

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

**БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

**ФАКУЛЬТЕТ БИОЛОГИЧЕСКИЙ**

**Кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений**

**МАКОВИЦКАЯ Мария Аркадьевна**

**ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ ВОДНЫХ РАСТВОРОВ ПОЛЛЮТАНТОВ  
НА ОСНОВЕ БИОТЕСТИРОВАНИЯ**

Магистерская диссертация

специальность 1-31 80 01 «Биология»

Научный руководитель  
Смолич Игорь Иванович  
кандидат биологических наук,  
доцент

Допущена к защите

«\_\_» \_\_\_\_\_ 2015 г.

Зав. кафедрой клеточной биологии и биоинженерии растений

\_\_\_\_\_ В. В. Демидчик

доктор биологических наук, доцент

Минск, 2015

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                                           |                                        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|
| ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....                                                                                                        | 2                                      |
| ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....                                                                                                          | 3                                      |
| ВВЕДЕНИЕ.....                                                                                                                             | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 1.1 Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование. Характеристика электроальгологического способа контроля..... | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 1.2 Биоэлектrogenез у растений.....                                                                                                       | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 1.2.1 Электрические явления у растений.....                                                                                               | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 1.2.2 Электрические характеристики структурных элементов растительной клетки в покое.....                                                 | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 1.2.3 Биоэлектрический потенциал интернодальных клеток <i>Nitella</i> .....                                                               | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 1.3. Микроорганизмы-деструкторы нефти...                                                                                                  | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ ...                                                                                                | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.1 Описание тест - объекта и способа его выращивания..                                                                                   | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.2 Метод внеклеточного отведения. Регистрация тест-параметров.....                                                                       | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.3 Режимы и схемы тестирования.....                                                                                                      | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.4 Порядок проведения испытаний.....                                                                                                     | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.5 Визуализация результатов в электрофизиологическом эксперименте.....                                                                   | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.6 Критерии оценки загрязнения водных образцов .....                                                                                     | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.7 Статистическая обработка данных.....                                                                                                  | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 2.8 Характеристика микробиологических образцов.....                                                                                       | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ...                                                                                       | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 3.1 Модификация методики электроальгологического тестирования с целью оценки токсичности продуктов биodeградации нефти .....              | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 3.2 Влияние нефти на электрофизиологические параметры плазматической мембраны клеток водоросли <i>Nitella flexilis</i> ..                 | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |
| 3.3 Исследование эффективности процесса биodeградации нефти бактериями-деструкторами .....                                                | <b>Ошибка! Закладка не определена.</b> |

3.4 Оценка эффективности процесса биodeградации нефти консорциумом бактерий-деструкторов (AL18, 6-3, 15-3A) иммобилизованных торфом **Ошибка! Закладка не определена.**

3.5 Оценка эффективности процесса биodeградации нефти консорциумом бактерий-деструкторов (FD9, FD3, 8A-3A).. **Ошибка! Закладка не определена.**

3.6 Оценка эффективности функционирования природных микроорганизмов-деструкторов нефти по отношению к гексадекану.....**Ошибка! Закладка не определена.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ..... **Ошибка! Закладка не определена.**

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....**Ошибка! Закладка не определена.**

## **ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

РЭП (Е) – разница электрических потенциалов

РПП – разница электрических потенциалов в покое

ПП – потенциал покоя

ПДБ – среда для культивирования бактерий

МЭ – микроэлектрод

мВ – милливольт

М9 – среда для культивирования бактерий

кОм – килоом

ИПВ – искусственная прудовая вода

R – сопротивление

pH – мера активности ионов водорода в растворе, количественно выражающая его кислотность

NМ – среда для культивирования водорослей

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Магистерская работа: 60 с., 14 рис., 9 табл., 42 источников

*NITELLA FLEXILIS*, БИОТЕСТИРОВАНИЕ, МЕТОД ВНЕКЛЕТОЧНОГО ОТВЕДЕНИЯ, РАЗНОСТЬ ЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ, СОПРОТИВЛЕНИЕ МЕМБРАНЫ, БАКТЕРИИ-ДЕСТРУКТОРЫ НЕФТИ, НЕФТЬ И НЕФТЕПРОДУКТЫ, ПРОДУКТЫ МЕТАБОЛИЗМА БАКТЕРИЙ, ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ, ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЕ ЭЛЕКТРОДЫ

Объект исследования – культура харовых водорослей *Nitella flexilis* (L.).

Цель работы – на основе биотестирования оценить токсичность водных образцов, загрязненных нефтью и нефтепродуктами, до и после их обработки микроорганизмами-деструкторами нефти.

Метод исследования: процедура регистрации электрофизиологических параметров клеток *Nitella flexilis* проводилась с использованием метода внеклеточного отведения.

В результате исследования было установлено:

– Образцы с нефтью на протяжении всего периода наблюдения оказывали негативное воздействие на клетки водоросли *Nitella flexilis*, что проявлялось в сдвигах электрического потенциала мембраны.

– Штаммы бактерий AL18, 6-3 и FD9 на протяжении всего периода наблюдений, не оказывали токсичного действия на клетки водоросли. Образцы, содержащие нефть и бактерии штамма 8А-3А (на 1 и 14 сутки) и бактерии штамма 15-3А в день закладки эксперимента (0 сутки), а так же на 1, 7 и 21 сутки, оказывали негативное воздействие на клетки водоросли. Такой эффект мог быть обусловлен низкой биodeградационной способностью и (или) накоплением токсичных продуктов метаболизма.

– Исследование образцов, представленных консорциумом микроорганизмов иммобилизованных торфом, показало, что консорциум бактерий (штаммы AL18, 6-3 и 15-3А) является эффективным деструктором нефти. Применение торфа в водной среде для иммобилизации микробиологических образцов не приводит к улучшению биodeградации.

– Образец, содержащий гексадекан (без бактерий-деструкторов), вызывал сильные сдвиги разности электрического потенциала плазмалеммы клеток водоросли. Образец с гексадеканом и штаммом AL18 на 0, 1 и 7 сутки показал возврат регистрируемых параметров клетки к значениям контроля.

Практическая значимость работы. Полученные результаты позволяют разработать систему отбора эффективных штаммов микроорганизмов, не образующих в процессе деградации нефти токсичных для растительных организмов продуктов метаболизма.

## АГУЛЬНАЯ ХАРАКТАРЫСТЫКА РАБОТЫ

Магістарская работа: 60 с., 14 мал., 9 табл., 42 крыніц

*NITELLA FLEXILIS*, БІЯТЭСЦІРАВАННЕ, МЕТАД ПАЗАКЛЕТКАВАГА АДВЕДЗЕННЯ, РОЗНАСЦЬ ЭЛЕКТРЫЧНЫХ ПАТЭНЦЫЯЛАЎ, СУПРАЦІЎЛЕННЕ МЕМБРАН, БАКТЭРЫЙ-ДЭСТРУКТАРЫ НАФТЫ, НАФТА І НАФТАПРАДУКТЫ, ПРАДУКТЫ МЕТАБАЛІЗМА БАКТЭРЫЙ, АЦЭНКА ТАКСІЧНАСЦІ, ВЫМЯРАЛЬНЫЯ ЭЛЕКТРОДЫ

Аб'ект даследавання - культура харавых водарасцей *Nitella flexilis* (L.).

Мэта работы - на аснове біятэсціравання ацаніць таксічнасць водных абразцоў, забруджаных нафтай і нафтапрадуктамі, да і пасля іх апрацоўкі мікраарганізмамі-дэструктарамі нафты.

Метад даследавання: працэдура рэгістрацыі электрафізіялагічных параметраў клетак *Nitella flexilis* праводзілася з выкарыстаннем метаду пазаклеткавага адвядзення.

У выніку даследавання было ўстаноўлена:

- Абразцы з нафтай на працягу ўсяго перыяду назірання аказвалі негатыўнае ўздзеянне на клеткі водарасці *Nitella flexilis*, што выяўлялася ў зрухах электрычнага патэнцыялу мембраны.

- Штамы бактэрыі AL18, 6-3 і FD9 на працягу ўсяго перыяду назіранняў, не аказвалі таксічнага ўздзеяння на клеткі водарасці. Абразцы, якія змяшчаюць нафту і бактэрыі штаму 8А-3А (на 1 і 14 суткі) і бактэрыі штаму 15-3А (на 0, 1, 7 і 21 суткі), аказвалі негатыўнае ўздзеянне на клеткі водарасці. Такі эффект мог быць абумоўлены нізкай біядэградацыённай здольнасцю і (або) назапашваннем таксічных прадуктаў метабалізму.

- Даследаванне абразцоў, прадстаўленых кансорцыумам мікраарганізмаў імабілізаваных торфам, паказала, што кансорцыум бактэрыі (штамы AL18, 6-3 і 15-3А) з'яўляецца эфектыўным дэструктарам нафты. Прымяненне торфу ў воднай асяроддзі для імабілізацыі мікрабіялагічных абразцоў не прыводзіць да паляпшэння біядэградацыі.

- Абразец, які змяшчае гексадекан (без бактэрыі-дэструктараў), выклікаў моцныя зрухі рознасці электрычнага патэнцыялу плазмалемы клетак водарасці. Абразец з гексадеканам і штамам AL18 толькі на 0, 1 і 7 суткі паказаў вяртанне рэгістраваных параметраў клеткі да значэнняў кантролю.

Практычная значнасць работы. Атрыманыя вынікі дазваляюць распрацаваць сістэму адбору эфектыўных штамаў мікраарганізмаў, якія не ўтвараюць ў працэсе дэградацыі нафты таксічных для раслінных арганізмаў прадуктаў метабалізму.

## GENERAL DESCRIPTION OF THE WORK

Master's thesis: 60 pages, 14 figures, 9 tables, 42 references

*NITELLA FLEXILIS*, BIOTESTING METHOD, EXTRACELLULAR RECORDING, AN ELECTRICAL POTENTIAL DIFFERENCE, RESISTANCE OF THE MEMBRANE, BACTERIA-DESTRUCTORS OF OIL, OIL AND OIL PRODUCTS, METABOLIC PRODUCTS OF BACTERIA, THE EVALUATION OF THE TOXICITY, THE MEASURING ELECTRODES

For the biological testing we used cells of chara alga *Nitella flexilis*.

The objective of the work: based on the biotesting to evaluate the toxicity of water samples contaminated with oil and oil products, before and after treatment by microorganisms-destructors of oil.

The experimental procedure of registration of electrophysiological parameters of cell *Nitella flexilis* was performed using extracellular recording method.

As a result of research we have established:

- Samples with oil throughout the entire period of observation had a negative impact on the algae cells *Nitella flexilis*, which was manifested in shifts of the electric potential of the membrane.

- The samples that contained oil and bacteria strain AL18, 6-3 and FD9 during the entire period of observation, did not cause any toxic effects on the algae cells. The samples that contained oil and bacteria strain 8A-3A (on the first and 14th day of cultivation) and the bacteria strain 15-3A (on the zero, first, 7th and 21th day of cultivation), had a negative impact on algae cells. This effect could be due to low biodegradability and (or) the accumulation of toxic products of metabolism.

- The consortium of bacteria (strains AL18, 6-3 and 15-3A) is effective the destructor of oil. The use of peat in the aqueous medium for immobilizing microbial samples does not improve matters of biodegradation.

- The sample, containing hexadecan (without bacteria-destructors), caused strong shifts of the electric potential difference of plasma membrane of algae cells. Sample with hexadecan and strain AL18 on the zero, first and seventh day of cultivation showed a return of recorded parameters of cells to the control.

The practical significance of the work. The results allow to develop a system of selection of the efficient strains of microorganisms that do not form in the process of degradation of the oil of the toxic for plant organisms of products of metabolism.