

Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
«Лицей № 4» Рузаевского муниципального района
Республики Мордовия

Исследовательский проект

**Изучение роли микроорганизмов в очистке почвы от загрязнений
нефтепродуктами**

Номинация: «Клеточная биология и биотехнология»

Выполнила:

Анна Владимировна Азоркина,
ученица 10 «Б» класса МБОУ «Лицей № 4»

Руководитель работы:

Наталья Юрьевна Шведкова,
учитель биологии МБОУ «Лицей

№ 4»

Научный руководитель:

Наталья Борисовна Назарова,
кандидат биологических наук

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3-4
1. Анализ литературных источников	5-7
1.1. Загрязнение почвы нефтепродуктами	5
1.2. Кто такие актиномицеты?	5-7
2. Материалы и методы исследования	8
2.1. Материал исследования	8
2.2. Методы исследования	8-11
3. Результаты исследования	12
4. Экономическая выгода предлагаемого препарата	13
5. Заключение	14
6. Список литературных источников	15

ВВЕДЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами – результат деятельности человека. Наиболее ощутимо эти воздействия проявляются при добыче нефти, ее переработке, транспортировке, из-за технологических и аварийных выбросов продукции в среду. Все это пагубно влияет на биоценоз различных природных экосистем.

Известно, что 1 л нефти загрязняет до 1000 м³ воды, что обусловлено присутствием в ней природных поверхностно–активных веществ, которые образуют стабильные нефти -водные эмульсии.

Необходимо отметить, что на всех этапах добычи и транспортировки ежегодно теряется более 45 млн. тонн нефти (на суше – 22 млн. т, на море – 7 млн. т, в атмосферу в виде продуктов неполного сгорания топлива поступает 16 млн. т).

Загрязнение земель нефтепродуктами и нефтяными отходами остается серьезной экологической проблемой. Большинство видов нефтепродуктов содержат токсичные вещества, уничтожающие биологическое разнообразие и представляющие угрозу для человека.

Актуальность:

Попадание нефти и продуктов ее переработки в грунт приводит к тяжелым экологическим последствиям. В результате воздействия нефтепродуктов меняются морфологические и химические характеристики почвы. Это делает ее непригодной для роста растений и проживания различных видов живых организмов.

Уменьшение аэрируемости почвы, ухудшение ее дренажных свойств. В результате воздействия нефти грунт хуже насыщается кислородом, что приводит к гибели сотен видов почвенных обитателей. Деградация растительного покрова. Попадание токсичных веществ в грунт провоцирует гибель растений и многократно снижает продуктивность почв. Они становятся непригодными для любого сельскохозяйственного использования.

Легкие нефтепродукты в значительной степени разлагаются и испаряются еще на поверхности почвы, легко смываются водными потоками. Путем испарения из почвы удаляется от 20 до 40 % легких фракций нефти. Эффект тяжелых фракций проявляется позже. Тяжелые фракции нефти малоподвижны и могут создавать устойчивый очаг загрязнения, очищение природной среды от них протекает с трудом. Тяжелые нефти, содержащие значительное количество смол, асфальтенов и тяжелых металлов, оказывают не только токсичное воздействие на организмы, но и значительно изменяют воднофизические свойства почв. Они ухудшают водно-физические свойства почв из-за цементации порового почвенного пространства.

Цель проекта: выяснить, какую роль могут играть микроорганизмы в борьбе с нефтяными отходами.

Задачи проекта:

1. Изучить из литературных источников воздействие нефти на почву.
2. Знакомство с микроорганизмами.
3. Выяснить какие бактерии будут приносить пользу в борьбе с нефтяными залежами.
4. Очистка почв, восстановление продуктивности почв.
5. Экономическая выгода от применения данного метода.

Объект исследования: бактерии рода *Acinetobacter* и их влияние на почвы, загрязненные нефтепродуктами.

Методы работы:

теоретические – анализ и систематизация литературных данных и материалов из электронных баз знаний для выяснения влияния микроорганизмов на нефтепродукты;

эмпирические – микробиологический эксперимент, для выяснения наиболее эффективных микроорганизмов для борьбы с загрязнением почв нефтепродуктами;

математические – подсчитана экономическая выгода, использования препарата «Bio-via» в состав которого будут входить бактерии данного штамма.

Гипотеза работы: очищают ли бактерии почву от нефтепродуктов

Практическая значимость работы: проведены опыты и эксперименты и найден наиболее эффективный способ очистки загрязненной почвы нефтепродуктами с помощью биологического метода. В ходе исследования выделили микроорганизмы-деструкторы нефтепродуктов, штамм рода *Acinetobacter*. Создание микробиологического препарата в состав которого будут входить данные микроорганизмы. Биоремедиация это одно из перспективных направлений очистки почвы от нефтепродуктов.

1. Анализ литературных источников

1.1. Загрязнение почвы нефтепродуктами

Почвы считаются загрязненными нефтепродуктами, когда содержание загрязняющих веществ превышает максимальную допустимую концентрацию, в результате начинаются различные негативные изменения состава грунта и биологического сообщества. Важные признаки загрязнения – это нарушение биологического разнообразия, гибель одних видов микроорганизмов и усиленный рост других, деградация свойств почвы и снижение их биологической продуктивности.

Прежде чем приступить к очистке почвы, в которую попали продукты утечки, необходимо ее изучить, чтобы выявить тип грунта, виды загрязняющих веществ и климатические особенности местности. Информация служит для подбора комбинации бактерий, которая будет работать лучше всего именно в данных условиях.

В настоящее время существует большое количество методов и способов очистки загрязненных почв, которые можно разделить на следующие: механическая очистка, химическая очистка, биологический способ очистки. Биологический метод основан на применении микроорганизмов, утилизирующих нефть и нефтепродукты. Наибольший интерес представляет последний способ, так как он несет большую эффективность и приносит меньший вред окружающей среде.

Как известно, в состав почвенных микроорганизмов входят бактерии, актиномицеты, грибы, простейшие, водоросли. Каждая группа выполняет определенную функцию. От состава и степени развития указанных разновидностей микроорганизмов зависят способность почвы к самоочищению и ее плодородие. Бактерии, грибы, актиномицеты инициируют и стимулируют процессы коррозии и старения продуктами своей жизнедеятельности, а при прямом или комбинированном воздействии (совместно с другими факторами среды) вызывают особый вид разрушения материалов и покрытий — биоповреждения.

1.2. Кто такие актиномицеты?

Актиномицеты участвуют в процессе биоповреждений наряду с грибами и бактериями. В первом случае их трудно идентифицировать. Актиномицеты, относящиеся к порядку *Mycobacteriales* (не образующие настоящего мицелия), способны окислять сложные углеводороды нефти (парафин и др.) и представляют некоторую опасность для консервационных составов и топлив. Многие представители актиномицетов разрушают целлюлозу, хитин и другие вещества. В продуктах их жизнедеятельности имеются соединения, токсичные для бактерий и других микроорганизмов, но

безопасные для теплокровных. Актиномицеты — это бактерии, образующие нити (*гифы*). Скопление гиф называется мицелием. Такая терминология схожа с терминологией грибов, потому что актиномицеты схожи с ними по своему внешнему строению, но кардинально отличаются строением клетки и толщиной гиф. Толщина гифы актиномицета составляет 0,4–1,5 мкм, в то время как толщина грибных гиф варьирует от 1,5 до 10 мкм. Так что, рассматривая под микроскопом и сравнивая эти микроорганизмы между собой, их сложно перепутать. Название «лучистые грибки» (уже устаревшее) актиномицеты в свое время получили за особенности роста: их гифы прорастают из одной точки (споры), словно солнечные лучи.

Жизненный цикл актиномицетов схож с жизненным циклом грибов. Подобно тому, как растения прорастают из семян, актиномицетный мицелий берет свое начало из спор, в которых содержится запас питательных веществ, помогающих микроорганизму переживать неблагоприятные условия. Спора, попадая в хорошие условия для жизни (оптимальные температура и влажность, достаточное количество питательных веществ), начинает прорастать, и уже через 10 часов из нее появляются первые нити, через 18 часов образуется так называемый субстратный мицелий, а через двое суток и воздушный. Полностью сформированная колония актиномицетов появляется на 4-21 сутки (в зависимости от внешних условий роста).

Помимо самого процесса разрушения нефти, бактерии способны заниматься передачей своих способностей по ее переработке микроорганизмам, которые находились в почве еще до загрязнения. Актиномицеты совместно с другими микроорганизмами используют нефть в качестве источника углерода, удаляя ее с поверхности почвы. Актиномицеты широко распространены в природе. Они активны в почвообразовании усиливают разложение органических соединений и участвуют в создании гумуса. Это преимущественно аэробы, но встречаются и анаэробы. Оптимальная температура их жизнедеятельности 23...37 °С. Они легко переносят просушивание. Актиномицеты в большом количестве встречаются в почве благодаря их способности легко адаптироваться к среде обитания.

Большинство актиномицетов аэробы, факультативные анаэробы присутствуют лишь среди актиномицетов с непродолжительной мицелиальной стадией. Здесь усматривается некоторая, среди которых параллель с грибами, среди которых лишь немиецелиальные дрожжи также способны жить в анаэробных условиях. Предполагается что менее эффективный анаэробный тип метаболизма успешен при большей относительной поверхности клеток, которая достигается фрагментацией мицелия.

Считается что актиномицеты более устойчивы к высушиванию, чем немиецелиальные бактерии, благодаря чему они доминируют в пустынных почвах. Лабораторное хранение почвенных образцов в условиях, не способствующих вегетативному росту прокариот увеличивает относительное содержание актиномицетов, учитываемое методом посева. Особенно долго способны сохраняться при высушивании склероции, образуемые родом *Chainia*. Показано что при $a_w=0,50$ некоторые споры прорастают (р. *Streptomyces*, *Micromonospora*), однако образовавшийся мицелий не ветвится. При $a_w=0,86$ прорастают споры практически всех актиномицетов, у некоторых мицелий ветвится, образуются микроколонии, оптимум достигается при $a_w=0,95$.

Чаще всего актиномицеты нейтрофилы, однако, некоторые роды ацидофильны или алкалофильны. Характерным свойством актиномицетов является ацидотолерантность, благодаря чему их доля в микробном комплексе лесных почв относительно высока. Отмечено что на кислой среде продлевается вегетативная стадия, на щелочной, напротив, ускоряется спорообразование.

Актиномицеты не требовательны к содержанию органического углерода в среде, многие из них способны расти на «голодном» агар-агаре. Представители рода *Nocardia* способны осуществлять хемосинтез, окисляя водород, метан и метол. Для актиномицетов отмечается наличие редких метаболических путей и ферментных систем. Например, для них характерен путь расщепления глюкозы Энтнера Дудорова, встречается полифосфатгексокиназа (вместо обычной гексокиназы), существуют особенности в синтезе ряда аминокислот; во вторичном метаболизме им свойственен шикиматный путь синтеза ароматических соединений, включение цельных углеродных скелетов глюкозы во вторичные метаболиты например, антибиотики.

Отличительной особенностью актиномицетов является способность к синтезу физиологически активных веществ, антибиотиков, пигментов. Именно ими формируется запах почвы и иногда воды (вещества геосмин, аргосмин, муцидон, 2-метил-изобренол). Актиномицеты являются активными продуцентами антибиотиков, образуя до половины известных науке.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Материал исследования:

Для проведения исследований решили изучить методы получения бактерий способных окислять углеводороды нефти.

Одним из экологичных способов восстановления нефтезагрязненных почв являются биологические методы, среди которых биоремедиации почв является наиболее привлекательной, которую возможно осуществлять непосредственно в местах нахождения нефтезагрязненной почвы и восстановить её исходные качества.

Биоремедиация— это технология удаления загрязняющих веществ из почвы и водной среды. В этом процессе используются живые организмы (в основном микроорганизмы, в том числе бактерии), которые катализируют процессы очистки, разрушают или преобразуют различные типы загрязнителей в менее вредные формы. Микроорганизмы (бактерии и грибки) и некоторые растения могут биотрансформировать широкий спектр токсичных и загрязняющих органических соединений, делая их безвредными или безвредными. Они могут даже биоразлагать некоторые органические соединения до их самых простых форм, таких как метан (CH₄) и углекислый газ (CO₂). Конечными продуктами эффективно проводимого процесса биоремедиации в основном являются углекислый газ и вода. Они нетоксичны и могут быть безвредны для окружающей среды.

Методы биоремедиации на данный момент считаются самыми перспективными и безопасными. В частности, микробная реабилитация чаще всего применяется для борьбы с нефтяными загрязнениями. Данный метод основывается на способности некоторых организмов преобразовывать токсичные соединения.

2.2. Методы исследования:

Оборудование и материал: образцы нефтезагрязненных почв, мерный стеклянный стакан, колба коническая стеклянная, питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой, чашки Петри, стерильные пробки ватно-марлевые, стерильная вода, ламинарный бокс, пробирка коническая стерильная, термостат лабораторный, плита лабораторная, микроскоп, предметные стекла, краситель метиленовый синий.

1. Изготовление среды из сухого питательного агара для культивирования микроорганизмов.

В стеклянную колбу конической формы кладем 5,7 грамм питательного агара, заливаем 150 мл воды. Ставим колбу на лабораторную плиту и доводим

до кипения, постепенно помешивая. Затем завязываем колбу с помощью стерильной ватно-марлевой пробки, стерилизуем.



2. Изготовление раствора из почвы.

Берем коническую, стерильную пробирку наливаем стерильной воды и засыпаем 10 граммами образца нефтезагрязненной почвы. Тщательно перемешиваем в течении 5-10 минут.



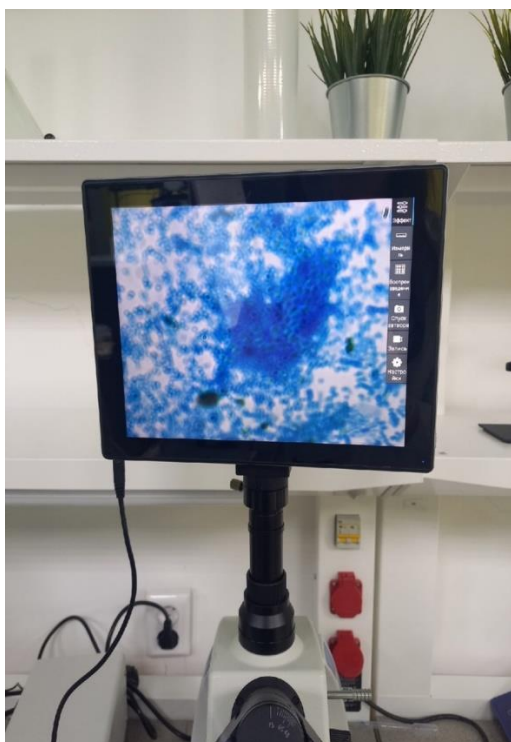
3. Изготовление условий для дальнейшего развития микроорганизмов.

Берём питательную среду и разливаем в чашки, образец нефтезагрязненной почвы капаем на среду. Затем с помощью шпателя

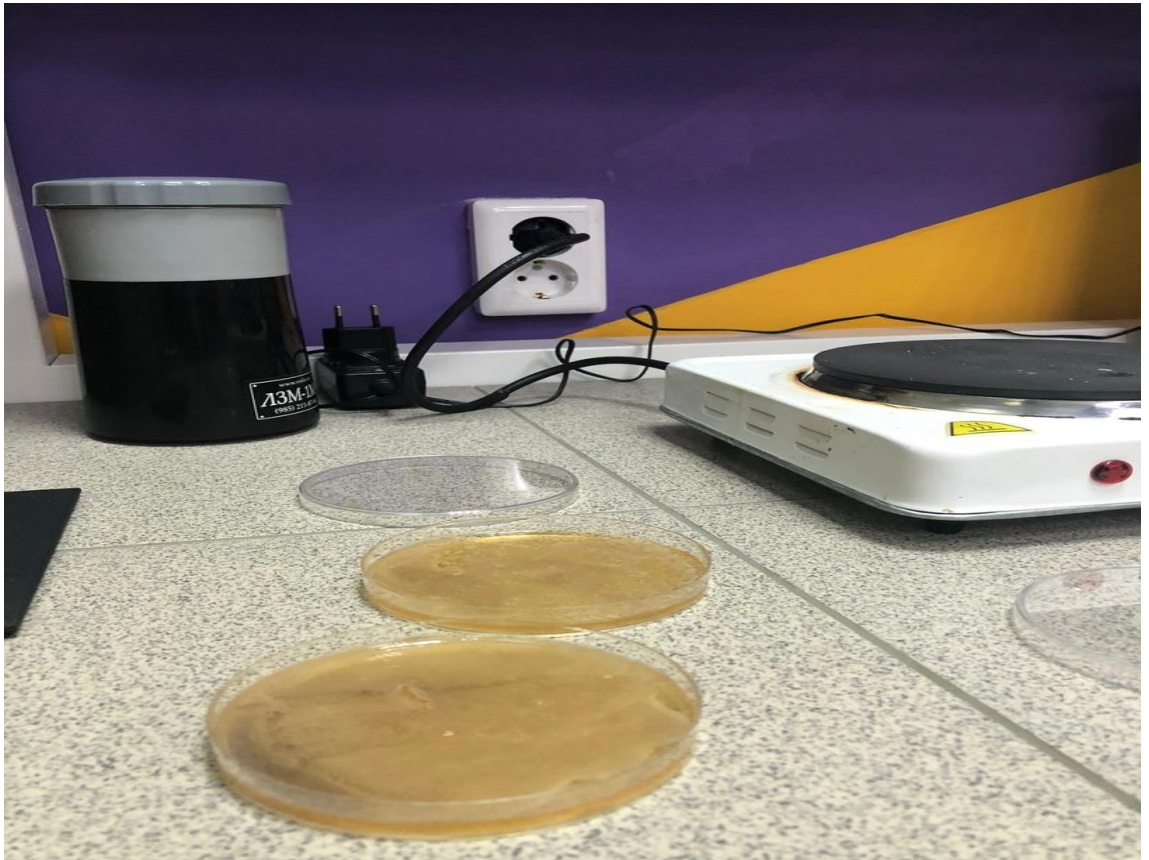
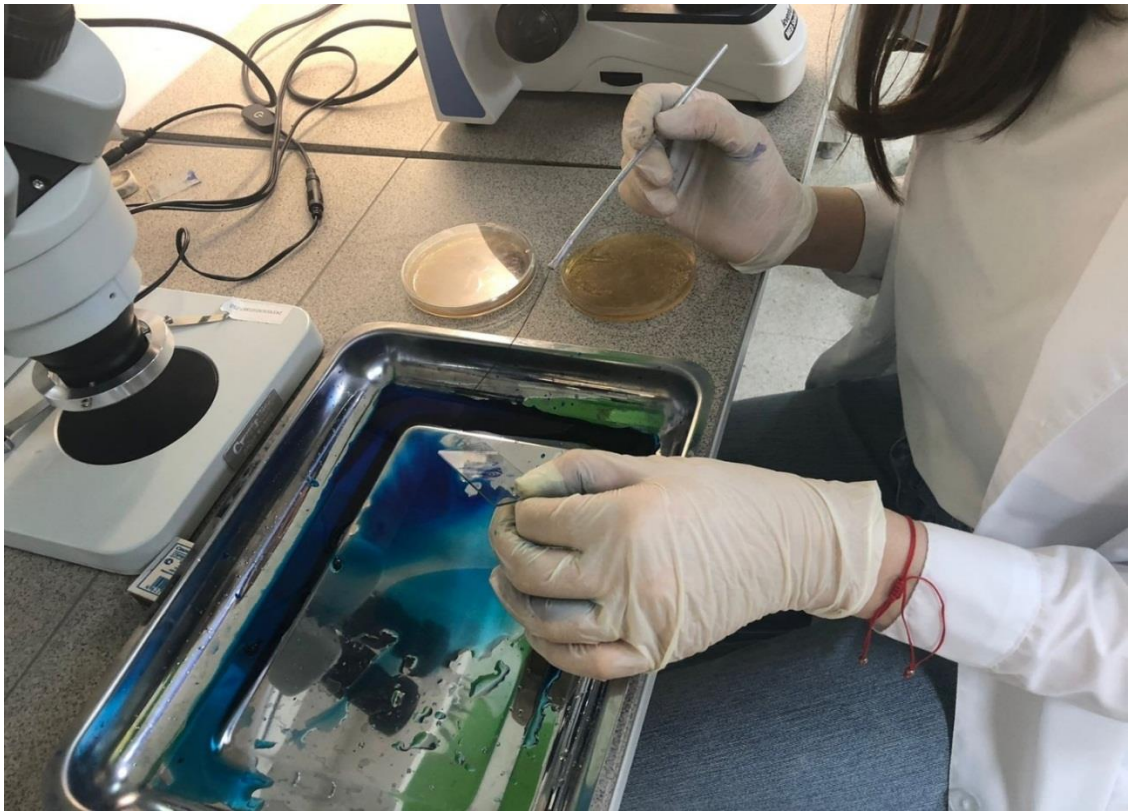
распределяем каплю образца по среде и оставляем в термостате на 2 дня при температуре 30°C.



4. Спустя 2 дня достаем чашки Петри из термостата. Смотрим выделившиеся колонии микроорганизмов в стереомикроскоп. Среди микроорганизмов выделились актиномицеты и бациллы.



5. Выделившиеся актиномицеты выделяем и окрашиваем с помощью метиленового синего красителя. Получившийся препарат рассматриваем в световом микроскопе.



3. Результаты исследования

В ходе исследования, можно выделить микроорганизмы-деструкторы нефти и нефтепродуктов, наиболее широко используются штаммы рода *Acinetobacter*.

На основе этого мы можем сделать вывод о том, что использование микроорганизмов, находящихся в почве, имеет много преимуществ. Использование данных штаммов весьма целесообразно. Основная роль *Acinetobacter*— ферментативное окисление нефтепродуктов. Преимуществом предлагаемого штаммов микроорганизмов является способность расти на питательной среде, а также высокая скорость окисления нефти и нефтепродуктов, что позволяет эффективно использовать его при биологической очистке почв, почвогрунтов, загрязненных нефтепродуктами. Следовательно, можно предложить создание препарата под названием «Bio-Via» в основу которого будут входить микроорганизмы штамма *Acinetobacter*, а также другие вспомогательные вещества. Также, в качестве питательной среды для актиномицетов можно использовать мелассу (отход производства сахара из свеклы) которая богата органическими и минеральными веществами. Она содержит 45-50% сахарозы, 0,25-2,0 - инвертного сахара, 0,2-3,0% раффинозы. Из азотистых веществ в мелассе содержатся бетаин, пирролидонкарбоновая, глутаминовая, аспарагиновая кислоты, лейцин, изолейцин, аланин, валин, из органических кислот - молочная, муравьиная, уксусная, масляная, лимонная. В малых количествах в ней содержатся кобальт, железо, свинец, бор, цинк, кремний, серебро, йод, марганец, молибден которые являются необходимыми для развития микроорганизмов.

Микроорганизмы, входящие в состав препарата будут использовать нефть и нефтепродукты в качестве единственного источника питания. С помощью данного препарата можно будет очищать почву от нефти и ее продуктов при этом при обработке почвы не будет происходить фитотоксичности почвогрунта, так как препарат не будет обладать мутагенным, канцерогенным, и пирогенным действием. При использовании данного микробиологического препарата в почве будет происходить смена доминирующих микроорганизмов, образуются гуминовые вещества, улучшится аэрация почвы, водоудерживающая способность, скорость катионного обмена. Реализация представленного способа позволит повысить эффективность обеззараживания и упростить процесс обработки почвы. Таким образом, использование штаммов *Acinetobacter* может стать очень перспективным способом очистки нефтяных загрязнений в почве.

4. Экономическая выгода предлагаемого препарата.

Предлагаемый препарат «Bio-Via» будет являться экономически выгодным, так как он полностью будет состоять из биологических компонентов, которые можно получить, не применяя особенно сложных установок и технологий. Также препарат, основанный на биологическом сырье, будет являться полностью безопасным для почвы и для дальнейшего произрастания на ней культурных растений. «Bio-Via» будет являться полезным и для улучшения плодородия почв. Поскольку при применении в почве идут экзотермические процессы, увеличивается её теплоемкость, что приводит к ускорению всхожести, плодоношения, лучшему корнеобразованию. Посчитав примерную стоимость препарата «Bio-Via» можно сказать, что он будет, стоит меньше пятиста рублей за 5 л чистого препарата.



5. Заключение

На основании изучения влияния нефтепродуктов на окружающую природную среду, можно сделать вывод о то, что нефть и нефтепродукты - наиболее распространенные загрязнители, нарушающие и угнетающие все жизненные процессы: они подавляют дыхательную активность и микробное самоочищение, изменяют естественное соотношение численности микроорганизмов, меняют направление обмена веществ, накапливаются в виде трудно окисляемых продуктов. Почва – это источник жизни на нашей планете. Именно благодаря этому компоненту, на Земле могут произрастать растения, и, следовательно, возможно существование и других наземных организмов. Она служит источником органических и минеральных веществ, необходимых растениям, именно из почвы растения добывают необходимую влагу. Преимущество биоремедиационных технологий связано с широчайшими возможностями живых систем, метаболизировать огромное число различных органических веществ. Кроме того, очень важно, что применение биоремедиационных технологий предполагает мягкое воздействие на очищаемую среду, не приводящую к существенным изменениям основных почвенных показателей. Важным также является меньшая стоимость биоремедиации. Таким образом, на основании выше приведённых материалов можно сделать вывод, что биоремедиация – это одно из перспективных направлений очистки почвы. Биоремедиация имеет ряд преимуществ, таких как возможность, проводить очистку на месте без выполнения большого объёма земляных работ, отсутствие в технологическом цикле опасных химических реагентов, низкие энергозатраты. Несомненно, что с дальнейшим развитием биологии, которая в настоящее время переживает бурный рост, эти методы будут совершенствоваться, что приведет к созданию новых биологических способов очистки от большего числа загрязнений почв и окружающей среды.

Список литературных источников

1. Алиев, С.А. Рекомендации по рекультивации нефтезагрязненных земель/С.А. Алиев, Д.В. Гвозденко, М.П. Бабаев, Д.А. Гаджиев. - Баку: Элм,1981-26 с.
2. Бочарникова, Е.Д. Влияние нефтяного загрязнения на свойства серо-бурых почв Апшерона и серых лесных почв Башкирии / Е.Д. Бочарникова. - М.: Наука, 1990 - 160 с.
3. Воробьева, Л. А. Химический анализ почв / Л.А. Воробьева [идр.] // Вопросы и ответы, 2012
4. Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем: сб. ст. – М.: Наука, 1998 – С. 222-230.
5. Грищенко, А.И. Экология. Нефть и газ. / А.И. Грищенко, Г.С. Акопова, В.М. Максимов. – М.: Наука, 1997 - 598 с.
6. Другов, Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов / Ю.С. Другов, А.А. Родин. - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2007 – 270 с.
7. Зайцева, Т.А. Микроорганизмы – деструкторы нефти. / Т.А. Зайцева, Л.В. Рудакова, М.М. Комбарова, К.С. Баранова // Научные исследования и инновации, 2010 - Т. 4 - № 4 – С. 59-63.
8. Звягинцев Д. Г. Почва и микроорганизмы. — М.: 1987.
9. Иларионов. С.А. Роль микромицетов в фитотоксичности нефтезагрязненных почв / С.А. Иларионов, А.В. Назаров, И.Г. Калачникова //Экология. – 2004 – №5. – с. 341-346.
10. Ильин, Л.А. Вредные химические вещества. Радиоактивные: Справочное издание вещества / Л.А. Ильин, В.А. Филлов; – Л.: Химия, 1990
11. Исмаилов. Н.И. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель / Н.И. Исмаилов, Ю.И. Пиковский // В сб. "Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем". - М.: Наука, 1988 - С. 222-236.
12. Логинов, О.Н. Биотехнологические методы очистки окружающей среды от техногенных загрязнений/О.Н. Логинов, Н.Н. Силищев, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова. –Уфа: Гос. изд. научно-тех. Литературы «Реактив», 2000 – 100 с.
13. Пархоменко, А. Н. Влияние загрязнения нефтепродуктами и серой на микрофлору почв аридной зоны: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.08 / Пархоменко Анна Николаевна. – Уфа, 2011 – 26 с.
14. Пиковский, углеводов в окружающей среде / Ю.И. Пиковский. - М.: изд-во МГУ, 1993 – 208 с.
15. Современная микробиология. Прокариоты: В 2-х томах.: Пер. с англ. / Под ред. Й. Ленгелера, Г. Древса, Г. Шлегеля. - М.: Мир, 2005
16. Справочник химика 21. Химия и химическая технология 2002г.
17. Шамраев. А.В. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды / А.В. Шамраев, Т.С. Шорина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009 – №. 6