

Удмуртская Республика
Муниципальное бюджетное учреждение дополнительного образования
Игринский районный дом детского творчества
Муниципальное бюджетное общеобразовательное учреждение
Игринская средняя общеобразовательная школа № 4

**Всероссийский конкурс юных исследователей окружающей среды
имени Б.В. Всесвятского (с международным участием)**

Номинация «Ландшафтная экология и почвоведение»

Исследовательская работа

**«Оценка эффективности использования тест – растений
для определения качества рекультивационных работ
на землях после загрязнения нефтепродуктами»**

Выполнила: Чиркова Мария,
учащаяся 10 а класса, обучающаяся
МБОУ ДО Игринского РДДТ

Руководитель: Чиркова Галина Николаевна,
учитель химии, педагог дополнительного об-
разования

Игра, 2023

Оглавление

Введение	3
1. Обзор источников информации	
1.1 Понятие рекультивации.....	5
1.2 Этапы рекультивации.....	5
1.3 Эффективность использования растений с целью фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами.....	6
1.4 Роль бактерии Azotobacter в формировании благоприятных условий для развития растений	
2. Методика исследований	8
Опыт 1. Изучение влияния различных концентраций нефти на всхожесть семян фацелии и клевера белого.....	8
Опыт 2. Исследование ингибирующего действия нефти на фацелию и клевер белый при повторном посеве.....	9
Опыт 3. Посев и наблюдение за ростом колоний бактерий AZOTOBACTER.....	10
3. Результаты исследований	11
Выводы	15
Заключение	16
Литература	17
Приложения	18

.

Введение

В настоящее время нефть является одним из основных загрязнителей окружающей среды. Опасность данного загрязнителя, прежде всего, связана с высокой чувствительностью к нему высших растений, притом, что они занимают ключевое положение практически во всех наземных экосистемах, определяя существование и состав остальных биологических компонентов биогеоценозов (Бигон и др., 1989; Звягинцев и др., 1992; 1993).

Разлив нефтепродуктов способен уничтожить флору и фауну, вызвать мутацию микроорганизмов, живущих в почве и в воде. Восстановление растительности на нефтезагрязненных почвах замедляется либо не представляется возможным вовсе.

Кроме того, негативное влияние нефтяного загрязнения на растения снижает эффективность их использования при фиторекультивации нефтезагрязненных почв.

Источниками этих загрязнений являются в основном предприятия нефтедобывающей, нефтеперерабатывающей, нефтехимической промышленности (Другов, 2013; Михайлова, Попова, Наквасина, 2016).

Рекультивация нефтезагрязненных земель — это первостепенная задача при ликвидации последствий разлива нефти и нефтепродуктов. Обычные рекультивационные мероприятия, практикуемые в настоящее время, - засыпка загрязненных участков грунтом, вывоз загрязненного слоя и его складирование на свалках. Однако эти меры далеко не всегда способствуют восстановлению почвенного плодородия и часто сами наносят долговременный экологический ущерб природе. При засыпке нефти замедляются процессы ее разложения. Складирование земли, загрязненной нефтью и продуктами ее распада, создает очаги вторичного загрязнения не только почвогрунтов, но и подземной и грунтовой воды.

Цель работы:

Изучить эффективность использования тест – растений для определения эффективности рекультивационных работ на землях после загрязнения нефтепродуктами

Задачи:

1. Провести исследование по влиянию нефти на всхожесть семян высших растений на примере фацелии, как растения – сидерата, клевера белого, как растения, фиксирующее азот
2. Провести оценку биоремедиации почв, загрязненных нефтепродуктами по всхожести в ней семян тест – растений
3. Провести оценку биоремедиации нефтезагрязненных почв, по росту колоний *Azotobacter*.

Актуальность исследования:

В проведении рекультивационных работ нуждается 95,9% общего количества нефтезагрязненных земель. При разливах нефтепродуктов сельхозпредприятия заведомо стараются зависить претензии к нефтедобывающим предприятиям, чтобы получить материальную выгоду. Поэтому, если будут существовать простые и достоверные возможности определения качества рекульти-

вационных работ, можно будет урегулировать споры, без проведения дорогостоящих опытов в лабораториях.

Предмет исследования:

Всхожесть семян фацелии, клевера белого на почве с разным содержанием нефти

Гипотеза исследования:

При контрольном посеве тест – растений можно определить эффективность проведенных рекультивационных работ после загрязнения нефтепродуктами без проведения сложных лабораторных анализов

1. Обзор источников информации

1.1. Понятие рекультивации

Рекультивацией почв называют комплекс мер по экологическому и экономическому восстановлению земель и водных ресурсов, плодородие которых в результате человеческой деятельности существенно снизилось. Целью проведения этих мероприятий является улучшение условий окружающей среды, восстановление продуктивности нарушенных земель и водоемов (<https://perm.omega-ekb.com/articles/kak-proisxodit-rekultivaciya-zemel-zagryaznennykh-neftyanyimi-otxodami>).

Нарушением земель принято считать процесс, происходящий при добыче полезных ископаемых, выполнении геологоразведочных, изыскательских, строительных и других работ и приводящий к нарушению почвенного покрова, гидрологического режима местности, образованию техногенного рельефа и другим качественным изменениям состояния земель.

Таким образом, рекультивированными землями называют нарушенные земли, на которых восстановлена продуктивность, народнохозяйственная ценность и улучшены условия окружающей среды.

Причины загрязнения природных вод, почвы, грунта:

1. Разливы нефти и нефтепродуктов в результате аварий трубопроводов и нефтеналивных судов
2. Сточные воды, технические воды, выбросы нефтеперегонных заводов и нефтехимических предприятий

1.2. Этапы рекультивации

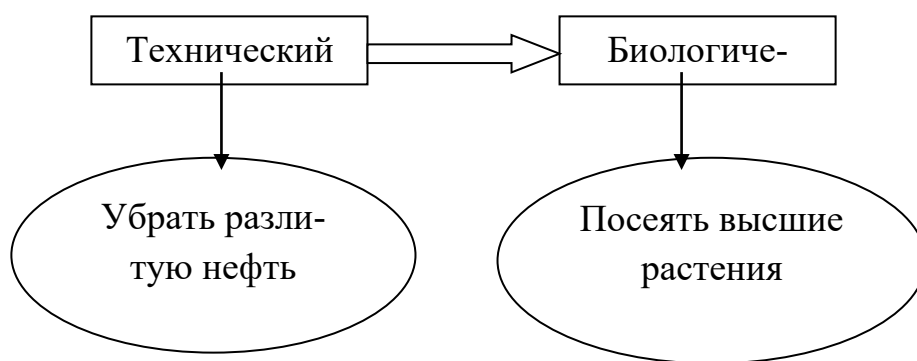


Схема 1. Этапы рекультивации почвы при разливах нефтепродуктов

Работы по рекультивации обычно имеют два основных этапа — технический и биологический. На техническом этапе проводится корректировка ландшафта, создаются гидротехнические и мелиоративные сооружения, осуществляется захоронение токсичных отходов, производится нанесение плодородного слоя почвы. В результате осуществляются образование территории. На биологическом этапе проводятся агротехнические работы, целью которых является улучшение свойств почвы.

Технический этап рекультивации включает следующие виды работ: снятие и складирование плодородного слоя почвы, планировку поверхности, транспортирование и нанесение плодородных почв на рекультивируемую поверхность, строительство осушительной и водоподводящей сети каналов, устройство противозерозионных сооружений. Технический этап рекультивации выполняют горнодобывающие предприятия.

Биологический этап рекультивации включает мероприятия по восстановлению плодородия рекультивированных земель и возобновлению флоры и фауны. Работы по данному этапу выполняют предприятия лесохозяйственного или сельскохозяйственного профиля, в постоянное пользование которых после проведения технической рекультивации поступает земельный участок.

Различают направления или виды рекультивации, характеризующиеся специфическими приемами и методами, зависящими от целевого использования рекультивируемой территории. Наибольшее распространение получили следующие направления рекультивации: сельскохозяйственное, лесохозяйственное, рыбхозхозяйственное, водохозяйственное, рекреационное, санитарно-гигиеническое и строительное.

1.3.Эффективность использования растений с целью фиторемедиации почв, загрязненных нефтепродуктами

Для снижения концентрации различных загрязнений в почве можно использовать растения. Механизмы воздействия растений на загрязнители различны. Для снижения концентрации нефтепродуктов в почве используется фитостимуляция и фитодеградация. При фитостимуляции загрязнители деградируют за счёт секреции растениями органических веществ, используемых ризосферными микроорганизмами в качестве источника энергии и углерода, а также различных вторичных метаболитов, активирующих гены, ответственные за синтез деградирующих ферментов.

Для фитостимуляции микробов-деструкторов корневой зоны применяются растения, обладающие обширной плотной корневой системой и секретирующие специфические вещества, способствующие росту микробов. В частности, используются различные травы (овсянница, плевел) из-за их обширной и плотной корневой системы. Фитодеградация основана на возможности растений, с помощью своих ферментов совместно с почвенными (ризосферными) микроорганизмами осуществлять ферментативное расщепление органических загрязняющих веществ. (Восстановление нефтезагрязнённых..., 1988; Исмилов, 1988; Середина и др., 1988; Добровольский, 2012).

1.4.Роль бактерии Azotobacter в формировании благоприятных условий для развития растений

Богатство почвы зависит от её состава, и многие ошибочно считают, что исключительно гумусом можно обогатить землю. Различные микроорганизмы и бактерии играют не малую роль в насыщении земли, а также в выработке иммунитетов против ряда заболеваний и вредителей.

Бактерия *Azotobacter* является тем самым представителем рода бактерий, что активно участвуют в насыщении полезными веществами почвы.

Они живут в почве и умеют переводить газообразный азот в растворимую форму, которую уже потом могут усваивать растения. Азотобактеры — это свободноживущие азотфиксаторы, и это означает, что они фиксируют молекулярный азот из атмосферы и без того, чтобы вступать в симбиотические отношения с растениями или с кем-то еще — у них хватает собственных возможностей для фиксации атмосферного азота, то есть для разрывания двухатомной молекулы азота и для последующего включения его отдельных атомов в состав других органических веществ.

Эти бактерии приспособились жить в самых разных условиях. Они живут и в нейтральных, и в щелочных почвах. Их находят и в экстремальных условиях почв полярных регионов, и в арктическом, и в антарктическом регионах. Они спокойно живут и в пресноводных водоёмах, и в солонатоводных болотах.

Azotobacter — это главный азотфиксатор, который известен на сегодняшний день. Эта бактерия занимается непосредственной фиксацией атмосферного азота — ионы нитратов и аммония. Эта бактерия обладает всем необходимым — ферментами, что производят непосредственную фиксацию. И именно, активный рост этих бактерий при эксперименте позволяет свидетельствовать об одних из благоприятных условий для развития растений.

2. Методика исследований

Для проведения экспериментов в лаборатории были использованы пластмассовые стаканчики. Каждый стаканчик наполняли почвой.

При изучении влияния различных концентраций нефти на развитие растений, в каждый стаканчик с почвой добавляли сырую нефть в количестве: 20, 30 и 50 мл. Добавленную в стаканчики нефть тщательно перемешивали с почвой и производят, полив водой из расчета 80% от полной влагоемкости. Повторные поливы производили через 2 – 4 дня, по мере просыхания почвы.

Семена сельскохозяйственных растений высевают по норме на площадь поверхности стакана на глубину 1 – 2 см. Фенологические наблюдения и измерения роста производили через 1-3 дня по общепринятым методикам (Бейдеман И.Н. 1974). Прирост растений определялся по высоте надземной части. Среди фенологических показателей у растений регистрировали появление всходов, первого, второго, третьего и четвертого настоящих листьев (Бейдеман И.Н. 1974).

Опыт 1. Изучение влияния различных концентраций нефти на всхожесть семян фацелии и клевера белого

В школьной лаборатории были использованы 8 образцов. Каждый образец наполнялся грунтом "Универсальный" массой 200 г. В каждый образец с грунтом добавлялась сырая нефть в объеме: 20, 30 и 50 мл. Нефть, добавленная в образцы, тщательно перемешивалась с грунтом, на поверхность положили слой снега 2см для равномерного увлажнения перед посевом. Семена клевера высеивались по 0,2 г на 1 образец на глубину 1 см, а семена фацелии на глубину 2 см. Повторные поливы производились через 2-4 дня, по мере просыхания грунта. Среди фенологических показателей у растений регистрировалось появление всходов, первого и третьего настоящих листьев. (все условия проведения эксперимента отображены в таблице 1,2)

Таблица 1

Схема посева семян фацелии

Наименование образца	Количество добавляемой нефти / концентрация	Количество посаженных семян (грамм)
Контроль	Без нефти	0,2
Фацелия 1	20 мл (8,3%)	0,2
Фацелия 2	30 мл (12%)	0,2
Фацелия 3	50 мл (18,4%)	0,2

Схема посева семян клевера белого

Наименование образца	Количество добавляемой нефти / концентрация	Количество посаженных семян (грамм)
Контроль	Без нефти	0,2
Клевер 1	20 мл (8,3%)	0,2
Клевер 2	30 мл (12%)	0,2
Клевер 3	50 мл (18,4%)	0,2

Опыт 2. Исследование ингибирующего действия нефти на фацелию и клевер белый при повторном посеве

Для опыта использовался грунт из опыта №1 после заделки в грунт растений, как «зеленого» удобрения. (условия проведения эксперимента отражены в таблице 3,4)

Таблица 3

Схема посева семян фацелии

Наименование образца	Количество добавляемой нефти / концентрация	Количество посаженных семян (грамм)
Контроль	Без нефти	0,2
Фацелия 1	20 мл (8,3%)	0,2
Фацелия 2	30 мл (12%)	0,2
Фацелия 3	50 мл (18,4%)	0,2

Таблица 4

Схема посева семян клевера белого

Наименование образца	Количество добавляемой нефти / концентрация	Количество посаженных семян (грамм)
Контроль	Без нефти	0,2
Клевер 1	20 мл (8,3%)	0,2

Клевер 2	30 мл (12%)	0,2
Клевер 3	50 мл (18,4%)	0,2

Опыт 3. Посев и наблюдение за ростом колоний бактерий AZOTOBACTER

Подготовительный этап:

- 1) Берем белый лист бумаги и обводим на нем контур чашки Петри
- 2) В контуре чашки Петри рисуем трафарет для удобства распределения почвенных комочков

Приготовление вспомогательного раствора:

- 1) В мерную колбу объемом 1 литр налить 300-400 мл воды
- 2) Высыпать в колбу с водой содержимое флаконов с NaCl, K₂SO₄, MgSO₄*7H₂O, CaCO₃
- 3) Довести объем раствора до отметки 1 литр и проконтролировать, что все соли полностью растворились

Приготовление среды Эшби (200 мл):

- 1) На весах подготавливаем навески:
 - а) 1 г CaCO₃; б) 3 г агара; в) 4 г глюкозы
- 2) В химический стакан налить 200 мл вспомогательного раствора
- 3) В стакан с раствором перенести навески CaCO₃, агара и глюкозы
- 4) Смесь в стакане перемешать до состояния однородной смеси
- 5) Смесь вскипятить в микроволновой печи до максимального растворения компонентов
- 6) Смесь охладить до 50-60С⁰ и заполнить ей чашки Петри так, чтобы смесь полностью покрывала дно (≈25 мл на одну чашку)

Подготовка почвы для анализа:

- 1) Образцы почвы после 2 эксперимента высушили
- 2) Перенести ≈3 грамма почвы в пустую чашку Петри
- 3) К почве с помощью пипетки Пастера по каплям добавлять дистиллированную воду до получения пастообразной массы
- 4) Полученную пасту тщательно перемешать с помощью зубочистки

Посев:

- 1) Из увлажненной почвы отделить 40-50 комочков диаметром 3-4 мм
- 2) Чашку Петри, заполненную застывшей средой, разместили на трафарете, совместив края чашки с контуром трафарета
- 3) В чашке Петри в узлах трафарета разместили при помощи зубочисток подготовленные комочки земли
- 4) Чашки Петри накрыли крышками и оставили на 4 дня при комнатной температуре
- 5) Из каждого образца почвы сделали 3 повторности

3. Результаты исследований

1. Изучение влияния различных концентраций нефти на развитие растений фацелии и клевера

Таблица 5

Наблюдение за развитием настоящих листьев исследуемых растений

Фаза первого листа	Фацелия контроль (без нефти)	Клевер контроль (без нефти)	Фацелия 1 (20 мл)	Клевер 1 (20 мл)	Фацелия 2 (30 мл)	Клевер 2 (30 мл)	Фацелия 3 (50 мл)	Клевер 3 (50 мл)
		2 день	5 день	3 день	7 день	5 день	8 день	18 день
Фаза третьего листа	5 день	8 день	8 день (отставание от контроля на 3 дня)	13 день (отставание от контроля на 5 дней)	13 день (отставание от контроля на 8 дней)	13 день (отставание от контроля на 5 дней)	Третий лист не образовался	

Суммарная всхожесть семян фацелии при концентрации нефти 20 мл на 200 г грунта близка к контрольному варианту без нефти. Резкое уменьшение всхожести фацелии наблюдается при концентрации 50 мл на 200 г почвы, а при такой же концентрации семена клевера вообще не проросли. По динамике развития нужно отметить, что фацелия дает больше зеленой массы за один временной промежуток.



Рисунок 1. Динамика появления первого листа при первом посеве

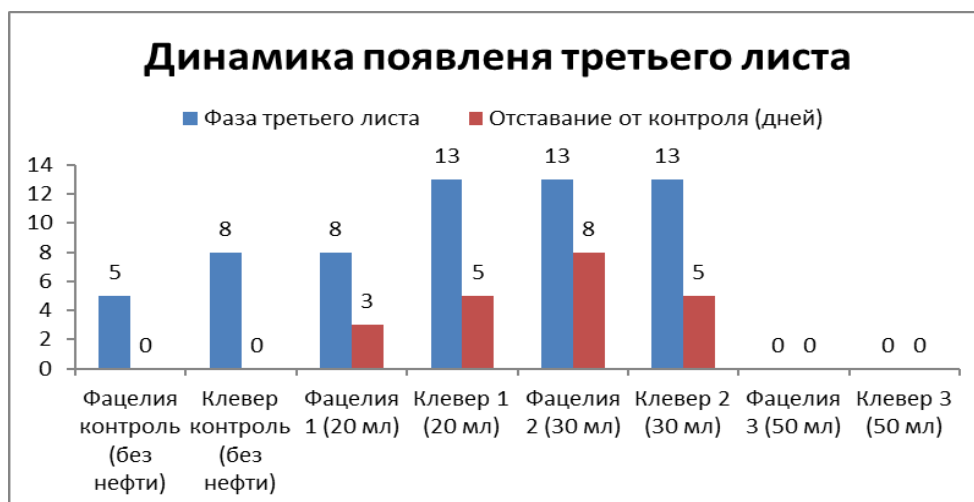


Рисунок 2. Динамика появления третьего листа при первом посеве

Проведение и результаты опыта 1 фиксировались фотографиями, которые представлены в приложении (рисунок 5 – 14).

2. Оценка развития растений фацелии и клевера при повторном посеве

Суммарная всхожесть семян и фацелии, и клевера при концентрации нефти: 20 мл на 200 г грунта близка к контрольному варианту без нефти. Всхожесть семян на образцах с содержанием нефти в количестве 30, 50 мл заметно улучшилась по сравнению с опытом 1, а при концентрации 50 мл появились даже третьи листья (результаты отображены в таблице 6 и диаграммах – рисунок 3,4)

Схема посева семян фацелии

Фаза первого листа	Фацелия контроль (без нефти)	Клевер контроль (без нефти)	Фацелия 1 (20 мл)	Клевер 1 (20 мл)	Фацелия 2 (30 мл)	Клевер 2 (30 мл)	Фацелия 3 (50 мл)	Клевер 3 (50 мл)
		3 день	4 день	5 день	6 день	7 день	9 день	9 день
Фаза третьего листа	6 день	8 день	10 день (отставание от контроля на 4 дня)	12 день (отставание от контроля на 4 дня)	11 день (отставание от контроля на 5 дней)	13 день (отставание от контроля на 5 дней)	15 день (отставание от контроля на 9 дней)	18 день (отставание от контроля на 10 дней)



Рисунок 3. Динамика появления первого листа при повторном посеве

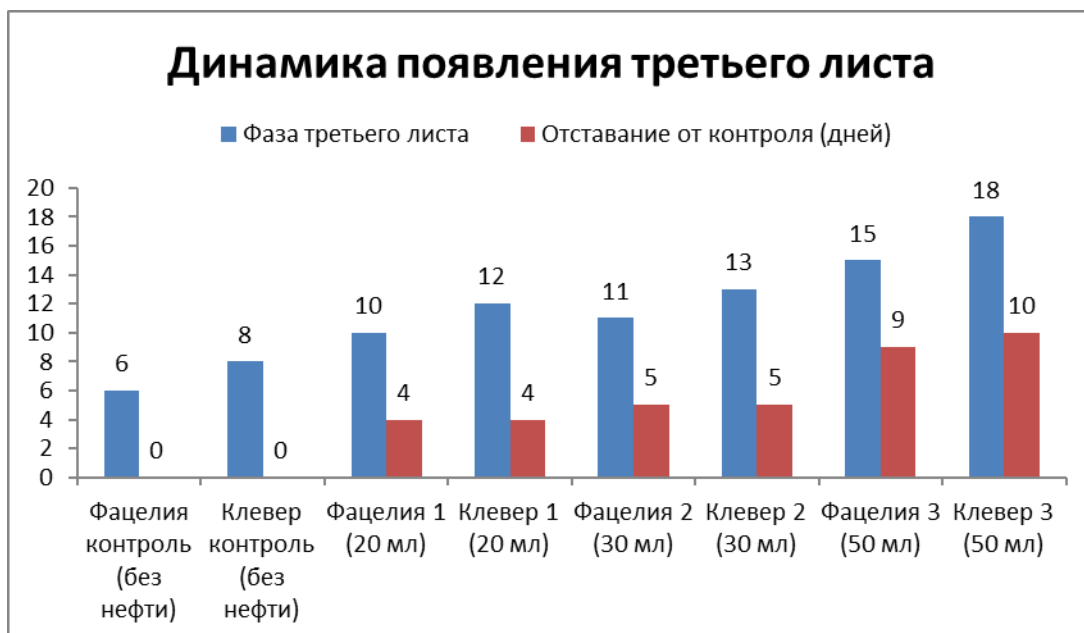


Рисунок 4. Динамика появления третьего листа при повторном посеве

Результаты опыта фиксировались фотографиями, которые представлены в приложениях (рисунок 15 – 16).

3. Рост колоний бактерий AZOTOБАСТЕР

Наблюдаемые результаты:

- 1) Через 3 дня после посева в контрольных образцах почвы вокруг комочков появились обрастания, в образцах после биоремедиации наибольшая интенсивность обрастания была в образцах с минимальной концентрацией (20 мл) нефти в эксперименте. Мы наблюдали прямую зависимость – чем больше нефти в почве, тем меньшее обрастание почвенного комочка наблюдается. Нужно отметить, что результаты более интенсивного роста колоний наблюдались в образцах почвы после выращивания фацелии.
- 2) Через 7 - 9 дней обрастания не окрасились и это позволило предположить, что это колонии *Azotobacter agilis*

Постановка опыта №3 и его результаты фиксировались фотографиями, которые представлены в приложениях (рисунок 17 – 21).

Выводы

В данной исследовательской работе объектом изучения служили семена фацелии и клевера белого. В ходе выполнения исследовательской работы выдвинутая гипотеза нашла свое подтверждение в связи, с чем я делаю выводы:

1. Существует два этапа рекультивации: технический и биологический, целесообразность которых подтверждена в работах ученых многих НИИ страны. При увеличении объёма нефти в почве всхожесть и развитие растений (фацелии и клевера белого) снижаются.

2. При повторных посевах одной и той же культуры на загрязненную почву наблюдается уменьшение ингибирующего действия нефти на развитие растений. Таким образом, токсичность почвы, загрязненной нефтью, уменьшается с каждым последующим посевом.

3. Рост колоний *Azotobacter* позволяет дополнительно оценить качество проведённых рекультивационных работ.

Заключение

По полученным данным о всхожести семян растений в нефтезагрязненной почве сделать вывод о токсичности почвы нельзя. На всхожесть семян влияет много факторов: наличие влаги, тепла, кислорода, поэтому для уточнения выводов необходимо провести опыты с изменением не только концентрации нефти, но и других параметров, например, замочить семена перед посевом, или рассмотреть развитие корневой системы, объема зеленой массы растения, интенсивность цвета зеленых частей растения.

Источники информации

1. Бейдеман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Наука, 1974. 154 с.
2. Бигон М., Харпер Дж., Таусенд К. Экология. Особи, популяции и сообщества. 2 Т. М.: Мир, 1989.
3. Добровольский, Г.В. Сохранение почв как незаменимого компонента биосферы. Функционально-экологический подход / Г.В. Добровольский, Е.Д. Никитин. – М.: Наука, 2000. – 185 с.
4. Другов, Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов: практическое руководство / Ю.С. Другов, А.А. Родин. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2007. – 270 с.
5. Середина, В.П. Нефтезагрязненные почвы: свойства и рекультивация / В.П. Середина, Т.А. Андреева, Т.П. Алексеева, Т.И. Бурмистрова, Н.Н. Терещенко. – Томск: Изд-во ТПУ, 2006. – 270.
6. Измайлов Н.М., Пиковский Ю.И. Рекультивация земель, загрязненных при добыче и транспортировке нефти и нефтепродуктов // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. М.: Наука, 1988. С.220-230.
7. Андерсон Р. К., Мукатонов А. Х., Бойко Т. Ф. Экологические последствия загрязнения почв нефтью // Экология. 1980. № 2. С.256-263.
8. Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Бабьева И.П. и др. Роль микроорганизмов в биогеоценотических функциях почв // Почвоведение. 1992. № 6. С. 63-77.
9. Звягинцев Д.Г., Добровольская Т.Г., Лысак Л.В. Растения как центры формирования бактериальных сообществ // Журнал общей биологии. 1993. Т. 54. № 2. С. 183-199.
10. Невзоров В.М. О вредном воздействии нефти на почву и растения // Изд. ТСХА. 1976. № 2. С.164-165.
11. Стеревская Л.В., Яранцева Л.Д. О влиянии на растения загрязненной почвы при бурении и разведке на нефть и газ // Растения и промышленная среда. Киев: Наук. думка, 1976. С.73-75.
12. Исмаилов, Н.М. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель // Современные проблемы биосферы: Сб. статей. – Москва: Наука, 1988. – С. 222–230.
13. Михайлова, А.А. Степень загрязнения почв нефтепродуктами как показатель воздействия автотранспорта / А.А. Михайлова, Л.Ф. Попова, Н.Е. Труфанова // Экологические проблемы человечества: материалы научно-практической конференции. – М.: 2009. - С. 56-59.
14. Как происходит рекультивация земель, загрязненных нефтяными отходами / [Электронный ресурс] // Омега: безопасная утилизация опасных отходов : [сайт]. — URL: <https://perm.omega-ekb.com/articles/kak-proisxodit-rekultivaciya-zemel-zagryaznennyx-neftyanyimi-otxodami>
15. Азотобактер: чем питается бактерия, строение и функции / [Электронный ресурс] // URL: <https://noparasites.ru/protozojnye-organizmy/azotobakter.html>



Рисунок 5. Семена фацелии



Рисунок 6. Семена клевера белого



Рисунок 7. Взвешивание необходимого количества семян для посева
(25.01.2022)



Рисунок 8,9. Добавление в образцы почв нефти в опытном количестве (25.01.2022)



Рисунок 10. Пропитанная нефтью почва



Рисунок 11. Опыт №1 Образцы через 3 дня после посева (28.01.22г)



Рисунок 12. Опыт №1 Образцы через 8 дней после посева (02.02.22г)



Рисунок13. Опыт №1 Образцы через 13 дней после посева (07.02.22г)



Рисунок 14. Опыт №1 Последний день первого посева (12.02.22г – 18 дней)



Рисунок 15. Опыт №2 повторный посев (12.02.22г)



Рисунок 16. Опыт №2 Результаты повторного посева через 2,5 недели (02.03.22г)

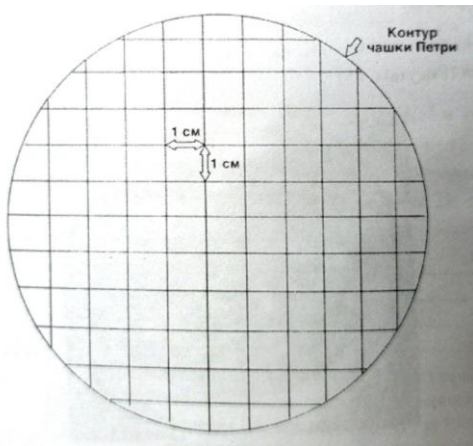


Рисунок 17. Схема разметки для чашки Петри и посев колоний

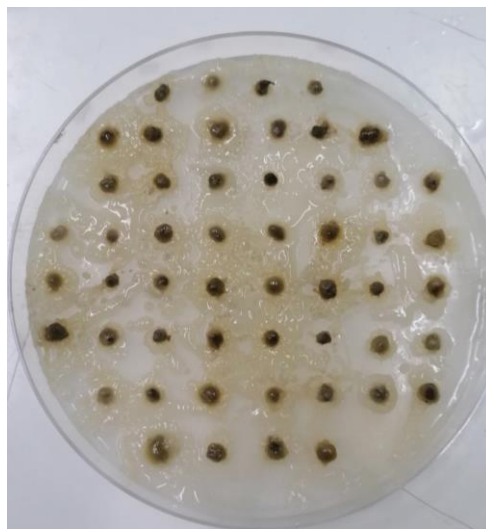


Рисунок 18. Рост колоний Azotobacter в контрольных образцах

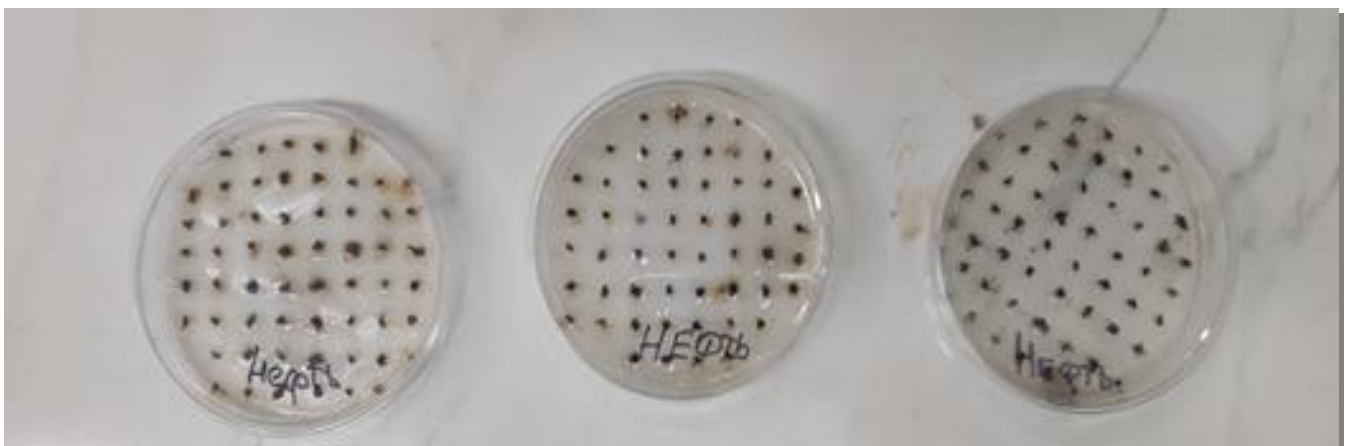


Рисунок 19. Рост колоний Azotobacter в образцах почвы с высоким содержанием нефти (50 мл) при выращивании клевера

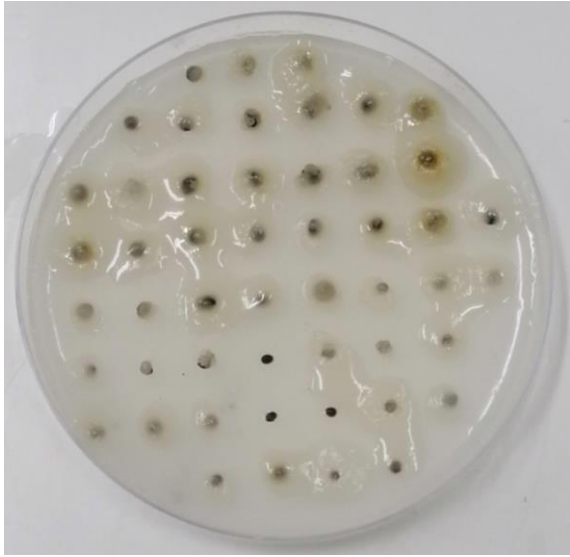


Рисунок 20. Рост колоний *Azotobacter* в образцах с содержанием нефти (20 мл) при выращивании клевера

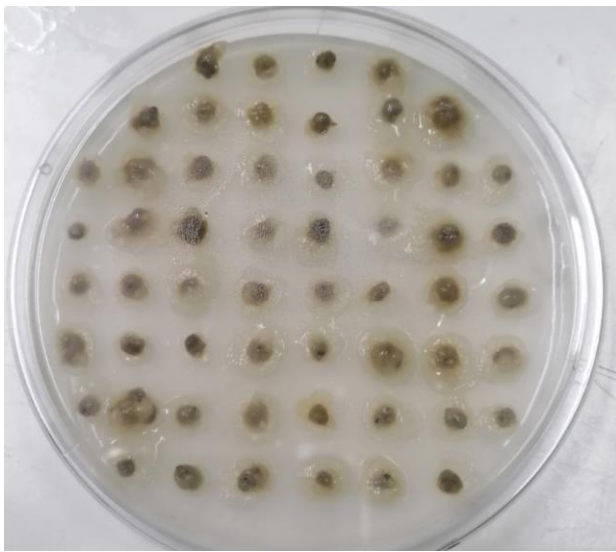


Рисунок 21. Рост колоний *Azotobacter* в образцах с содержанием нефти (20 мл) при выращивании фацелии