

УДК 579.64:631.46:631.445.51:504.0546665.61(470.630)

МИКРОБИОТА ЗАСОЛЕННЫХ ЛУГОВО-КАШТАНОВЫХ ПОЧВ СТАВРОПОЛЬСКОГО КРАЯ ПРИ ЗАГРЯЗНЕНИИ НЕФТЬЮ И БИОРЕКУЛЬТИВАЦИИ

© 2011 И.З. Ибатуллина¹, Ю.А. Виноградова², Ф.М. Хабибуллина²

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, г. Москва

² Институт биологии КНЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

Поступила в редакцию 07.05.2011

В статье рассматриваются пути восстановления нефтезагрязненных засоленных лугово-каштановых почв. Приведены результаты исследований влияния различных доз нефти, возраста загрязнения и способа рекультивации на структуру и численность эколого-трофических групп, биомассы микроорганизмов в засоленных лугово-каштановых почвах.

Ключевые слова: засоленная почва, нефтезагрязнение, биопрепараты, микробиота, рекультивация

Загрязнение окружающей среды нефтью и нефтепродуктами до сих пор остается актуальной проблемой. Скорость процессов самоочищения почв от нефти в любой климатической зоне зависит от взаимодействия и эффективности таких природных факторов, как физический (процессы выветривания), физико-химический (процессы фотохимического и биохимического преобразования углеводородов) и биологический (микробная деструкция). В конечном итоге решающим в процессах самоочищения почв от нефти является биологический фактор, обусловленный функциональной активностью почвенной микробиоты, которая определяет скорость и глубину трансформации нефтяных соединений. Анализ результатов работ в различных почвенно-климатических зонах показал сходство реакций почвенной микробиоты на различные дозы нефтезагрязнений. Установлено, что при низких дозах загрязнения (до 1%) происходит стимулирование активности основных трофических групп микробиоты, дифференцированное ингибирование отдельных групп при концентрации нефти до 5% и практически полное отсутствие всех групп почвенных микроорганизмов при дозах нефти выше 10% [2-4]. Для этих почв в настоящее время отсутствуют универсальные способы рекультивации после нефтяного загрязнения, в том числе и биологические.

Ибатуллина Инна Зайтуновна, аспирантка. E-mail: zaitun2003@mail.ru

Виноградова Юлия Алексеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела почвоведения. E-mail: vinogradova@ib.komisc.ru

Хабибуллина Флюза Мубараковна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела почвоведения. E-mail: fluza@ib.komisc.ru

Несмотря на имеющийся обширный мировой опыт рекультивации нефтезагрязненных земель, среди исследователей нет единого мнения о преимуществах того или иного метода. В разных почвенно-климатических зонах скорость самовосстановления нефтезагрязненных почвенных экосистем сильно варьирует. Поэтому поиск приемов, позволяющие упростить процесс рекультивации нефтезагрязненных почв без потерь их качества, является актуальным, в особенности, при проведении восстановительных работ в районах распространения засоленных почв, таких как солончаки.

Остаются малоизученными вопросы деградации нефти в засоленных почвах Ставропольского края. Повышенная соленость почвенных растворов, высокие температуры воздуха и повышенное содержание парафинов в нефти приводят к формированию стрессовых условий для существования почвенной микробиоты, что обуславливает низкую скорость самоочищения почвы. В данной работе впервые проведен анализ биологической активности нефтезагрязненных засоленных лугово-каштановых почв разного возраста загрязнения и способа восстановления.

Цель исследования: изучение численности эколого-трофических групп и биомассы микроорганизмов засоленных лугово-каштановых почв, подвергавшихся нефтяному загрязнению в процессе их восстановления и после рекультивации биологическими приемами.

Объект и методы исследования. В модельном эксперименте исследовали биологическую активность фоновых лугово-каштановых почв Ставропольского края, а также их

нефтезагрязненных аналогов. Для постановки модельного эксперимента были использованы почвенные образцы с 5-ти и 18-ти месячным сроком нефтяного загрязнения (без рекультивации) и с предварительной рекультивацией биопрепаратом «Элита-комплекс». Для имитации свежего загрязнения в незагрязненную лугово-каштановую почву была внесена нефть Ачикулакского месторождения в концентрации 100 мл на 1 кг почвы.

В лабораторных условиях для оценки эффективности биологического метода рекультивации использовали следующие коммерческие биопрепараты:

1. Биопрепарат Института биологии Коми научного Центра УрО РАН «Биосорбент с использованием бактериально-дрожжевого и грибного консорциумов для очистки водоемов и почв от нефтепродуктов» [7]. В его состав входят *Rhodococcus erythropolis* РК-16, *Arthrobacter sp.* НК-15, *Candida lipolytica* КБП-3308, *Candida guillirmondii* КБП-3175, *Pichia guillirmondii* КБП-3205, *Fusarium moniliforme* Sheld., *Gliocladium deliquescens* Sopp., иммобилизованные в гидрофобный сорбент на основе торфа «Сорбонафт».

2. Биопрепарат компании «Элита-комплекс» (г. Екатеринбург), состоящий из штаммов *Rhodococcus sp.* Препарат получают в ферментерах на питательных средах с добавлением определенной концентрации нефти (нефть местного Ачикулакского месторождения).

3. Микромицетный комплекс на основе штаммов, выделенных из засоленных мест обитания и почв, подверженных воздействию нефтепродуктов: *Fusarium solani* (Mart.) Appel & Wollenw, *Fusarium moniliforme* Sheld., *Heleococcum alkalinum* Bilanenko & M. Ivanova (*Acremonium alkalophilum*), *Acremonium rutillum* W. Gams, *Acrostalagmus luteoalbus* (Link) Zare, W. Gams & Schroers (син. *Verticillium tenerum* Nees), *Debaryomyces hanzenii* (Zopf) Lodder & Kreger.

В работе были исследованы четыре варианта очистки от нефти отобранных загрязненных почвенных образцов:

- 1) с внесением биосорбента (биопрепарат «Сорбонафт»);
- 2) с внесением биопрепарата компании «Элита-Комплекс»;
- 3) с внесением микромицетного комплекса;
- 4) без внесения биопрепаратов (самоочищение).

Все варианты инкубировали при постоянной температуре 24°C и увлажнении 60% от полной влагоемкости почвы в течение 1,5 месяца. Повторность трехкратная. Совместно с биопрепаратами вносили удобрение Азофоска (0,1 г азофоски на 100 г почвы). Остаточное содержание

нефтепродуктов определяли методом экстракции нефтепродуктов с помощью четыреххлористого углерода [5]. Учет численности микроорганизмов азотного цикла проводили методом посева почвенной суспензии на соответствующие питательные среды: аммонификаторы – на мясо-пептонном агаре (МПА); микроорганизмы, использующие минеральные формы азота – на крахмал-аммиачном агаре (КАА); аэробные азотфиксаторы и олигонитрофилы – на среде Эшби, нитрификаторы – на среде Виноградского; целлюлозолитики – на среде Гетчинсона; сахаролитики – на среде Чапека-Докса. Численность микроорганизмов выражали в КОЕ на грамм воздушно-сухой почвы [6]. Общее количество микроорганизмов (бактерий, мицелий, споры грибов) определяли с помощью метода люминесцентной микроскопии [1]. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ STATISTICA 6.0 и Excel 2000.

Результаты и обсуждения. Перед постановкой опыта была определена остаточная концентрация нефти во всех вариантах почв, взятых для постановки опыта. Содержание нефти в варианте с внесением свежей нефти составила 85,1 г/кг в.с.п., в почвенных образцах с 5-ти и 18-ти месячным сроком нефтяного загрязнения без рекультивации – 47,8 и 25,9 г/кг, с предварительной рекультивацией биопрепаратом «Элита-комплекс» 25,6 и 23,7 г/кг в.с.п. соответственно (рис. 1). За время опыта (1,5 мес.) более значительное снижение концентрации нефти имело место в вариантах со свежим загрязнением. Достаточная влажность почвы и благоприятная температура (25°C) также способствовали разложению нефти в вариантах самоочищения. Все биопрепараты показали достаточную эффективность, но наиболее стабильные результаты были получены при использовании биосорбента «Сорбонафт», испытание которого в свежезагрязненной почве привело к снижению концентрации нефти на 65%. В почвах со старым загрязнением использование препаратов оказалось мало эффективным.

Для определения влияния биопрепаратов на процесс восстановления почвенной микробиоты в опытных вариантах была исследована ее биомасса, трофическая структура и численный состав.

Биомасса микроорганизмов. Подсчет микробной биомассы лугово-каштановых засоленных почв показал довольно высокие значения по грибной (мицелий, споры, дрожжи), с низкой долей бактериальной (не выше 0,1-2%). При воздействии свежей нефти (около 8%) за период экспозиции биомасса микроорганизмов (дрожжи, мицелий и споры

грибов) во всех вариантах резко снизилась по сравнению с исходной (фоновой) почвой.

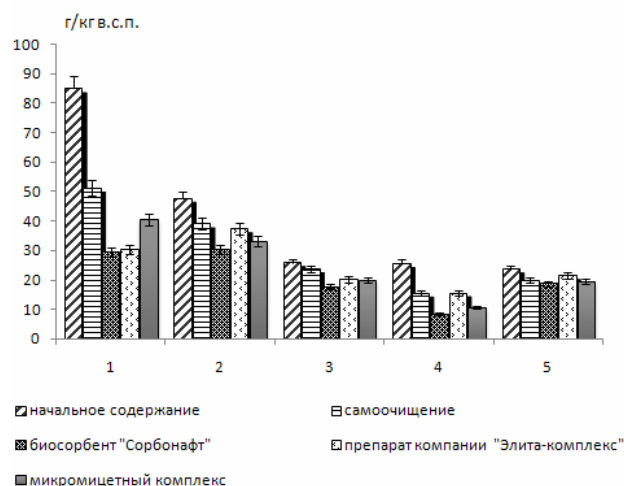


Рис. 1. Остаточное содержание нефтепродуктов в лугово-каштановых солончаковых почвах до и после проведения модельного эксперимента (срок экспозиции – 1,5 месяца): 1 – свежее загрязнение, 2 – 5 мес. загрязнения без рекультивации, 3 – 18 мес. загрязнения без рекультивации, 4 – 5мес. с рекультивацией, 5 – 18 мес. с рекультивацией

В ходе эксперимента биомасса микроорганизмов в варианте с грибными препаратами была значительно выше показателей варианта самоочищения, но оставалась более низкой, чем в незагрязненной почве. Воздействие бактериального препарата «Элита-комплекс» на биомассу микроорганизмов было на уровне варианта самоочищения. Это объясняется тем, что этот биопрепарат бактериальный, а основную биомассу микроорганизмов составляют грибы.

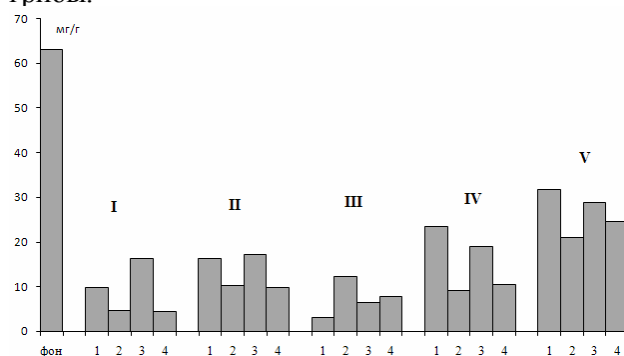


Рис. 2. Общая биомасса микроорганизмов в нефтезагрязненных лугово-каштановых засоленных почвах после проведения модельного эксперимента (срок экспозиции – 1,5 месяца): 1 – биопрепарат «Сорбонафт», 2 – препарат компании Элита-комплекс, 3 – микромицетный комплекс, 4 – самоочищение; I – свежее загрязнение, II – 5 мес. без рекультивации, III – 18 мес. без рекультивации, IV – 5 мес. с рекультивацией, V – 18 мес. с рекультивацией

Использование биопрепаратов для восстановления нефтезагрязненных почв 5-ти месячной давности без предварительной рекультивации на фоне самоочищения привело к дальнейшему увеличению биомассы микроорганизмов. В составе грибной биомассы доминировал спорово-дрожжевой компонент, имело место уменьшение количества мицелия в варианте с микромицетным комплексом и полное его исчезновение в вариантах с «Сорбонафт» и «Элита-комплексом». При использовании почвы аналогичного возраста загрязнения, но с предварительной рекультивацией, показатели биомассы микроорганизмов, за исключением варианта с «Элита-комплекс», были значительно выше. При возрасте загрязнения в 18 месяцев без рекультивации, наоборот, в вариантах с грибными препаратами наблюдалось снижение биомассы микроорганизмов, а предварительная рекультивация в эти сроки привела к активизации роста биомассы микроорганизмов во всех вариантах опыта с наибольшими значениями в вариантах с грибными препаратами. В данный период грибная биомасса состояла только из спорово-дрожжевого компонента, мицелий грибов отсутствовал, бактерии и актиномицеты были незначительными. По окончании модельного опыта при сравнительной оценке эффективности действия различных биопрепаратов на деградацию нефти различных возрастов загрязнения, наиболее высокие значения биомассы микроорганизмов были отмечены во все сроки в вариантах с микромицетным комплексом и «Сорбонафтом» на фоне предварительного рекультивирования.

Эколого-трофические группы микроорганизмов (ЭКТГМ). Из почвенных образцов, взятых на фоновых и опытных участках, были выделены различные ЭКТГМ. Основное внимание было уделено группам микроорганизмов азотного цикла. Как известно, азот занимает особое место среди химических элементов, участвующих в круговороте веществ в почве, где проходят многосторонние реакции, связанные с превращением азота. Цикл превращения азотсодержащих соединений в почве тесно связан с развитием и биохимической деятельностью аммонифицирующих, нитрифицирующих и азотфиксирующих микроорганизмов. Различия в составе и численности микроорганизмов, участвующих в процессах метаболизма азота в исследуемых почвах, связаны с неоднозначным влиянием углеводородов нефти на эти группы.

Анализ фоновой почвы выявил относительно не высокое содержание аммонификаторов (2,25 млн. КОЕ /г в.с.п.), нитрификаторов (1,1 млн. КОЕ/ г в.с.п.) и олигонитрофилов (1,8 млн. КОЕ/г в.с.п.). В свежезагрязненных вариантах количество всех ЭКТГМ в условиях самоочищения уступали фоновым в 1.2-2 раза. При этом произошли значительные изменения в соотношении физиологических групп – увеличилось относительное количество аммонификаторов, олигонитрофилов, сократилась численность сахаролитиков, минерализаторов (рис.3). Использование биопрепаратов привело к резкому изменению состава ЭКТГМ. При использовании микромицетного комплекса и биосорбента «Сорбонафт» наблюдалась высокая активность аммонификаторов. Численность бактерий, использующих легкодоступные сахара (среда Чапека-Докса) увеличивалась в почве со свежим загрязнением при использовании биосорбента «Сорбонафт» и препарата компании «Элита-комплекс».

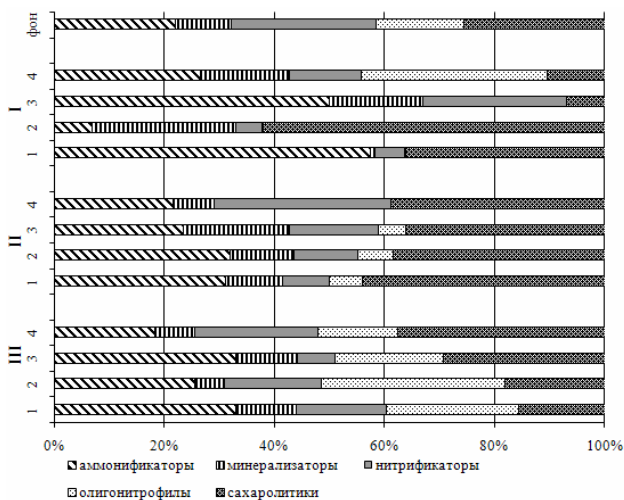


Рис. 3. Соотношение эколого-трофических групп бактерий при действии биопрепаратов в нефтезагрязненных нерекультивируемых засоленных лугово-каштановых почвах: 1 – биопрепарат «Сорбонафт», 2 – препарат компании «Элита-Комплекс», 3 – микромицетный комплекс, 4 – самоочищение, I – свежее загрязнение, II – 5 мес. без рекультивации, III – 18 мес. без рекультивации

При применении биосорбента «Сорбонафт» и препарата компании «Элита-комплекс» в предварительно рекультивированных почвах с 5-ти месячным загрязнением, по сравнению с аналогичными почвами без рекультивации, происходит увеличение активности бактерий на средах МПА, КАА и Эшби. При увеличении срока загрязнения в исследуемых образцах (18 месяцев без предварительной рекультивации) происходит изменение численности в структуре

ЭКТГМ, что наиболее выражено при использовании комплекса микромицетов. Происходит рост численности аммонификаторов, сахаролитиков. Снижение концентрации нефти в данном образце стимулирует активность бактерий на среде Эшби (олигонитрофилы, азотфиксаторы), по сравнению со свежим загрязнением (рис. 3).

При самовосстановлении старовозрастных нефтезагрязненных почв с предварительной рекультивацией в отличие от вариантов без рекультивации резко возрастает активность аммонификаторов и минерализаторов, по сравнению с другими группами бактерий (рис. 4), что указывает на достаточное количество доступного для них органического вещества для их потребления и его активную минерализацию. В варианте с «Элита-комплекс» ЭКТГМ оставались почти на первоначальном уровне, поскольку доступные органические для бактерий биопрепарата вещества уже были использованы этой же группой бактерий во время предварительной рекультивации. В двух других вариантах процесс нефтедеструкции идет более активно, соответственно микробиологические процессы опережают аналогичные показатели вариантов самовосстановления, поэтому через 1,5 месяца отмечено снижение активности аммонификаторов и нитрификаторов на фоне увеличения сахаролитиков, олигонитрофилов и олиготрофов. Соотношение количества микроорганизмов на КАА и МПА показывает степень напряженности минерализационных процессов. С увеличением срока (18 месяцев) коэффициент минерализации меньше 1 практически во всех почвах с использованием биопрепаратов, что свидетельствует о повышении доли микроорганизмов, потребляющих органические формы азота. Введение биопрепаратов в образцы со старым остаточным загрязнением с предварительным рекультивированием и без него активизировало развитие олигонитрофилов и появление на среде Эшби азотфиксаторов (рис. 3-4).

Увеличение срока загрязнения (18 месяцев) привело к уменьшению как концентрации нефти в почве, так и численности практически всех эколого-трофических групп бактерий при использовании биопрепаратов, и к появлению на питательных средах ярко окрашенных (желтых, оранжевых, красных, розовых, серых и черных) колоний, в том числе и выделяющих диффундирующие в среду пигменты. Известно [2], что присутствие пигментированных колоний говорит о высоком уровне метаболизма почвенного микробсообщества и в целом об активизации процессов очищения почвы от нефтезагрязнения.

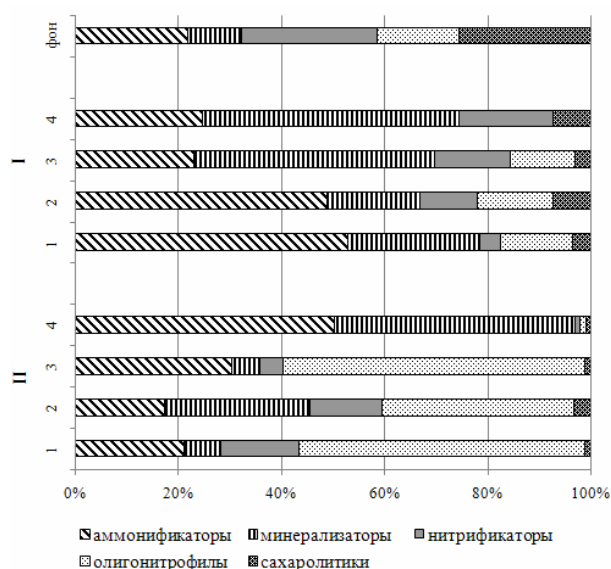


Рис. 4. Соотношение эколого-трофических групп бактерий при действии биопрепаратов в нефтезагрязненных рекультивируемых засоленных лугово-каштановых почвах:

1 – биопрепарат «Сорбонафт», 2 – препарат компании Элита-комплекс, 3 – микромицетный комплекс, 4 – самоочищение; I – 5 мес. с рекультивацией, II – 18 мес. с рекультивацией

Наряду с бактериальным комплексом, исследована группа целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Как известно, целлюлоза – один из самых распространенных в природе растительных полимеров. Почва содержит значительное количество целлюлозосодержащих растительных субстратов. Трансформация клетчатки в почве имеет большое значение и тесно связана с процессами гумусообразования. Этот процесс имеет глобальное значение в круговороте углерода в природе, что обуславливает особую роль разлагающих целлюлозу микроорганизмов. Разложение целлюлозы осуществляется целлюлозоразрушающими микроорганизмами и связано с условиями их нормального функционирования [3]. Наиболее чувствительными к нефтяному загрязнению являются аэробные целлюлозоразлагающие микроорганизмы. Они являются основными индикаторами плодородия почв. На их развитие большое влияние оказывают условия аэрации. Наши данные показывают, что нефтяное загрязнение (свежее и по истечении 5 месяцев) при использовании биопрепаратов, не стимулирует процесс развития целлюлозоразрушающих микроорганизмов, за исключением препарата компании «Элита-комплекс». Через 18 месяцев после загрязнения при рекультивации и без нее в почвах происходит увеличение целлюлозолитиков, за исключением самовосстановления (рис. 5).

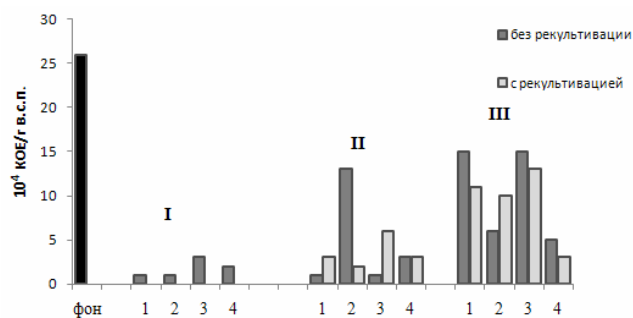


Рис. 5. Численность целлюлозолитиков в нефтезагрязненных лугово-каштановых солончаковатых почвах при действии биопрепаратов:

1 – биопрепарат «Сорбонафт», 2 – препарат компании Элита-комплекс, 3 – микромицетный комплекс, 4 – самоочищение, I – свежее загрязнения, II – 5 мес. загрязнения, III – 18 мес. загрязнения

Как показывают наши опыты с достаточно высокими дозами первоначального загрязнения нефтью засоленных почв, целлюлозоразрушающие микроорганизмы отреагировали снижением численности в десятки раз, что предполагает слабый темп разложения клетчатки – снижается целлюлозолитическая активность почв, что сказывается и на плодородии этих почв, следовательно, нарушается одно из звеньев круговорота углерода в природе [3]. При применении восстановительных мероприятий в виде аэрации, минеральных удобрений, биопрепаратов их численность увеличивалась на фоне самовосстановления, но за опытный период не восстанавливалась до исходного фонового уровня.

Выводы: свежее загрязнение нефтью засоленных лугово-каштановых почв привело к нарушению состава, численности эколого-трофических групп микроорганизмов. Использование бактериальных и грибных биопрепаратов способствует активизации нефтедеструкции в засоленных лугово-каштановых почвах. Биопрепараты оказывают избирательное стимулирование различных физиологических групп микроорганизмов. Биопрепарат «Элита-комплекс» активизирует развитие сахаролитиков и минерализаторов, биосорбент «Сорбонафт» – аммонификаторов и сахаролитиков, а микромицетный комплекс – аммонификаторов и олигонитрофилов с азотфиксаторами. На основании этих данных в дальнейшем возможно составление схемы применения, чередования, комбинирования этих биопрепаратов для более эффективной очистки засоленных нефтезагрязненных почв разных возрастов загрязнения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Головченко, А.В. Влияние нефти на численность, биомассу и жизнеспособность грибов в верховых торфяниках / А.В. Головченко, Л.М. Полянская // Микробиология. 2001. Т. 70. № 1. С. 96-102.
2. Гузев, В.С. Роль почвенной микробиоты в рекультивации нефтезагрязненных почв / В.С. Гузев, С.В. Левин, Г.И. Селецкий и др. // Микроорганизмы и охрана почв. – М.: Изд-во МГУ, 1989. С. 121-150.
3. Киреева, Н.А. Биологическая активность нефтезагрязненных почв / Н.А. Киреева, В.В. Водопьянов, А.М. Мифтахова. – Уфа изд-во «Гилем», 2001. 376 с.
4. Кураков, А.В. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях / А.В. Кураков, В.В. Ильинский, С.В. Котелевцев, А.П. Садчиков. – М.: Из-во «Графикон», 2006. 336 с.
5. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНД Ф16.1:2.2.22-98. – М. 1998.
6. Методы почвенной микробиологии и биохимии / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. 304 с.
7. Тулянкин, Г.М. Экологические основы оптимизированной технологии восстановления нефтезагрязненных природных объектов на Севере / Г.М. Тулянкин, И.Б. Арчегова, Ф.М. Хабибуллина и др. – Сыктывкар, 2007. 140 с.

MICROBIOTA OF SALTED MEADOW-CHESTNUT SOILS OF STAVROPOL REGION AT OIL POLLUTION AND BIORECULTIVATION

© 2011 I.Z. Ibatullina¹, Yu.A. Vinogradova², F.M. Habibullina²

¹ Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow

² Institute of Biology of KSC UrB RAS, Syktyvkar

In article ways of restoration the petropolluted salted meadow-chestnut soils are considered. Results of researches the influence of various doses of oil, age of pollution and way of recultivation on structure and number of ecological-trophic groups, biomass of microorganisms in the salted meadow-chestnut soils are resulted.

Key words: *salted soil, petropollution, biological products, microbiota, recultivation*

Inna Ibatullina, Post-graduate Student. E-mail: zaitun2003@mail.ru
Yuliya Vinogradova, Candidate of Biology, Research Fellow at
the Soil Science Department. E-mail: vinogradova@ib.komisc.ru
Flyuza Khabibullina, Doctor of Biology, Senior Research Fellow
at the Soil Science Department. E-mail: fluza@ib.komisc.ru