

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНЫХ АССОЦИАЦИЙ ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ ОТ НЕФТЯНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ

© 2013 А.В. Назаров

Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, г. Пермь

Поступила 10.06.2013

В данной статье представлены данные о влиянии четырех видов растений на очистку нефтезагрязненной почвы. Использование изученных видов растений увеличивало численность микроорганизмов-деструкторов в почве и эмульгирующую активность почвенного раствора. Предлагается для повышения эффективности очистки нефтезагрязненной почвы посадка в нее взрослых растений, обладающих более высокой устойчивостью к нефти, чем проростки.

Ключевые слова: фиторемедиация, нефтяное загрязнение, ПАВ, ризосфера.

Фиторемедиация за последние десятилетия стала очень активно развивающимся и перспективным биотехнологическим направлением очистки окружающей среды. В большом количестве работ показана эффективность использования растений для биоремедиации почв, загрязненных самыми разнообразными поллютантами, в том числе нефтью и ее компонентами [1, 2]. Однако более широкое применение фиторемедиации ограничивает слабая изученность механизмов очистки с использованием микробно-растительного взаимодействия. Основным механизмом фиторемедиации почв от данных загрязнителей является их деструкция микроорганизмами, ассоциированными с растениями [1, 3]. Кроме того, в литературе распространено предположение, которое слабо подтверждено экспериментально, о влиянии растений на очистку почвы от нефти через выделение ими поверхностно-активных веществ (ПАВ) [3]. Также существенным недостатком использования растений для рекультивации нефтезагрязненных почв является их высокая чувствительность к нефтяному загрязнению, вследствие чего фиторемедиация используется на почвах с низким нефтяным загрязнением. Поэтому необходима разработка методов повышающих выживаемость и продуктивность растений для использования фиторемедиации на почвах с высоким содержанием нефти. Наибольшее негативное действие нефтяное загрязнение оказывает на проростки растений [4], при этом посев семенами это основной способ посадки травянистых растений при фиторекультивации, использование взрослых растений при фиторемедиации нефтезагрязненных почв является малоизученным. Целью настоящей работы является оценка влияния растений на численность бактерий-деструкторов нефти в почве и эмульгирующую активность почвенного раствора, а также эффективности применения взрослых растений для очистки нефтезагрязненной почвы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

С целью изучения роли микробно-растительных систем в очистке почвы от нефтяного загрязнения в полевых условиях были высажены семенами и однолетней рассадой растения 4 видов: клевер луговой (*Trifolium pratense* L.), клевер ползучий (*T. repens* L.),

кострец безостый (*Bromopsis inermis* (Leys.) Holub.), овсяница луговая (*Festuca pratensis* Huds). Почва с корней и корневищ растений, выращенных рассадой, перед посадкой была смыта водой для того, чтобы избавиться от эффекта разбавления нефтезагрязненной почвы.

Эксперимент проводился на экспериментально нефтезагрязненных площадках через 3 года после загрязнения, находящихся на опытном стационаре в д. Ключи Добрянского района Пермской области. Для загрязнения использовали нефть Ярино-Каменоложского месторождения (содержание парафинов – 5,4%, серы – 0,51-0,79%, плотность – 0,816-0,838 г/см³). Доза нефти 24 л/м². Почва участка биостанции дерново-подзолистая среднесуглинистая, гумус – 2,86 %, рН водный – 6,3, рН солевой – 5,6, N общий – 0,123%.

Эмульгирующую активность почвенного раствора почвы без растений оценивали следующим методом, 20 г почвы помещали в колбу заливали 50 мл дистиллированной воды, выдерживали 1 час и встряхивали на ротаторе 10 мин со скоростью 180 оборотов в мин. Суспензию центрифугировали 20 мин при 8000 g, эмульгирующую активность (E₂₄) надосадочной жидкости измеряли по методу [5]. Для измерения эмульгирующей активности почвенного раствора ризосферы надземную часть растений обрезали, оставляя 5 см до корней, и взвешивали. Корни с почвой помещали в химический стакан и заливали дистиллированной водой в количестве равном массе растения с почвой, выдерживали 1 час. Осторожно удаляли почву с корней кисточкой, растения слегка подсушивали между листами фильтровальной бумаги и взвешивали. По разнице массы растений с почвой и растений с отмытыми корнями вычисляли массу ризосферной почвы. В химический стакан добавляли дистиллированную воду до установления соотношения почва, г: вода, мл - 2 : 5 и переносили в колбу. Дальнейшую подготовку суспензии и определение эмульгирующей активности проводили аналогично, как было описано выше. Учет численности нефтеокисляющих микроорганизмов в ризосфере, а также эмульгирующую активность почвенного раствора проводили через 30 сут после начала эксперимента. Численность микроорганизмов оценивали по общепринятой методике [6] высевом почвенной суспензии на агаризованную Раймонда (г/л): NH₄NO₃ – 2,0; MgSO₄ x 7H₂O – 0,2; K₂HPO₄ –

Назаров Алексей Владимирович, к.б.н., доцент, старший научный сотрудник, e-mail: nazarov@iegm.ru.

2,0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 3,0$; $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O} - 0,01$; $\text{Na}_2\text{CO}_3 - 0,1$ с добавлением нефтяной эмульсии до концентрации нефти в среде 0,1%. Эмульсию готовили с помощью диспергирования ультразвуковым дезинтегратором UD-20 при максимальной амплитуде в течение 5 минут смеси 10% нефти в дистиллированной воде с добавлением 0,05% твина-80. По образованию зон просветления вокруг колоний микроорганизмов судили о наличии у них нефтеокисляющей активности.

Содержание нефти в почве и массу выращенных растений измеряли через 4 месяца после начала эксперимента. Анализ содержания нефти в почве проводили гравиметрическим методом после экстракции хлороформом. Для оценки влияния нефтяного загрязнения на растения измеряли сухой вес растений и рассчитывали процентное отношение общей биомассы растений на нефтезагрязненных площадках к общей биомассе растений на участках без загрязнения.

Достоверность полученных результатов определяли с помощью критерия Стьюдента, статистическую обработку проводили в программе Microsoft Excel 2002.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Предположение о влиянии растений на очистку почвы от нефтяного загрязнения через выделение ими ПАВ, выдвинутое в ряде работ, основывается на данных о наличии эмульгирующей активности у корневых экссудатов растений и муцигеля, слизистого слоя на поверхности корней [7, 8]. Кроме того, способность к продукции ПАВ довольно часто встречается у ризосферных микроорганизмов [9, 10]. В одном из немногих исследований подтверждающем существование эффекта выделения ПАВ микробно-растительными системами достаточным для воздействия на биоремедиационные процессы установлено, что в сосудах с нефтезагрязненной водой в присутствии водных растений, в отличие от сосудов без растений, происходила частичная эмульгация нефти [11].

В проведенном эксперименте выявлена зависимость величины эмульгирующей активности почвенного раствора почвы без растений от нефтяного загрязнения. Если в почве без загрязнения она составляла 0%, то в нефтезагрязненной почве – 2,9%. Как известно, углеводородокисляющая активность микроорганизмов не редко связана с выделением ими ПАВ [12], поэтому измерение эмульгирующей активности почвенного раствора может быть использовано для мониторинговых исследований почв загрязненных нефтью и нефтепродуктами, а также для косвенной оценки углеводородокисляющей активности почвенных микроорганизмов. Эмульгирующая активность водных вытяжек из ризосферы значительно превышала таковую из почвы без растений, от 7,8 до 10,2 раз в вариантах эксперимента с высадкой взрослых растений и от 8,2 до 8,8 раз в случае посадки растений семенами (рис. 1), что указывает на продукцию ПАВ микробно-растительными системами. ПАВ повышают эмульгирующую активность почвенного раствора, что приводит к диспергированию нефти в эмульсию, увеличивает площадь контакта нефти с клетками микроорганизмов, улучшает аэрацию и снижает гидрофобность почвы и, таким образом, способствуют микроб-

ной деградации углеводородного загрязнения [12].

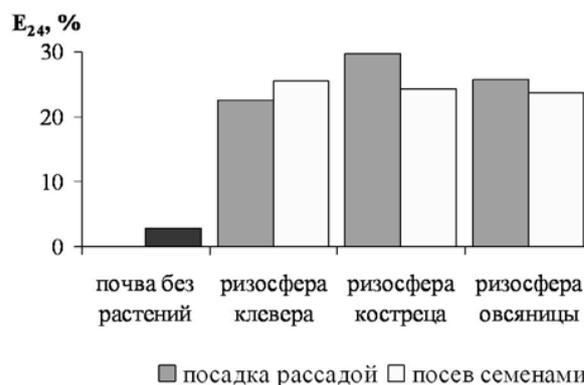


Рис. 1. Эмульгирующая активность почвенного раствора почвы без растений и ризосферы

Корневые выделения, поступая в почву, оказывают воздействие на численность и таксономическое разнообразие микроорганизмов в прикорневой зоне растений [13]. Показано, что численность микроорганизмов, способных деградации нефти, в ризосфере всех изученных растений была выше, чем в почве без растений (рис. 2), поэтому растения потенциально могут повышать деструкцию нефти в почве. Наименьшее отличие в численности данных микроорганизмов между ризосферой и почвой без растений в 12,7 раза отмечено в ризосфере растений овсяницы, выросших из семян, наибольшее – 58,6 раза в ризосфере клевера также в варианте с посадкой семенами.

Эмульгирующая активность и численность микроорганизмов, способных к деструкции углеводородов, были высокими как в ризосфере растений, выращенных из семян, так и посаженных рассадой. Но на деструкцию нефти наиболее сильное влияние растения оказали только при последнем способе посадки (рис. 3), что было связано с крайне низкой общей фитомассой растений в вариантах с посадкой растений семенами (рис. 4), которая составляла в данном случае у клевера - 1,8 г/м², коостреца - 31,8 г/м², овсяницы - 37,8 г/м². Максимальная убыль нефти в почве - 43,4% отмечена в эксперименте при посадке взрослых растений клевера, минимальная – 5,6% наблюдалась в случае с высадкой клевера семенами, в котором общая биомасса растений была самой низкой среди всех вариантов опыта.

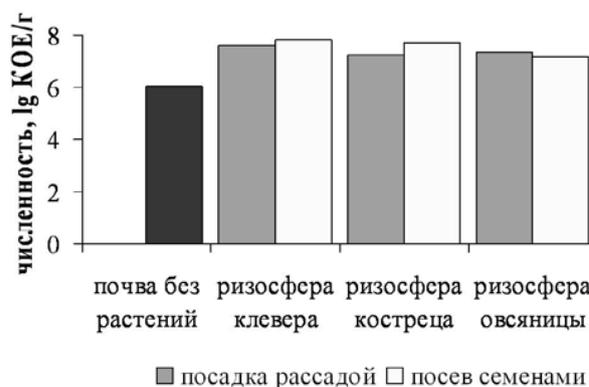


Рис. 2. Численность нефтеокисляющих микроорганизмов в почве без растений и в ризосфере

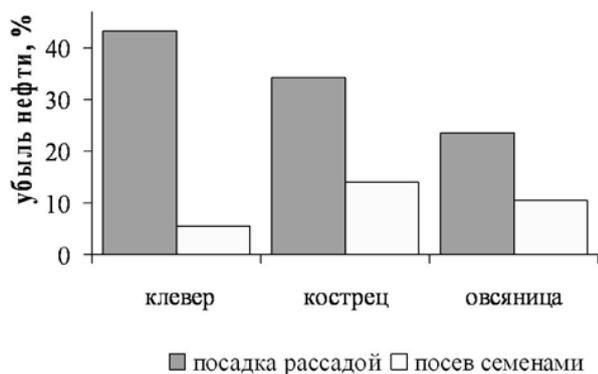


Рис. 3. Влияние посадки растений на деструкцию нефти в почве

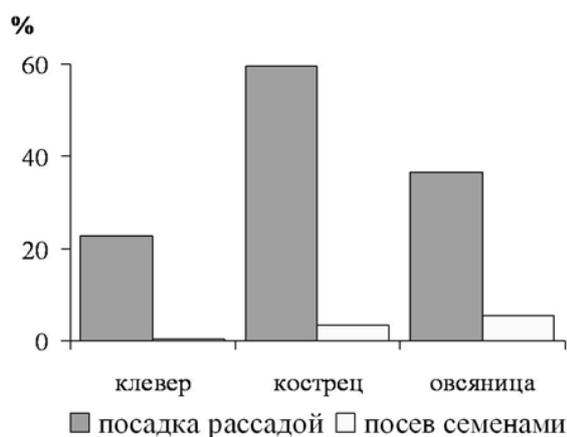


Рис. 4. Процентное отношение биомассы растений на нефтезагрязненной почве к биомассе растений на чистой почве

Таким образом, изученные растения повышают численность микроорганизмов-деструкторов нефти, также микробно-растительные системы способны к продукции ПАВ, вследствие чего посадка растений в нефтезагрязненную почву положительно влияет на ее способность к самоочищению. Однако, основным препятствием для использования микробно-растительных систем при биоремедиации нефтезагрязненных почв является сильное негативное действие нефти на растения. Поэтому необходима разработка методов и приемов, использование которых понижает данное воздействие нефтяного загрязнения.

USE OF MICROBIAL-PLANT ASSOCIATIONS FOR BIOREMEDIATION OF OIL CONTAMINATED SOIL

©2013 A.V. Nazarov

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of RAS, Perm

This article presents data on the effect of four plant species to bioremediation of oil contaminated soils. The use of the studied species of plants has increased the number of microorganisms destructors in the soil and emulsifying activity of the soil solution. It is proposed to increase the effectiveness of cleaning of oil contaminated soil in the planting of her adult plants with higher resistance to oil than seedlings.

Keywords: phytoremediation, oil pollution, surfactants, rhizosphere.

Один из таких способов это посадка взрослых растений, которые менее чувствительны к нефтезагрязнению, чем растения, посеянные семенами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Collins C.D. Implementing Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons // *Phytorem. Methods in Biotechnol.* 2007. V. 23. P. 99-108.
2. Куреева Н.А., Григориади А.С., Водопьянов В.В., Амирова А.Р. Подбор растений для фиторемедиации почв, загрязненных нефтяными углеводородами // *Известия Самарского научного центра РАН.* 2011. Т. 13. № 5 (2). С. 184-187.
3. Phillips L.A., Greer C.W., Farrell R.E., Germida J.J. Field-scale assessment of weathered hydrocarbon degradation by mixed and single plant treatments // *Appl. Soil Ecol.* 2009. V. 42. P. 9-17.
4. Казанцева М.Н. Влияние нефтяного загрязнения на таежные фитоценозы Среднего Приобья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Екатеринбург, 1994. 26 с.
5. Cooper D.G., Goldenberg B.C. Surface active agents from two *Bacillus* species // *Appl. Environ. Microbiol.* 1987. V. 53. P. 224-229.
6. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: Изд. МГУ, 1991. 304 с.
7. Read D.B., Bengough A.G., Gregory P.J., Crawford J.W., Robinson D., Scrimgeour C.M., Young I.M., Zhang K., Zhang X. Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil // *New Phytol.* 2003. V. 157. P. 315-326.
8. Read D.B., Gregory P.J. Surface tension and viscosity of axenic maize and lupin root mucilages // *New Phytol.* 1997. V. 137. P. 623-628.
9. Kuiper I., Legendijk E.L., Pickford R., Derrick J.P., Lamers G.E.M., Thomas-Oates J.E., Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms // *Mol. Microbiol.* 2004. V. 51. P. 97-113.
10. Tran H., Kruijt M., Raaijmakers J.M. Diversity and activity of biosurfactant-producing *Pseudomonas* in the rhizosphere of black pepper in Vietnam // *J. Appl. Microbiol.* 2008. V. 104. P. 839-851.
11. Морозов Н.В., Телитченко М.М. Ускорение очищения поверхностных вод от нефти и нефтепродуктов вселением в них макрофитов // *Водные ресурсы.* 1977. № 6. С. 120-131.
12. Van Hamme J.D., Singh A., Ward O.P. Recent advances in petroleum microbiology // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. V. 67. P. 503-549.
13. Liste H., Felgentreu D. Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil // *Appl. Soil Ecol.* 2006. V. 31. P. 43-52.