодоступности углеводов. [14]

Полимерный сорбент «Униполимер» из нетоксичной модифицированной водорастворимой смолы. Благодаря технологии вспенивания и отверждения, имеет высокую пористость (84–93 %), большинство пор (до 90 %) являются сквозными, открытыми, сорбент гидрофобен, не поддерживает горение, бело-розового цвета. Полимерная пена является сухим порошком, имеющим гранулы неправильной формы до 10–20 мм, легко поддающиеся вакуумированию [15].

Малозатратным способом получены сорбенты с высокой сорбционной способностью из ячменной шелухи, околоплодников редьки и арахиса. Собранный конгломерат из пропитанного углеводородами сорбента способен подвергаться извлечению нефти компрессионными методами. Нефтесорбенты из отходов агропромышленного комплекса обладают способностью к биоразложению под действием аборигенных почвенных или искусственно внесенных микроорганизмов [16].

Сорбенты относительно безопасны для окружающей среды, способствуют снижению токсического эффекта при нефтяном загрязнении. Сорбенты «Унисорб» и «Унисорб-Био» снижают токсичное действие нефтезагрязнения на растения, особенно при загрязнении от 5 до 10 %. [17]

Сорбент «Унисорб» — это универсальный сорбент в основе, которого вспененный карбамид, поэтому сорбент способен разлагаться в почве, насыщая ее азотом и фосфором. Используется для сбора нефтепродуктов на твердых и водных поверхностях. Обладает высокой сорбирующей способностью. Способен к биоразложению в природных условиях. Плюсом является отсутствие вторичного загрязнения среды. Сорбент «Унисорб» является нетоксичным и непатогенным сорбирующим материалом, не вызывает нарушения экологического равновесия в экосистемах и не оказывает отрицательного воздействия на биотипы различного трофического уровня.

Проанализировав источники информации, можно сделать вывод, что наиболее эффективным, удобным, наименее затратным по технологии осуществления отчистки является применение сорбента «Унисорб-Био». [18] Это карбамидный сорбент типа «Унисорб» с иммобилизованной аборигенной микрофлорой. Иммобилизация бактериальных клеток в матрице гидрогель/носитель может осуществляться двумя способами: либо путем помещения приготовленного гидрогеля в бактериальный бульон для адсорбции бактерий, либо путем одновременного гелеобразования гидрогеля с полимерными блоками и бактериальными клетками. Для биоремедиации токсичного загрязнителя с использованием иммобилизованных бактерий работают несколько механизмов одновременно и, следовательно, они могут по-разному воздействовать на токсичный целевой загрязнитель. Часть загрязняющего вещества может быть удалена путем пассивной адсорбции на материал матрицы или поверхность клетки. [19]

Сорбент «Унисорб-Био» используется для сбора и биоразложения нефтепродуктов в природе. Не требует сбора и утилизации, разлагает

нефтепродукты благодаря биопрепарату в структуре сорбента и разлагается сам. Имеет хлопьеобразную структуру, поэтому легко и быстро впитывает и удерживает большие количества нефти и нефтепродуктов. При очистке почвы от нефтезагрязнений разрыхляет почву, давая доступ воздуху и влаге вглубь почвы. Разлагаясь, насыщает почву азотом и фосфором, стимулируя рост и развитие растений и почвенной микрофлоры, помогая еще быстрее и наиболее полно очиститься от нефтяного загрязнения. Является отличным носителем биопрепаратов нефтеокисляющих микроорганизмов. [3]

2. Объекты и методы исследования

2.1. Объекты исследования

Объектом исследования в данной работе являлись почвенные бактерии, выделенные из нефтезагрязненной почвы в накопительных культурах с добавлением сорбента «Унисорб» (универсальный сорбент на основе вспененного карбамида (мочевины)) и с добавлением сорбента «Унисорб-Био» (карбамидный сорбент типа «Унисорб» с иммобилизованной нефтеокисляющей микрофлорой, обладающий комбинированным действием). А также микроорганизмы, входящие в состав сорбента «Унисорб-Био».

Образцы сорбентов для исследования предоставлены «ООО НПФ Экосорб».

2.2. Постановка накопительных культур

Накопительные культуры бактерий, способных использовать сорбенты в качестве субстрата, получали на жидкой питательной среде – модифицированной среде Чапека, в которую в качестве источника азота добавляли сорбенты «Унисорб» или «Унисорб-Био». Состав модифицированной среды Чапека (г/л): глюкоза - 5; NaCl - 0,5; K₂HPO₄ – 1; KH₂PO₄ -1; MgSO₄ · 7H₂O - 0,5; сорбент – 5. Вода использовалась водопроводная. Источником микроорганизмов служила садовая почва, загрязненная нефтью (12 вес. %), которую добавляли в количестве 0,1 г на 100 мл питательной среды.

Исследование возможности деградации сорбентов почвенной микрофлорой в накопительных культурах проводили следующим образом: в колбы объемом 250 мл вносили по 100 мл модифицированной питательной среды, содержащий сорбент, и стерилизовали при 115 °С в течение 20 минут; затем добавляли 0,1 г почвы и культивировали на шейкере-инкубаторе Jeio

Tech SI-600 (рис. 1) в течение 28 суток при комнатной температуре и скорости вращения платформы шейкера 120 об./мин.



Рисунок 1. Шейкер-инкубатор Jeio Tech SI-600

В варианте отрицательного контроля почву не добавляли, колбы содержали только питательную среду и стерильный сорбент. Для оценки возможности микроорганизмов, входящих в состав «Унисорб-Био», воздействовать на сорбент, в данном варианте эксперимента сорбент добавили в питательную среду после стерилизации, и почву не вносили, т.е. источником микроорганизмов был сам сорбент. Эксперименты проводили в 3-х повторностях.

После окончания культивирования содержимое колб отфильтровывали, высушивали и определяли остаточную массу сорбента.

2.3. Выделение чистых культур микроорганизмов из накопительных культур

Чистые культуры из накопительных получали методом истощающего посева в чашки Петри на мясопептонный агар (МПА) Nutrient agar (HiMedia, Индия). Среду стерилизовали при 1 атм. 20 минут и разливали в стерильные чашки Петри. На поверхность среды в чашке вносили 50 мкл суспензии накопительной культуры и распределяли её стерильным шпателем последовательно на 5 чашек (рис. 2). Культивировали в течение 7 дней при температуре 30 °С. Чистые культуры из выросших на МПА изолированных колоний пересевали на скошенный МПА для дальнейшего исследования и идентификации.

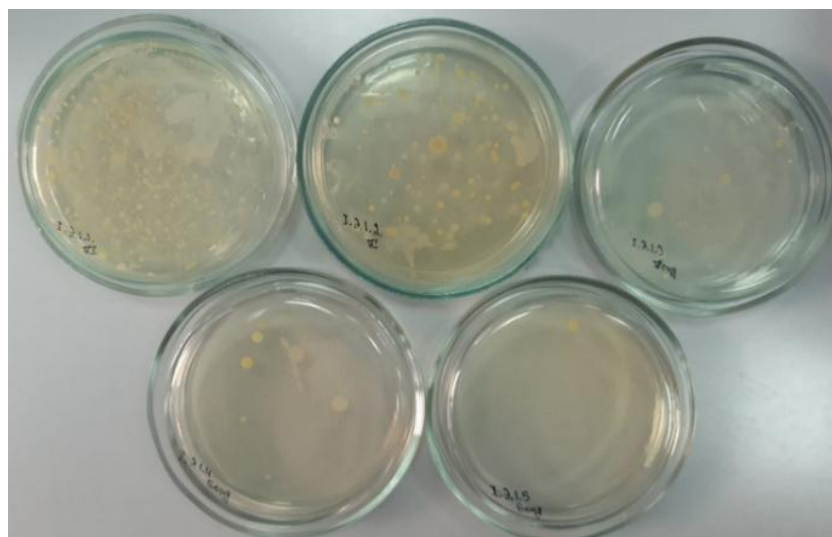


Рисунок 2. Рост бактериальных колоний из накопительных культур с сорбентом «Унисорб» при высева на МПА

2.4. Изучение свойств выделенных микроорганизмов и их идентификация

Морфологические свойства изучали на прижизненных окрашенных препаратах (рис. 3). Грампринадлежность бактерий определяли экспресс-методом Греггерсена с 3% раствором КОН.

Провели анализ физиолого-биохимических свойств выделенных культур. Для определения липазы готовили желточный агар. Приготовили МПА, стерилизовали при 0,5 атм 30 минут, охладили до 45-50 °С. Желток асептически внесли в 100 мл стерильного физраствора. Скорлупу яйца продезинфицировали спиртом, яйцо разбили, отделив белок от желтка. Желток перенесли в раствор и перемешали до однородной суспензии. Желточный раствор добавили в МПА в количестве 50-100 мл. Затем разлили в стерильные чашки Петри. Культуры бактерий засеивали штрихом, инкубировали 7 дней, затем проверили наличие маслянистого слоя вокруг колонии (рис. 4).

Для выявления амилолитической активности использовали агаризованную среду (МПА) с добавлением растворимого крахмала (1,5-3%). Автоклавировали при 1 атм. 20 минут, затем разлили в стерильные чашки Петри. Исследуемые микроорганизмы высевали штрихом через центр. Инкубировали 7 дней при 37 °С. Гидролиз крахмала обнаруживали после обработки агаровой поверхности раствором Люголя. Для этого на поверхность среды наливали 3-5 мл раствора Люголя. О наличии фермента свидетельствуют прозрачные зоны вокруг штриха. Зона непрогидролизованного крахмала становится синей (рис. 5).



Рисунок 3. Морфология штамма Ч.2.3



Рисунок 4. Тест на липазу и лецитиназу

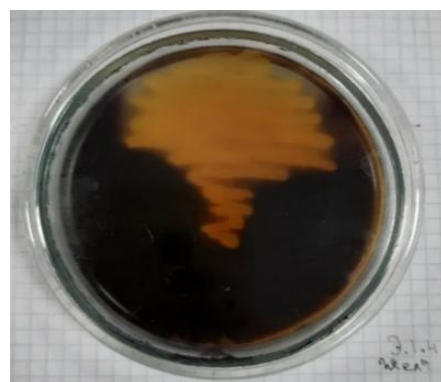


Рисунок 5. Тест на амилазную активность

Проверяли протеолитическую активность микроорганизмов. Для этого культуры высевали на мясопептонную желатину (МПЖ). К 100 мл мясопептонного бульона (МПБ) добавили 15 г желатины, оставили на 15 минут, чтобы она набухла, затем нагрели на водяной бане до полного растворения желатины и разлили в пробирки на 3-4 см. Стерилизовали 15 минут при 0,5 атм. Посев проводили уколом в столбик. Продолжительность культивирования составила 7 дней при комнатной температуре. Разжижение желатины отмечали визуально (рис. 6).

Способность исследуемых культур ферментировать углеводы изучали на универсальных средах Гисса. В состав сред входят индикатор и различные углеводы (глюкоза, сахароза, лактоза, мальтоза, манит). Среду готовили следующим образом – 15 г/л сухой среды размешивали в дистиллированной воде, кипятили до полного растворения. Разливали в стерильные пробирки. Засев проводили уколом, культивировали в течение 4 дней. Рост микроорганизмов анализировали по изменению цвета среды (рис. 7).



Рисунок 6. Тест на протеолитическую активность

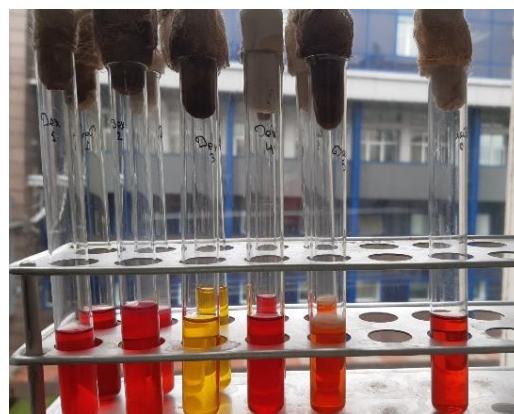


Рисунок 7. Тест на средах Гисса

Помимо этого, была произведена видовая идентификация выделенных культур с помощью метода MALDI TOF времяпролетной масс-спектрометрии на масс-спектрометре MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Германия) в Центре охраны материнства и детства г. Красноярск.

2.5. Анализ способности бактерий использовать сорбент в качестве субстрата

Способность выделенных изолятов бактерий использовать сорбенты «Унисорб» и «Унисорб-био» оценивали при культивировании бактерий на модифицированной среде Чапека с добавлением сорбента. Среду разливали по 100 мл в колбы, сорбенты поместили в мешочки из органзы по 0,5 г и погружали в питательную среду, затем автоклавировали при 1 атм. 20 минут. Затем в колбы вносили суспензии каждого вида бактерий по отдельности.

Для определения эффективности разрушения сорбентов разными видами бактерий оценивали убыль массы сорбента через 4 недели культивирования на шейкере при скорости вращения 120 об./мин.

Для оценки степени биodeградации определяли изменение массы сорбента (X , %) по формуле (1):

$$X = \frac{X_1 - X_2}{X_1} \times 100, \quad (1)$$

где X_1 и X_2 – средняя масса образцов до и после испытаний, соответственно (мг).

Удельную скорость биodeградации (β , мг/сут) определяли по формуле (2):

$$\beta = \ln\left(\frac{X_1}{X_2}\right) / \tau, \quad (2)$$

где τ – время (сутки).

3. Результаты

3.1. Анализ биодegradации сорбента в накопительных культурах

3.2. Выделение и идентификация бактерий

3.3. Биодegradация сорбента под действием выделенных штаммов бактерий

Изъято 13 страниц

Выводы

1. Из почвы, загрязненной нефтью, было выделено 6 штаммов бактерий, способных использовать сорбент «Унисорб» в качестве субстрата: *Cellulosimicrobium cellulans*, *Streptomyces sp.*, *Bacillus pumilus*, *Streptomyces violaceoruber*, *Paenibacillus rhizosphaerae*, *Brevibacillus centrosporus*.

2. Из почвы, загрязненной нефтью, было выделено 5 штаммов бактерий, способных использовать сорбент «Унисорб-Био» в качестве субстрата: *Achromobacter xyloxidans*, *Achromobacter denitrificans*, *Achromobacter spanius*, *Stenotrophomonas rhizophila*, *Pseudomonas synxantha*.

3. Видовой состав микроорганизмов, выделенных из накопительных культур с сорбентом «Унисорб» и сорбентом «Унисорб-Био» различался и не имел общих видов. Однако все виды бактерий обладали высокой ферментативной активностью и потенциалом к деградации сложных соединений.

4. Убыль массы сорбента «Унисорб» в суспензиях бактериальных культур, растущих в жидкой модифицированной среде Чапека, за 28 суток инкубации составила от 30 до 45 %. Удельная скорость биodeградации сорбента составила в среднем $0,017 \pm 0,002$ г/сут. Максимальную активность проявлял вид *S. violaceoruber*.

5. Убыль массы сорбента «Унисорб-Био» под действием бактерий составила от 40 до 66 % от исходной. Удельная скорость биodeградации сорбента составила $0,028 \pm 0,007$ г/сут. Наибольшее снижение массы отмечено при воздействии видов *A. spanius* и *P. synxantha*.

Список литературы

1. Фомина Н. В. Ферментативная активность нефтезагрязненного почвогрунта после применения биоактивного сорбента //Международный научно-практический журнал «Эпоха науки». – 2016. – №7. – С. 42;
2. Иванова М. А., Чикина Н. С., Зенитова Л. А. Ликвидация нефтяных загрязнений //Бутлеровские сообщения. – 2012. – Т. 29. – №. 3. – С. 1-12;
3. Рязанова Т. В., Федорова О. С., Лоскутов С. Р. Деструкция нефти иммобилизованной микрофлорой //Журнал Сибирского федерального университета. Химия. – 2018. – Т. 11. – №. 2. – С. 184-196;
4. Шамраев А. В., Шорина Т. С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 6. – С. 642-64;
5. Шорина Т. С. Влияние нефтяного загрязнения на биологическую активность черноземов Оренбургской области //Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – №. 6. – С. 651-653;
6. Varjani S., Upasani V. N., Pandey A. Bioremediation of oily sludge polluted soil employing a novel strain of *Pseudomonas aeruginosa* and phytotoxicity of petroleum hydrocarbons for seed germination //Science of the Total Environment. – 2020. – Т. 737. – С. 139766;
7. Полонская Д. Е. и др. Влияние уровня нефтезагрязнения на состав почвенных микроорганизмов //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2011. – №. 7. – С. 47-52;
8. Truskewycz A. et al. Petroleum hydrocarbon contamination in terrestrial ecosystems—fate and microbial responses //Molecules. – 2019. – Т. 24. – №. 18. – С. 3400;
9. Feng L. et al. Petroleum hydrocarbon-contaminated soil bioremediation assisted by isolated bacterial consortium and sophorolipid //Environmental Pollution. – 2021. – Т. 273. – С. 116476;

10. Гоголева О. А., Немцева Н. В. Углеродородокисляющие микроорганизмы природных экосистем //Бюллетень Оренбургского научного центра УРО РАН. – 2012. – №. 2. – С. 1;
11. Das N., Chandran P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview //Biotechnology research international. – 2011. – Т. 2011;
12. Цулаия А. М. Влияние нефтяного, солевого и нефтесолевого загрязнения на морфофункциональные показатели овса посевного *Avena sativa* //Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2011. – Т. 78. – №. 4. – С. 33-39;
13. Конгар-Оол В. В., Мелкозеров В. М., Кайзер Ю. Ф. Индустриальная очистка нефтезагрязненных земель, водоемов, лесных угодий и других ландшафтов //Вестник Тувинского государственного университета. Технические и физико-математические науки. – 2019. – №. 4 (54). – С. 31-38;
14. Catania V. et al. Innovative, ecofriendly biosorbent-biodegrading biofilms for bioremediation of oil-contaminated water //New Biotechnology. – 2020. – Т. 58. – С. 25-31;
15. Федотова А. С., Мелкозеров В. М. Технологические аспекты очистки и рекультивации почв агробиоценозов при нефтерозливах //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2017. – №. 1. – С. 85-91;
16. Булавка Ю. А., Якубовский С. Ф., Майорова Е. И. Использование отходов агропромышленного комплекса для получения нефтяных сорбентов //XXI век. Техносферная безопасность. – 2017. – Т. 2. – №. 4. – С. 38-47;
17. Фомина Н. В. Фитотестирование нефтезагрязненного почвогрунта после применения сорбентов //Эпоха науки. – 2017. – №. 11. – С. 154-161;

18. Шагиев Б. З. и др. Эколого-экономическая эффективность применения лузги подсолнечника в процессе биодеструкции углеводов нефти //Нива Поволжья. – 2016. – №. 1 (38) – С. 50-56;
19. Mehrotra T. et al. Use of immobilized bacteria for environmental bioremediation: a review //Journal of Environmental Chemical Engineering. – 2021. – Т. 9. – №. 5. – С. 105920;
20. Staley J. and George M. Bergey's manual® of systematic Bacteriology: Volume three the Firmicutes - Springer New York, 2019;
21. Goodfellow M. et al. (ed.). Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume five the actinobacteria, part a. – Springer New York, 2012;
22. Кондратьева Е. И., Каширская Н. Ю., Капранов Н. И. Муковисцидоз: определение, диагностические критерии, терапия //Национальный консенсус. М.: Компания БОРГЕС. – 2016. – Т. 205– С. 50-56;
23. Defrancesco I., Arcaini L. Overview on the management of non-gastric MALT lymphomas //Best Practice & Research Clinical Haematology. – 2018. – Т. 31. – №. 1. – С. 57-64;
24. Yabuuchi E., Ohyama A. *Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from human ear discharge //Japanese journal of microbiology. – 1971. – Т. 15. – №. 5. – С. 477-481;
25. Wolf A. et al. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with antifungal properties //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2002. – Т. 52. – №. 6. – С. 1937-1944;
26. Sgrelli A. et al. *Achromobacter denitrificans* renal abscess //New Microbiol. – 2012. – Т. 35. – №. 2. – С. 245-247;
27. Субботин А. М., Симонова Е. О., Петров С. А. Штамм микроорганизмов *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 в качестве средства повышения устойчивости растений к хлоридному засолению. – 2017;

28. Ким А. В. Биологическая характеристика морских псевдомонад, выделенных из районов с разной степенью антропогенной нагрузки // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – №3. – С. 41-44;
29. Сулейманова Л. Р., Четвериков С. П., Логинов О. Н. Комплексообразование триглицеридпептидов бактерий рода *Pseudomonas* с корневыми эксудатами растений // Башкирский химический журнал. – 2007. – Т. 14. – №. 3. – С. 47-51;
30. Koolivand A. et al. The effect of petroleum hydrocarbons concentration on competition between oil-degrading bacteria and indigenous compost microorganisms in petroleum sludge bioremediation // Environmental Technology & Innovation. – 2022. – С. 102319;
31. Li Q. et al. Application of alkyl polyglycosides for enhanced bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil using *Sphingomonas changbaiensis* and *Pseudomonas stutzeri* // Science of The Total Environment. – 2020. – Т. 719. – С. 1374564;
32. Wu M. et al. Bacterial community shift and hydrocarbon transformation during bioremediation of short-term petroleum-contaminated soil // Environmental pollution. – 2017. – Т. 223. – С. 657-664.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова

«24» июня 2022 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

**Биодеградация сорбентов «Унисорб» и «Унисорб-био» почвенной
микрофлорой**

Руководитель



д.б.н. С.В. Прудникова

Студент ББ18-34Б



К.Д. Бондаренко

Красноярск 2022