

УДК 631.474+631.452

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПРИРОДНЫХ АССОЦИАЦИЙ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ НА СОСТОЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

И.А. Дегтярева, А.Я. Хидиятуллина

Аннотация

Из почв, загрязненных нефтью, выделены ассоциации углеводородоокисляющих микроорганизмов. В лабораторных условиях была исследована их способность к утилизации углеводородов нефти. Результаты биотестирования в вегетационном опыте подтвердили ускорение процесса очищения загрязненных почв после внесения ассоциации микроорганизмов.

Ключевые слова: нефть, углеводороды, почва, загрязнение, мониторинг, углеводородоокисляющие микроорганизмы, ассоциации.

Введение

Нефть и нефтепродукты относятся к наиболее опасным загрязнителям биосферы, поэтому вопросы изыскания способов рекультивации нефтезагрязненных территорий являются весьма актуальными.

Загрязнение углеводородами отличается от других антропогенных воздействий на биосферу тем, что оно дает не постоянную, а «залповую» нагрузку на среду, вызывая быструю ответную реакцию. Во всех мероприятиях, связанных с ликвидацией последствий загрязнения и восстановлением нарушенных земель, необходимо исходить из главного принципа: не нанести экосистеме больший вред, чем тот, который уже нанесен при загрязнении. Суть восстановления загрязненных экосистем – максимальная мобилизация их внутренних ресурсов на восстановление своих первоначальных функций. Рекультивация нефтезагрязненных земель – это ускорение процесса самоочищения, при котором используются все природные резервы экосистемы [1–3].

Перспективным решением проблемы реабилитации нефтезагрязненных почв является применение штаммов и сообществ углеводородоокисляющих микроорганизмов (УОМ), полученных в результате селекции и адаптированных к конкретным условиям применения [2–4].

1. Материалы и методы

Проводимые исследования по использованию УОМ состояли из нескольких этапов: выделение природных ассоциаций; определение их свойств; характеристика эффективности микроорганизмов-деструкторов в отношении различных углеводородов. Чистые культуры УОМ были выделены по методу Коха на мясопептонном агаре (МПА) и поддерживались на скошенном МПА при комнатной

температуре [5]. Родовую и видовую идентификацию выделенных штаммов УОМ проводили в соответствии с общепринятыми методами [6–8].

Для скрининга выделенных ассоциаций УОМ по способности утилизировать дизельное топливо (ДТ) в пробирки со средой Ворошиловой – Диановой объемом 10.0 мл вносили посевной материал из накопительной культуры в количестве 1.0 мл на 10.0 мл среды. Культивирование проводили при перемешивании (200 об/мин) при 30 °С в термостате. Контрольным вариантом служила стерильная среда с ДТ без внесения культур. В течение 30 сут визуально оценивалась степень разрушения нефтяной пленки на поверхности среды.

Способность микроорганизмов-деструкторов расти в присутствии различных углеводов (мазута, вакуумной газели, гексана, фенола, толуола) проверяли при помощи метода реплик. В каждую ячейку репликатора добавляли физиологический раствор и выделенные ассоциации УОМ.

Степень токсичности остаточных углеводов оценивалась биотестами с использованием проростков *Triticum aestivum* L. [9].

Вегетационный опыт по изучению влияния ДТ в концентрации 5% на состояние микробоценоза был проведен на выщелоченном черноземе по следующей схеме: контроль (незагрязненная почва); почва + ДТ (5%); почва + ДТ (5%) + NPK; почва + ДТ (5%) + растения; почва + ДТ (5%) + сообщество А; почва + ДТ (5%) + сообщество Б; почва + ДТ (5%) + NPK + сообщество А; почва + ДТ (5%) + NPK + сообщество Б; почва + ДТ (5%) + растения + сообщество А; почва + ДТ (5%) + растения + сообщество Б. Микробиологическим контролем являлась почва без растений. Титры вносимых сообществ: А – $1.6 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл, Б – $1.4 \cdot 10^{11}$ КОЕ/мл.

Вегетационный опыт проводили в теплице с естественным освещением в летний период в 6-килограммовых сосудах. В ходе эксперимента растения поливали деминерализованной водой, поддерживая влажность почвы на уровне 60% ППВ. После прорезживания в каждом сосуде оставляли по 15 растений яровой пшеницы, которые выращивали в течение 90 сут.

Из всех вариантов опыта отбирали в динамике (на 0-е, 10-е, 21-е, 30-е, 45-е, 60-е, 90-е сутки) пробы почв, в которых определяли базальное дыхание, численность УОМ, гетеротрофов, микромицетов, длину и массу корешков и проростков.

Базальную респираторную активность почвенного микробного сообщества определяли по количеству выделяемого CO_2 титрованием после его поглощения щелочью [10].

Выделение различных ризосферных микроорганизмов проводили по общепринятым методикам [5, 11, 12] на элективных питательных средах: углеводородокисляющие микроорганизмы – на среде Ворошиловой – Диановой методом предельных разведений с последующим пересчетом по таблице Мак-Креди, гетеротрофные бактерии – на МПА, микромицеты – на агаризованной среде Чапека. Численность микроорганизмов выражали в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г почвы после ее высушивания при температуре 105 °С. Родовую и видовую принадлежность ризосферных микроорганизмов устанавливали по определителю бактерий Берджи [7].

Изучение влияния комплекса аборигенных УОМ на увеличение длины и биомассы проростков проводили по модифицированной методике Л.К. Павловой-Ивановой с соавторами [13].

Измерение всех параметров проводили не менее чем в 3-кратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Excel и программы Origin 4.1. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($p < 0.05$). Взаимосвязь ряда факторов устанавливали посредством расчета коэффициента корреляции [14].

2. Результаты исследований

В процессе исследований проводили искусственное загрязнение почвенных образцов дизельным топливом в дозах 1, 3, 5, 7, 10, 12% от массы почвы. Были выделены более 80 ассоциаций микроорганизмов-деструкторов, 15 из которых проявили активный рост. В дальнейшем проверяли способность этих консорциумов расти на среде с приведенными выше углеводородами. Большинство ассоциаций хорошо развивались в присутствии всех углеводородов, кроме фенола. Наилучший рост в присутствии всех углеводородов показали консорциумы А и Б.

В результате скрининга для дальнейшего изучения из вариантов с 7% и 10% ДТ были отобраны именно эти природные ассоциации, проявившие наибольшую углеводородокисляющую активность: **сообщество А**, в котором образовывались оранжевые сгустки биомассы, пленка была самой мощной и визуально количество ДТ уменьшалось более чем на 80% уже на 7-е сутки; **сообщество Б**, в котором происходило изменение цвета среды, образовывалась бежевая пленка и количество ДТ также уменьшалось намного быстрее.

Проведенная идентификация культур, входящих в состав ассоциаций, показала, что они представлены родами *Sphingobacterium*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Arthrobacter*, дрожжами рода *Candida*, микромицетами рода *Trichoderma* и др.

Наиболее активные из выделенных УОМ задепонированы в коллекции ФГУП ГосНИИгенетика. Эти штаммы идентифицированы методом установления нуклеотидной последовательности 16S рРНК.

В вегетационном опыте осуществили сравнительную оценку эффективности выбранных сообществ, а также их сочетания с яровой пшеницей (*Triticum aestivum* L.) и минеральным удобрением с целью биоремедиации почвы.

В качестве показателя оценки состояния среды и интенсивности процесса очищения почвы от углеводородов использовалась динамика численности УОМ. В исследуемой почве в начале эксперимента количество аборигенной углеводородокисляющей микрофлоры составляло порядка 10^6 КОЕ/г почвы.

Результаты исследований показали существенную разницу в количестве микроорганизмов в почвах без загрязнения и загрязненных ДТ, без обработки и с внесением ассоциаций. Так, в течение 45 сут экспозиции существенных изменений численности отмечено не было, что, вероятно, обусловлено высокой токсичностью созданной среды. Активный рост этих микроорганизмов спустя 45 сут во всех вариантах ($64.0 \cdot 10^6 - 150.0 \cdot 10^6$ КОЕ/г) почвы можно объяснить изменением погодных условий. Наибольшее увеличение количества УОМ в опытных вариантах связано с адаптацией и активным ростом исследуемых сообществ. На 60-е сутки количество УОМ увеличилось на порядок ($120.0 \cdot 10^6$ КОЕ/г).

почвы) по сравнению с отбором проб на 10-е сутки ($2.8 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы), в дальнейшем наблюдалась стабилизация роста их численности.

Колебания численности в варианте «почва + ДТ» могут быть связаны с токсическим действием внесенного углеводорода. Полученные результаты свидетельствуют о значительном ускорении процесса биodeградации дизельного топлива в почве при внесении исследуемых ассоциаций по сравнению с необработанными вариантами. Сообщества по-разному влияли на численность УОМ: максимальное количество этих микроорганизмов отмечено при внесении одного сообщества Б и сообщества А совместно с минеральными удобрениями ($120.0 \cdot 10^6 - 150.0 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы).

Одним из диагностических показателей биологической активности почв является состояние комплекса гетеротрофных микроорганизмов, которые используют в качестве источника энергии и углерода органические, то есть углеродсодержащие соединения. В течение первых 30 сут эксперимента количество этих микроорганизмов в большинстве вариантов заметно снижалось (в 4.9–5.2 раза). Возможной причиной является уменьшение питательных веществ или токсическое действие исследуемого углеводорода.

Обращает на себя внимание тот факт, что минеральные удобрения на 30-е сутки стимулировали увеличение гетеротрофов в варианте с сообществом А в 3.7–4.1 раза. Растения в этот период способствовали росту численности этих микроорганизмов в варианте с сообществом Б в 8.5–9.0 раза. Дальнейшая динамика численности гетеротрофных микроорганизмов характеризовалась постепенным уменьшением их в почве, а спустя 90 сут количество этих микроорганизмов во всех вариантах существенно снизилось (до $22.5 - 187.5$ КОЕ/г почвы). Необходимо отметить, что в конце эксперимента количество гетеротрофных и углеводородоокисляющих микроорганизмов стало практически одинаковым.

Почвенные микромицеты представляют собой группу микроорганизмов, универсальных по своему значению для формирования плодородия почвы. Количество микромицетов в исходной почве достигало максимальной величины спустя 45 сут ($80.0 \cdot 10^6$ КОЕ/г почвы), впоследствии наблюдалась стабилизация их численности. Дизельное топливо оказало токсическое действие на почвенные грибы: в загрязненной почве численность микромицетов была в 1.8–8.5 раза ниже, чем в контрольной, и находилась приблизительно на одном уровне в течение всего эксперимента. Минимальное их количество (5.0–25.0 тыс./г) наблюдалось при внесении минеральных удобрений как отдельно, так и с исследуемыми сообществами. В вариантах же с растениями была отмечена наименьшая разница с контрольным. Значимым является тот факт, что в вариантах с внесением исследуемых сообществ количество микромицетов было существенно ниже по сравнению с контрольной почвой (в 1.8–5.7 раза). Это, по-видимому, связано с антагонистическим действием входящих в сообщества микроорганизмов. Во всех вариантах, включая контрольные, обнаружены представители родов *Penicillium*, *Aspergillum*, *Trichoderma*, *Rhizopus*, *Fuzarium* и др.

Базальное дыхание (БД) является одной из важнейших биохимических характеристик почвы. Во всех опытных вариантах происходило увеличение в 2.3–6.8 раза базального дыхания по сравнению с контрольной почвой. При внесении исследуемых сообществ в загрязненную почву этот показатель практически

сразу увеличивался вдвое (даже по сравнению с увлажненной почвой + ДТ). При внесении минеральных удобрений как отдельно, так и с сообществами БД возрастало в 1.8–6.6 раза. Необходимо отметить, что яровая пшеница в качестве фитомелиоранта не оказала существенного влияния на этот показатель. Невысокие значения БД в вариантах с растениями ($18.1 \cdot 10^6$ – $26.6 \cdot 10^6$ CO_2 мг/100 г · 24 ч) могут быть связаны с конкуренцией макро- и микроорганизмов за источники питания. Внесенные сообщества увеличивали базальное дыхание, при этом сообщество Б оказывало большее воздействие на этот процесс по сравнению с сообществом А.

Степень влияния почвенной вытяжки на развитие семени является показателем токсического действия углеводов. При этом оценивали различные биометрические показатели: длина проростков и их биомасса, длина корешков и их биомасса.

Длина проростков оставалась невысокой до 45 сут. Это соотносится с данными по численности углеводородокисляющей микрофлоры. Спустя 60 сут стимулирующий эффект почвенной вытяжки на длину проростка увеличивался в 2.7–5.6 раза по сравнению с началом эксперимента. Минеральные удобрения и растения оказывали приблизительно одинаковый стимулирующий эффект (на 57.3% и 64.6% соответственно). Сообщество Б проявляло больший положительный эффект (в 1.3–1.9 раза) по сравнению с сообществом А.

Биомасса проростков спустя 60 сут увеличивалась в 3.3–5.9 раза. Это соотносится с данными по длине проростков, которые оставались невысокими до 45 сут. Изучаемые сообщества оказывали на биомассу проростков яровой пшеницы практически одинаковый положительный эффект (увеличение на 51.6% и 58.1% по сравнению с контролем соответственно).

При исследовании влияния почвенной вытяжки на прорастание корешка в варианте «почва + ДТ» было установлено угнетающее действие углеводов. Положительное влияние почвенной вытяжки на длину корешка наблюдалось только спустя 45 сут. Это соотносится не только с численностью УОМ, но и с показателями влияния загрязненной почвы на развитие проросшего корешка. Минеральные удобрения и растения совместно с изучаемыми сообществами оказывали приблизительно одинаковый стимулирующий эффект (на 38.7% и 35.8% соответственно). Необходимо отметить, что сообщество Б проявило большее активизирующее действие (в 1.5 раза).

При изучении влияния почвенной вытяжки на массу корешков было установлено, что этот показатель во всех опытных вариантах был выше контрольного (на 15.0–121.0%). При этом в вариантах с растениями масса корешков была существенно выше, в 1.9 раза, чем при использовании минеральных удобрений.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что важную роль в детоксикации загрязнителей играет ризосфера растений, которая является областью активного развития микроорганизмов. Интересен тот факт, что сообщество А на протяжении всего эксперимента оказывало большее активизирующее действие на массу корешков (в 1.8 раза).

Показатель устойчивости растений к токсическому действию углеводов можно получить при оценке влияния загрязненной почвы на развитие проросшего корешка, при котором семена тест-культур проращиваются в чашках Петри со

стерильной фильтровальной бумагой до длины корешков 1.0–2.0 см. Затем они высаживаются в почву, и через 3 сут измеряется длина корешка. Во всех опытных вариантах в течение 30 сут загрязненная почва оказывала угнетающее действие на развитие корешков. Снижение токсичности было отмечено только спустя 45 сут. Это соотносится с численностью углеводородоокисляющих микроорганизмов и с данными по влиянию почвенной вытяжки на развитие корешка и проростка. В вариантах с растениями отмечен больший положительный эффект на развитие корешков по сравнению с минеральными удобрениями. Оба исследуемых сообщества оказывали стимулирующий эффект на развитие корешков, и эта тенденция сохранялась в течение всего эксперимента. Практически во всех вариантах сообщество Б продемонстрировало большее положительное действие на данный показатель.

Таким образом, динамика численности почвенных микромицетов, углеводородоокисляющих и гетеротрофных микроорганизмов, базальное дыхание, а также оценка токсичности ДТ в почве с использованием биотестов показали ускорение процесса деградации дизельного топлива в почве и снижение его токсического действия на почвенную биоту при внесении ассоциаций УОМ.

Заключение

Выделено 15 активных ассоциаций микроорганизмов-деструкторов углеводородов. Микробиологический мониторинг показал, что численность углеводородоокисляющих микроорганизмов к концу эксперимента (90-е сутки) значительно возросла. При внесении дизельного топлива в связи с его токсическим действием происходило существенное снижение микромицетов. Базальное дыхание увеличивалось как при внесении минеральных удобрений, так и в присутствии сообщества Б. При сравнительном анализе двух выбранных углеводородоокисляющих ассоциаций установлено, что сообщество А оказывало наибольший стимулирующий эффект на рост массы корешка, а сообщество Б – на большинство вышеприведенных параметров.

Результаты модельных и вегетационных экспериментов свидетельствуют о высокой углеводородоокисляющей активности выделенных микроорганизмов и возможности создания на их основе препарата для биоремедиации нефтезагрязненных почв.

Summary

I.A. Degtyareva, A.Ya. Khidiyatullina. Evaluation of the Influence from Natural Associations of Hydrocarbon-Utilizing Microorganisms on Oil-Contaminated Soil.

Associations of hydrocarbon-utilizing microorganisms were selected from oil-contaminated soil. In laboratory conditions, their ability to utilize hydrocarbon oils was explored. The results of biotesting in a pot experiment confirmed the acceleration of soil decontamination after the introduction of microorganisms associations.

Key words: oil, hydrocarbon, soil, contamination, monitoring, hydrocarbon-utilizing microorganisms, associations.

Литература

1. *Исмаилов Н.М., Пиковский Ю.И.* Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 177–197.
2. *Хидиятуллина А.Я., Дмитричева Д.С., Яппаров А.Х.* Создание коллекции аборигенных углеводородоокисляющих микроорганизмов для биологической рекультивации нефтезагрязненных регионов Татарстана // Экологические проблемы сельскохозяйственного производства: Материалы IV Всеукр. науч.-практ. конф. молодых ученых. – Скол. – 2010. – С. 86–89.
3. *Яппаров А.Х., Дегтярева И.А., Хидиятуллина А.Я.* Использование эффективных аборигенных углеводородоокисляющих микроорганизмов при биологической рекультивации нефтезагрязненных территорий РТ // Учен. зап. Казан. гос. акад. вет. мед. им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2009. – Т. 199. – С. 218–222.
4. *Кудрина Е.А., Максимов А.Ю.* Биodeградация дибензотиофена и алканов нефти бактериями рода *Rhodococcus* // Актуальные аспекты современной микробиологии: Тез. III Междунар. молодеж. шк.-конф. – М., 2007. – С. 57–58.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Моск. гос. ун-т, 1991. – 304 с.
6. *Лысак Л.В., Добровольская Т.Г., Скворцова И.Н.* Методы оценки бактериального разнообразия почв и идентификации почвенных бактерий. – М.: МАКС Пресс, 2003. – 123 с.
7. Определитель бактерий Берджи: в 2 т. / Под ред. Дж. Хоулта и др. – М.: Мир, 1997. – Т. 1. – 432 с.; Т. 2. – 368 с.
8. *Watanabe T.* Pictorial atlas of soil and seed fungi: Morphologies of cultured fungi and key to species 113. – Boca Raton, Florida, USA: Lewis Publ., 1994. – 411 p.
9. *Водопьянов В.В., Киреева Н.А., Гризориади А.С., Якупова А.Б.* Влияние нефтяного загрязнения почвы на ризосферную микробиоту и моделирование процессов биodeградации углеводов // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. – 2009. – № 6 (100). – С. 545–547.
10. *Insam H., Mithchel C.C., Dormaar Y.F.* Relationship of soil microbial biomass and activity with fertilization practice and crop yield of three ultisols // Soil Biol. Biochem. – 1991. – V. 23, No 5. – P. 459–464.
11. *Колешко О.И.* Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум. – Минск: Высш. шк., 1981. – 175 с.
12. *Семенов С.М.* Лабораторные среды для актиномицетов и грибов. – М.: Агропромиздат, 1990. – 240 с.
13. *Павлова-Иванова Л.К., Баканчикова Т.И., Картунова Е.Ю.* Изучение характера взаимодействия *Azospirillum brasilense* с растениями // Микробиология. – 1995. – Т. 64, № 3. – С. 387–392.
14. *Шайдарова Л.Г., Улахович Н.А.* Математическая обработка результатов химического анализа. – Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2000. – 44 с.

Поступила в редакцию
27.06.11

Дегтярева Ирина Александровна – доктор биологических наук, заведующая лабораторией агроэкологии и микробиологии Татарского научно-исследовательского института агрохимии и почвоведения РАСН.

E-mail: peace-1963@mail.ru

Хидиятуллина Айгуль Ядкарьевна – научный сотрудник Татарского научно-исследовательского института агрохимии и почвоведения РАСН.

E-mail: kindness2006@yandex.ru