

Всероссийский конкурс научно-технологических проектов «Большие вызовы»

Направление: Агропромышленные и биотехнологии

## РЕМЕДИАЦИЯ ТЕХНОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Автор:

Обухова Арина Алексеевна

Россия, Мурманская область, г. Апатиты

МБОУ гимназия № 1 г. Апатиты, 11 класс

Научный руководитель:

Воробьева Лариса Евгеньевна, учитель биологии высшей квалификационной  
категории,

МБОУ гимназия № 1 г. Апатиты

Научный консультант:

Давыдов Денис Александрович, заместитель директора по научной работе,  
к. б. н. ПАБСИ КНЦ РАН

Мурманск,

2021

## РЕМЕДИАЦИЯ ТЕХНОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЦИАНОБАКТЕРИЙ

Обухова Арина Алексеевна

Мурманская область, г. Апатиты, МБОУ гимназия № 1 г. Апатиты, 11 класс

**Аннотация.** Проблема загрязнения окружающей среды газопылевыми выбросами промышленных предприятий очень актуальна для Кольского полуострова. Одним из предприятий, которое оказывает интенсивное техногенное воздействие и служит источником пылевых частиц в атмосферном воздухе города Апатиты, является ТЭЦ. Одним из способов решения этой экологической проблемы может служить ремедиация – восстановление почв с использованием цианобактерий. Цель работы – оценка биотехнологического потенциала штаммов цианобактерий для рекультивации техногенных субстратов. Методы исследования: культивирование цианобактерий на питательных средах (жидкие и агаризованные культуры) и методом почвенных культур, статистический анализ данных, сравнительный анализ полученных результатов. В ходе комплексного оценивания эффективности цианобактерий рода *Nostoc* в ремедиации техногенного субстрата со золошлакоотвала Апатитской ТЭЦ получены следующие результаты: наибольшую эффективность в ремедиации техногенного субстрата показал штамм *Nostoc* sp. KAZ. Самые низкие показатели у штамма *Nostoc* sp. 4166.

Как перспективу, мы рассматриваем проведение выращивания цианобактерий рода *Nostoc* в натурных экспериментах в естественных условиях выбранного участка шлакоотвала ТЭЦ.

**Ключевые слова:** ремедиация; шлакоотвал; взвешенные вещества; цианобактерии; *Nostoc*; субстрат.

## Введение

Проблема загрязнения окружающей среды газопылевыми выбросами промышленных предприятий очень актуальна для Кольского полуострова. По данным Доклада о состоянии и об охране окружающей среды Мурманской области за 2020 год первые ранговые места по удельному весу проб атмосферного воздуха, не соответствующих гигиеническим нормативам, занимают города Апатиты, Кировск и Мончегорск. В сравнении с 2019 годом отмечается увеличение доли проб с превышением ПДКм.р. (максимально разовой предельно-допустимой концентрацией) по взвешенным веществам: г. Апатиты - 0,30, в сравнении, г. Кировск – 0,19, г. Мончегорск – 0,17. Апатиты в этой статистике занимает лидирующие позиции, имеет 1 ранг за 2020 год. Среднемесячные концентрации взвешенных веществ повышались до 1,4 ПДК. Наибольшая повторяемость превышений за 2020 год отмечалась в г. Апатиты и составляла 9,7% [1]. Одним из предприятий, которое оказывает интенсивное техногенное воздействие и служит источником пылевых частиц в атмосферном воздухе города Апатиты, является ТЭЦ - крупнейшая тепловая станция (теплоэлектроцентраль) Мурманской области.

Поэтому важной задачей является возможность минимизировать последствия пыления техногенных отвалов Апатитской ТЭЦ. Одним из способов решения этой экологической проблемы может служить ремедиация и рекультивация золошлакоотвалов с использованием цианобактерий. Формирование растительного покрова на техногенных субстратах является одним из основных способов закрепления мелкодисперсных частиц, что предотвращает пыление отвалов. Естественная сукцессия растительности начинается с заселения пионерных групп организмов, в частности цианобактерий, которые имеют высокий потенциал к колонизации свободных субстратов [2].

**Объект исследования** – цианобактерии рода *Nostoc*. **Предмет исследования** – способность цианобактерий к ремедиации техногенного

субстрата. **Цель** – оценка биотехнологического потенциала штаммов цианобактерий для ремедиации техногенных субстратов.

**Задачи:**

- провести культивирование и посев 10 штаммов цианобактерий рода *Nostoc*;
- провести выращивание 10 штаммов цианобактерий рода *Nostoc* на техногенном субстрате;
- провести выращивание 10 штаммов цианобактерий рода *Nostoc* на золошлаке Апатитской ТЭЦ в лабораторных условиях;
- оценить потенциал штаммов к рекультивации.

**Методы исследования:**

- культивирование цианобактерий на питательных средах (жидкие и агаризованные культуры) и методом почвенных культур,
- статистический анализ данных,
- сравнительный анализ полученных результатов.

## **1 Теоретическая часть**

### **1.1 Источник загрязнения**

Теплоснабжение города Апатиты осуществляется крупнейшей в регионе теплоэлектростанцией (ТЭЦ), которая работает на угле. Апатитская ТЭЦ запущена в 1959 году и включает 8 энергетических (паровых) котлов и 5 турбоагрегатов. В год на ней расходуется около 303 тысяч тонн угля [3]. После сгорания топлива остаются золошлаковые отходы – смесь негорючих веществ, которые необходимо складировать. В результате в окрестностях города формируются золошлакоотвалы различного гранулометрического состава. Мелкие фракции легко переносятся ветром, возникает эффект пыления. Заращение техногенных отвалов имеет важное значение, так как свежие складированные отходы производства оказывают негативное воздействие на окружающую среду прилегающих территорий и здоровье населения [4]. Отвалы ТЭЦ складированы на равнине в предгорьях Хибин в долине реки Белая (см. Приложение 1).

### **1.2 Метод решения проблемы**

Одним из наиболее эффективных методов закрепления мелкодисперсных субстратов является биоремедиация – восстановление растительного покрова [5, 6]. Естественный растительный покров, постепенно формирующийся на техногенных субстратах, закрепляет частички золошлаков и служит необходимым условием формирования почв. В климатических условиях Мурманской области естественное восстановление растительности идет крайне медленно [6].

Использование фотосинтезирующих микроорганизмов – цианобактерий как предпочтительным биоремедиационным агентом - определяется их независимостью от источников углерода, а у азотфиксирующих штаммов – и от азота. В частности, показано, что цианобактериальные биоплёнки, выделенные из техногенных экосистем, при внесении в комплексе с минеральными

удобрениями в нефтезагрязнённые почвы активизируют процессы деградации нефти [7].

Способность цианобактерий к быстрому формированию обрастаний на оголенных субстратах при отсутствии конкуренции, адаптивность к широкому спектру условий позволяет рассматривать их как перспективные объекты для ремедиации отвалов [8].

### 1.3 Характеристика рода *Nostoc*

Цианобактерии рода *Nostoc* семейства ностоковых (Nostocaceae) являются гетероцисными представителями, способными фиксировать атмосферный азот, что способствует заселению экосистем с низкими концентрациями доступных соединений азота в почве. Виды этого рода широко распространены в почвах, где могут образовывать макроскопические колонии, состоящие из изогнутых нитей – однорядных трихомов. Размножение осуществляется фрагментацией трихомов, дезинтеграцией колоний, формированием гормогониев и акинетами [9]. В Мурманской области выявлено 15 видов рода *Nostoc* [10]. По сравнению с другими цианобактериями, род *Nostoc* имеет важные экологические особенности. Во многом их успех в суровых условиях окружающей среды связан с их способностью выживать в обезвоженной форме в течение длительного времени, а затем восстанавливать водный баланс, быстро возобновляя свой метаболизм. *Nostoc* также выдерживает повторяющиеся циклы замораживания и оттаивания и действие ультрафиолетовых лучей. В результате он образует основной компонент так называемой «экстремальной» среды наземных местообитаний в Арктике и Антарктике [11].

## 2. Практическая часть

### ОЦЕНКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ШТАММОВ ЦИАНОБАКТЕРИЙ РОДА *NOSTOC* ДЛЯ РЕМЕДИАЦИИ ТЕХНОГЕННЫХ СУБСТРАТОВ

#### 2.1 Материал и методы исследования

Исследование ремедиационных свойств цианобактерий рода *Nostoc* проводилось с мая по сентябрь 2021 года в лаборатории флоры и растительных ресурсов Полярно-альпийского ботанического сада-института им. Н. А. Аврорина Кольского научного центра РАН (ПАБСИ) и лаборатории экологии микроорганизмов Института проблем промышленной экологии Кольского научного центра РАН. В качестве объектов были выбраны 10 штаммов рода *Nostoc*, взятые из коллекции цианопрокариот ПАБСИ, местами происхождения которых являются Мурманская область, Антарктида, Камчатка, Забайкальский край, Шпицберген. В качестве основных методов исследования применялось культивирование, посев и выращивание штаммов (см. Приложение 2).

В первую очередь необходимо было размножить имеющиеся штаммы, увеличить количество биомассы каждого вида. Для этого проводилось культивирование на жидкой питательной среде Z8. В стерильных условиях с использованием ламинар-бокса фрагменты каждого штамма помещали в пробирки с заранее приготовленным и автоклавированным раствором (Приложение 2, фото. 3). Соотношение компонентов раствора соответствовало рецепту приготовления питательной среды для используемых нами цианобактерий. Культивирование осуществлялось на световых установках, оснащенных фитолампами в течение полутора месяцев в режиме 16 ч освещения и 8 ч темноты.

Для оценки потенциала штаммов к рекультивации золошламов ТЭЦ был проведен лабораторный эксперимент. В стерильные пластиковые контейнеры (7 см x 10.2 см x 4 см) помещался предварительно автоклавированный золошлам

с отвала ТЭЦ. Стерилизация субстрата исключала его зарастание природной микрофлорой.

По истечении срока наращивания биомассы, мы высевали штаммы на подушку техногенного субстрата толщиной 1 см. Было получено 17 контейнеров.

Для моделирования естественных условий среды, откуда был взят субстрат, контейнеры с растущими колониями установили на подоконник в условия естественного освещения (Приложение 2, фото 4, 5). Характерный для местности режим выпадения осадков был обеспечен с помощью частоты и обильности полива. Для определения необходимого объема воды, были проведены вычисления. Мы воспользовались данными об осадках в г. Апатиты за период с июля по сентябрь 2020 года из архива метеостанции 222130и ул. Жемчужная, 24 в Апатитах, которые были взяты с сайта «[gr5.ru](http://gr5.ru)». В файле содержалась информация об объемах выпавших осадков в миллиметрах ртутного столба. Зная, что один миллиметр осадков (1 мм) равен одному литру воды, выпавшей на поверхность площадью один квадратный метр (1 л/м<sup>2</sup>), мы совершили пересчет объема сначала на один квадратный сантиметр (1 см<sup>2</sup>), а затем на площадь используемых контейнеров. Таким образом был создан график полива колоний. Высейнные штаммы выращивались в течении двух месяцев (13.07.2021 – 13.09.2021).

Полученный результат был зафиксирован и проанализирован посредством фотосъемки и работы в программе «Adobe Photoshop 2021». Чтобы получить исчисляемые результаты о проведенной работе, были сделаны фотографии каждого образца. Затем, используя программу «Adobe Photoshop 2021», проведен расчет площади проективного покрытия зарастаний цианобактериями поверхностного слоя: области зарастаний выделялись, в результате чего автоматически рассчитывалось количество пикселей на выбранном участке; определялось число пикселей, занимающих 1 мм поверхности, что позволяло перевести значение площади из пикселей в



квадратные миллиметры. Площадь проективного покрытия зарастаний цианобактериями соотносилась с общей проективной площадью поверхностного слоя, и получался процент проективного покрытия относительно общей площади контейнера. Обладая численной информацией о колониях и доступных к заселению поверхностях, можно было провести сравнение штаммов по эффективности. Оценка велась по двум критериям: площадь, занимаемая колониями, и, вытекающее из первого, доля проективного покрытия субстрата по сравнению с площадью поверхности контейнера.

## 2.2 Результаты исследований

По истечении 60-ти дней выращивания, колонии успели увеличить площадь покрываемой поверхности (см. Приложение 3). В ходе комплексного оценивания эффективности цианобактерий рода *Nostoc* в ремедиации техногенного субстрата со шлакоотвала Апатитской ТЭЦ получены следующие результаты: сведения о наиболее значительной площади, занимаемой колониями штаммов, и доле покрытия субстрата по сравнению с площадью поверхности контейнера. Данные исследования представлены в таблице «Общая таблица по результатам исследования» (см. Приложение 4)

По результатам данной таблицы следует, что наиболее продуктивным является штамм *Nostoc* sp. KAZ. Самые низкие показатели у штамма *Nostoc* sp. 4166. Из диаграммы 1 (см. Приложение 5) можно сделать вывод, что наибольшая площадь выросших колоний отмечается у штамма *Nostoc* sp. KAZ (7743,8 мм<sup>2</sup>), что более чем в 166 раз превышает площадь самого неэффективного штамма - *Nostoc* sp. 4166 (46,4 мм<sup>2</sup>). Вторым по площади колонии оказался штамм *Nostoc* sp. 610040: его площадь составила 5082,0 мм<sup>2</sup>. За ним следует *Nostoc* sp. КК-12 – 3906,8 мм<sup>2</sup>. На диаграмме 2 (см. Приложение 6) видно, что наибольший процент поверхности покрыл штамм *Nostoc* sp. KAZ - 96,9%. Вторым по степени покрытия оказался штамм *Nostoc* sp. 610040 - 62,9%. За ним следует *Nostoc* sp. КК-12 – 48,9%. Самые низкие показатели у штамма *Nostoc* sp. 4166 – 0,6%.

## Заключение

Для исследования ремедиационных свойств цианобактерий в лаборатории флоры и растительных ресурсов ПАБСИ были успешно культивированы и выращены 10 штаммов штаммов рода *Nostoc*.

В ходе комплексной оценки эффективности цианобактерий рода *Nostoc* для ремедиации техногенного субстрата со шлакоотвала Апатитской ТЭЦ получены следующие результаты:

Наибольшая площадь выросших колоний отмечается у штамма *Nostoc* sp. KAZ (7743,8 мм<sup>2</sup>), что более чем в 166 раз превышает площадь самого неэффективного штамма - *Nostoc* sp. 4166 (46,4 мм<sup>2</sup>). Вторым по площади колонии оказался штамм *Nostoc* sp. 610040: его площадь составила 5082,0 мм<sup>2</sup>.

Набольший процент поверхности покрыл штамм *Nostoc* sp. KAZ - 96,9%. Вторым по степени покрытия оказался штамм *Nostoc* sp. 610040 - 62,9%. За ним следует *Nostoc* sp. КК-12 – 48,9%. Самые низкие показатели у штамма *Nostoc* sp. 4166 – 0,6%.

Таким образом, наибольшим потенциалом к рекультивации обладает штамм *Nostoc* sp. KAZ. Самые низкие показатели у штамма *Nostoc* sp. 4166.

Как перспективу, мы рассматриваем проведение натурных экспериментов по заселению штаммами *Nostoc* участка шлакоотвала ТЭЦ. В таком случае мы можем быть точно уверены в том, что все факторы, влияющие на рост штаммов, будут соответствовать фактическим, присущим конкретной местности. Анализ результатов исследования позволит установить наиболее эффективные штаммы для ремедиации техногенного субстрата.

## Список литературы

1. Доклад о состоянии и об охране окружающей среды Мурманской области в 2020 году. -Мурманск, 2020. <https://gov-murman.ru/region/environmentstate/>
2. Голлербах М.М., Штина Э.А. Почвенные водоросли. Л.: Наука, 1969. 228 с.
3. Комплексный инвестиционный проект модернизация системы теплоснабжения Мурманской области на 2015–2030 годы / ФГБУ «РЭА» Минэнерго России. Государственный контракт от 01 декабря 2014 г. № 20.
4. Делицын Л. М., Ежова Н. Н., Власов А. С., Сударева С. В. Золоотвалы твердотопливных тепловых электростанций как угроза экологической безопасности // Экология промышленного производства. 2012. № 4. С. 15–26
5. Евдокимова Г. А., Переверзев В. Н., Зенкова И. В., Корнейкова М. В. [и др.]. Эволюция техногенных ландшафтов (на примере отходов апатитовой промышленности). Апатиты: КНЦ РАН, 2010. 146 с.
6. Иванова Л. А., Костина В. А., Кременецкая М. В., Иноземцева Е. С. Ускоренное формирование противозрозионных травостоев на техногенно-нарушенных территориях: Заполярье // Вестник МГТУ, 2010. Т. 13, № 4/2. С. 977–983.
7. Сопрунова О.Б. Функционирование цианобактериальных сообществ в условиях техногенных экосистем // Вестник МГУ. 2006. Сер. 16. № 2. С. 24–29.
8. Давыдов Д. А., Редькина В. В. Водоросли и цианопрокариоты на участках самозарастания золошлакоотвалов ТЭЦ города Апатиты (Мурманская область) // Труды Карельского научного центра РАН, 2021. № 1. С. 51–68.
9. Большая российская энциклопедия <https://bigenc.ru/biology/text/2672345>
10. <http://kpabg.ru/cyanopro/>
11. Носток. <https://ru.frwiki.wiki/wiki/Nostoc>

## ПРИЛОЖЕНИЯ

### Приложение 1

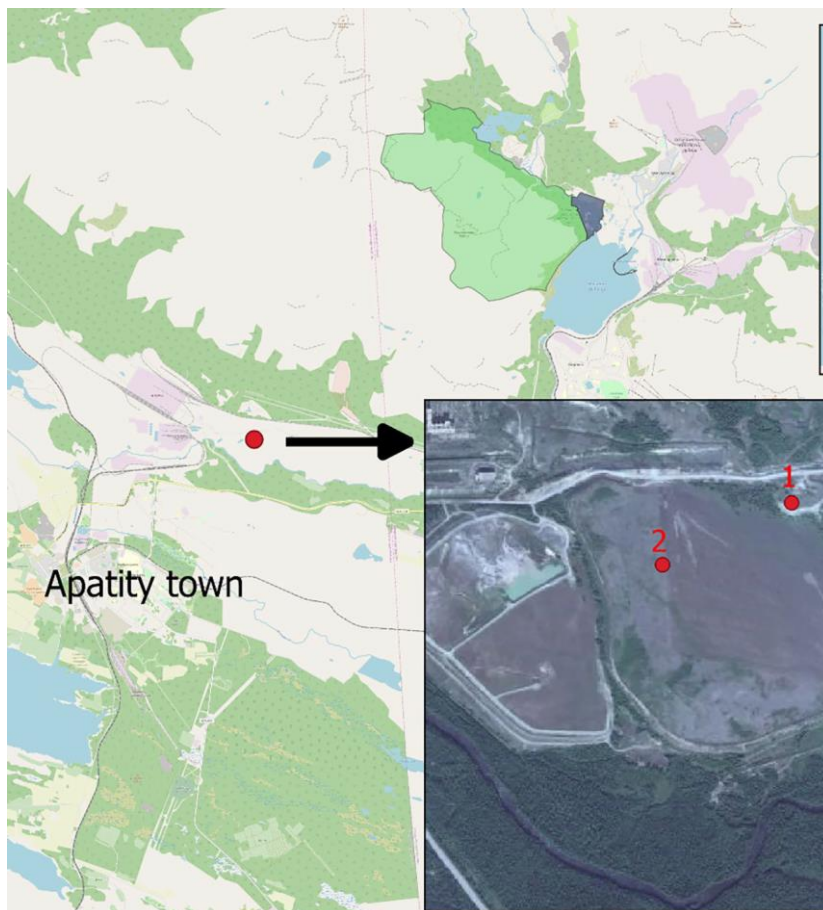


Рисунок 1. Схема расположения отвалов Апатитской ТЭЦ: 1 – отвал новообразованных отходов за 2020 год; 2 – законсервированный отвал (заполнение закончено в 1990 году)



Иллюстрация 2.1, 2.2

Приготовление раствора питательной среды в лаборатории флоры и растительных ресурсов Полярно-альпийского ботанического сада-института им. Н. А. Аврорина Кольского научного центра РАН. Подготовка к культивированию



Иллюстрация 2.3

Высадка цианобактерий в питательную среду. Подготовка к культивированию






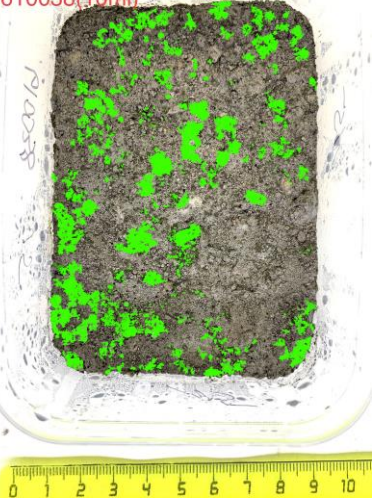
Иллюстрации 2.4, 2.5




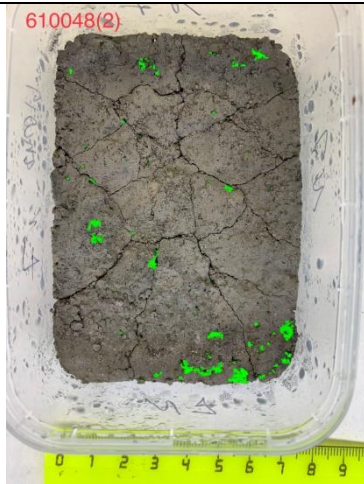

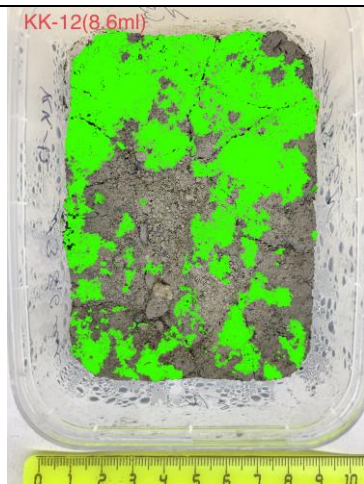
Контейнеры с растущими штаммами рода *Nostoc*




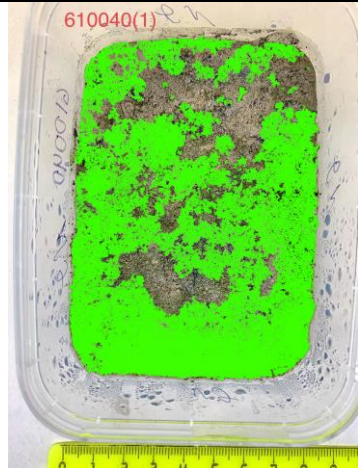



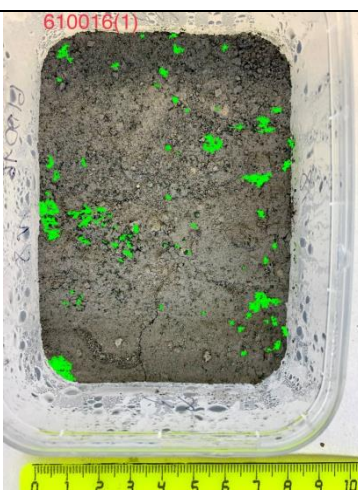
Таблица 2.

Фотографии колоний штаммов *Nostoc* (по результатам исследований)

Необработанное фото	Фото с выделенной зелёным цветом площадью проективного покрытия обрастаний	Штамм
<p>610032(8.6ml)</p> 	<p>610032(8.6ml)</p> 	<p><i>Nostoc</i> cf. <i>paludosum</i> 610032</p>
<p>610038(10ml)</p> 	<p>610038(10ml)</p> 	<p><i>Nostoc</i> sp. 610038</p>

		<p><i>Nostoc</i> sp. 4166</p>
		<p><i>Nostoc</i> sp. 610048</p>
		<p><i>Nostoc</i> sp. KK-12</p>



		<i>Nostoc</i> sp. 610040
		<i>Nostoc</i> sp. KAZ
		<i>Nostoc muscorum</i> 610016


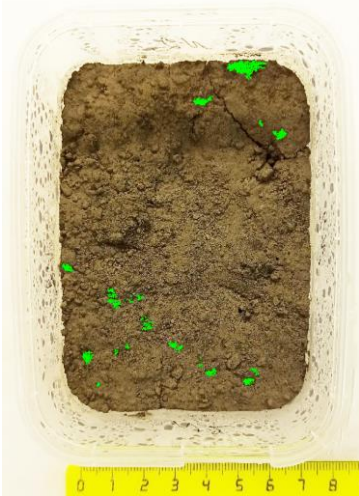


		<p><i>Nostoc</i> cf. commune 610009</p>
		<p><i>Nostoc</i> cf. commune 610013</p>

Таблица 1.

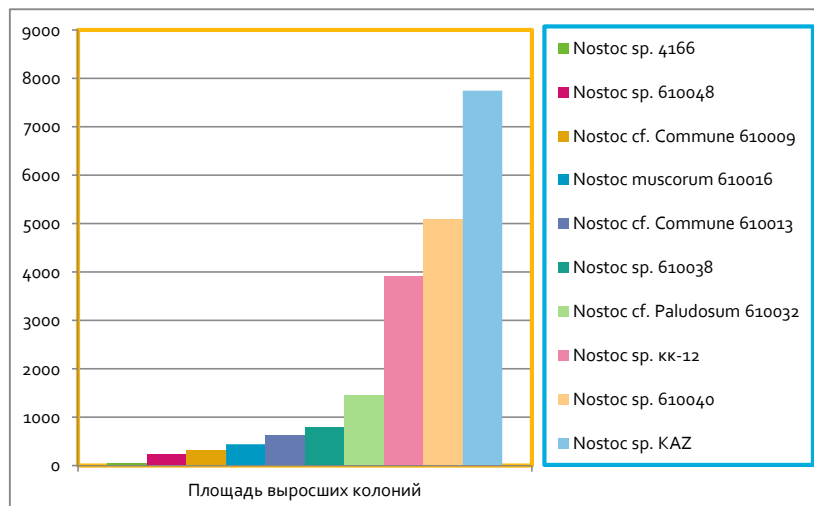
## Общая таблица по результатам исследования

Штамм	Название	Местонахождение	Площадь колонии, мм <sup>2</sup>	Проективное покрытие относительно общей площади контейнера (%)
310032	Nostoc cf. paludosum	Долина реки Мимер, Шпицберген	1446,2	18,4
610038	Nostoc sp.	Почва г. Апатиты	794,35	9,8
4166	Nostoc sp.	Отвал ТЭЦ, Апатиты	46,4	0,6
610948	Nostoc sp.	Забайкальский край	232,2	3,0
610016	Nostoc muscorum	Мурманская область. Хр. Сальные тундры, склон г. Вуим	441,1	5,3
КК-12	Nostoc sp.	Камчатка	3906,8	48,9
610040	Nostoc sp.	Почва г. Апатиты	5082,0	62,9

KAZ	Nostoc sp.	Кандалакша, Алюминиевый завод	7743,8	96,9
610013	Nostoc cf. commune	Оазис Ширмахера, Антарктида	626,6	5,9
61009	Nostoc cf. commune	Оазис Ширмахера, Антарктида	310	3,3

## Иллюстрация 5.1

## Площадь проективного покрытия колоний



## Иллюстрация 6.1

Площадь проективного покрытия обрастаний относительно общей площади  
контейнера (%)

