

И. А. Дегтярева, А. Я. Хидиятуллина

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ АБОРИГЕННОГО КОНСОРЦИУМА МИКРООРГАНИЗМОВ-ДЕСТРУКТОРОВ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ТЕМНО-СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЕ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Ключевые слова: углеводороды, загрязнение, углеводородоокисляющие микроорганизмы, консорциум, рекультивация, темно-серая лесная почва.

Из нефтезагрязненных почв РТ выделен эффективный консорциум микроорганизмов-деструкторов Б, который в условиях вегетационного опыта на темно-серой лесной почве проявил высокую эффективность деструкции углеводородов до 76,4%. Его использование способствовало улучшению состояния нефтезагрязненной почвы (численность углеводородоокисляющих, гетеротрофных микроорганизмов, микромицетов, респираторная активность).

Keywords: hydrocarbon, contamination, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, consortium, recultivation, taupe forest soil.

From oil-contaminated soil Republic Tatarstan is chosen efficient consortium microorganism-destructor B, which in condition vegetation experience on taupe forest soil has shown high efficiency an hydrocarbon degradation before 76,4%. His use promoted the improvement of the condition oil-contaminated soil (the quantity count hydrocarbon-oxidizing, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, micromicets, respiratory activity).

Введение

Экологические проблемы в регионах нефтедобычи и переработки связаны, в первую очередь, с загрязнением объектов окружающей среды нефтью. Благодаря высоким сорбционным свойствам почвы, нефтяные углеводороды способны аккумулироваться и сохраняться в ней длительное время, существенно преобразуя и значительно ухудшая свойства почвы и снижая ее биологическую активность. Один из наиболее распространенных способов рекультивации – очистка почв и грунтов путем внесения специальных культур микроорганизмов.

Цель работы – оценка эффективности аборигенного консорциума микроорганизмов-деструкторов углеводородов на темно-серой лесной почве Республики Татарстан.

Экспериментальная часть

Вегетационный опыт был заложен на темно-серой лесной почве по схеме: 1) почва (без растений); 2) почва + растения; 3) почва + дизельное топливо (ДТ) (5%); 4) почва + ДТ (5%) + аммиачная селитра; 5) почва + ДТ (5%) + растение; 6) почва + ДТ (5%) + сообщество Б; 7) почва + ДТ (5%) + растение + сообщество Б; 8) почва + ДТ (5%) + аммиачная селитра + растение; 9) почва + ДТ (5%) + аммиачная селитра + сообщество Б; 10) почва + ДТ (5%) + аммиачная селитра + растение + сообщество Б.

Объектом исследования служили консорциум Б; почва, загрязненная дизельным топливом в концентрации 5%; растения гороха сорта Варис; минеральное удобрение – аммиачная селитра (NH_4NO_3).

На основании ранее проведенных экспериментов [1-3] был использован консорциум микроорганизмов-деструкторов Б, найденный в естественных условиях РТ и способный активно расти в присутствии нефтепродуктов до 12% от массы почвы и утилизировать различные

алифатические и ароматические углеводороды. Молекулярно-биологическими методами было установлено, что консорциум Б состоит из трех штаммов: *Pseudomonas stutzeri*, *Achromobacter insolitus*, *Achromobacter xylosoxidans*. Титр микроорганизмов, составляющих ассоциацию Б – $2,5 \cdot 10^{12}$ кл./мл.

Вегетационный опыт проводили в теплице с естественным освещением в летний период в 6 кг сосудах. В ходе эксперимента, который длился 90 суток, растения поливали деминерализованной водой, поддерживая влажность почвы на уровне 60% предельной полевой влагоемкости. После прореживания в каждом сосуде оставляли по 15 растений.

Пробы почв отбирали в динамике на 10, 21, 30, 45, 60, 90 сутки. Отобранные образцы измельчали, просеивали через 2-3 мм сито, хранили при естественной влажности в холодильнике (10°C) до использования в исследованиях.

Определение количества различных почвенных микроорганизмов проводили по общепринятым методикам [4, 5] на элективных питательных средах: углеводородоокисляющие микроорганизмы (УОМ) – на среде Ворошиловой-Диановой; гетеротрофные бактерии – на мясо-пептонном агаре, микромицеты – на агаризованной среде Чапека. Численность микроорганизмов выражали в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г почвы после ее высушивания при температуре 105°C [6]. Респираторную активность почвенного микробного сообщества оценивали путем титриметрического определения количества CO_2 , выделившегося после поглощения щелочью [7].

Определение концентрации углеводородов в почвенных образцах проводили в соответствии с ПНД Ф 16.1:2.2.22-98 «Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии» [8].

Измерение всех параметров проводили не менее чем в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов проводили с помощью электронных таблиц Excel и программы Origin 4.1.

Результаты и их обсуждение

В качестве показателя оценки состояния среды и интенсивности процесса очищения почвы от углеводов использовалась численность УОМ, которая в незагрязненной серой лесной почве на протяжении всего эксперимента сохранялась на уровне 5,0-10,0 млн/г. В загрязненной почве количество этих микроорганизмов возрастало к 30 сут. (130,0 млн/г).

В этом варианте было отмечено снижение углеводов на 32% (90 сут.) в результате самоочищения. При выращивании гороха на загрязненной почве численность УОМ также увеличивалась до 30 сут., затем практически не менялась до 90 сут. Содержание углеводов при этом к концу эксперимента уменьшилось на 44,6%.

При внесении в почву консорциума Б уже на 20 сут. численность УОМ составила 140,0 млн/г и продолжала увеличиваться до 60 сут. В этом варианте содержание углеводов за 90 сут. снизилось на 68,5%.

Необходимо отметить, что на серой лесной почве эффективная деструкция углеводов отмечена в варианте горох + сообщество Б, где на 90 сут. количество углеводов уменьшилось на 61,8%. По нашему мнению, растения гороха способствовали ускорению процессов деструкции углеводов за счет создания оптимальных условий для развития УОМ.

При совместном использовании минерального удобрения и консорциума Б численность УОМ уже на 20 сут. была в 4,8 раза выше контроля и продолжала увеличиваться. В вариантах с внесением минерального удобрения максимальные показатели УОМ отмечены на 45 и 60 сут.

Содержание углеводов при внесении минерального удобрения снижалось на протяжении эксперимента до 72,8%. В трех вариантах (аммиачная селитра + сообщество Б; минеральное удобрение + горох; одновременное использование всех трех компонентов) получены сопоставимые данные: на 30 сут. содержание углеводов уменьшилось на 50,8-54,6%, а к концу эксперимента – на 70,8-76,4%. Таким образом, использование консорциума Б ускоряло процессы очистки темно-серой лесной почвы.

Численность гетеротрофных микроорганизмов, являющаяся одним из диагностических показателей биологической активности почв, в начале эксперимента в незагрязненной почве и почве, загрязненной 5% ДТ, была практически одинаковой (39,5 и 31,0 млн/г, соответственно). В загрязненной почве численность гетеротрофов на 30 сут. увеличилась в 8,0 раз и сохранялась на этом уровне до 60 сут.

В варианте с горохом высокие показатели были отмечены на 30 сут. (339,0 млн/г).

При внесении в загрязненную почву консорциума Б уже на 10 сут. численность гетеротрофов составила 115,0 млн/г, а на 30 сут. возросла в 8,2 раза (946,0 млн/г).

При выращивании гороха и внесении ассоциации Б также на 10 сут. была отмечена высокая численность гетеротрофов, которая к 30 сут. увеличилась в 4,0 раза, а на 45 сут. – в 7,8 раз.

При внесении в загрязненную почву аммиачной селитры количество гетеротрофов на 10 сут. было максимальным (635,0-651,5 млн/г) и оставалось на этом уровне до 20 сут.

Во всех вариантах с консорциумом Б и аммиачной селитрой численность гетеротрофов была сопоставимо высокой на протяжении всего эксперимента.

Микромицеты универсальны по своему значению для формирования плодородия почвы и являются важнейшим компонентом почвенных экосистем. На темно-серой лесной почве их численность в динамике была ниже контрольных значений. Качественный состав представлен родами *Mucor*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma*.

Уровень респираторной активности характеризует способность микробного сообщества минерализовать органическое вещество в почве и часто используется для характеристики деградации органического вещества при биоремедиации [9].

Респираторная активность серой лесной почвы, загрязненной дизельным топливом, сохранялась на уровне контроля (незагрязненная почва) до 20 сут. Максимальный уровень базального дыхания был достигнут только на 30-45 сут. В вариантах с горохом, а также при внесении сообщества Б увеличение интенсивности респираторной активности продолжалось до 30 сут.

При совместном использовании растений гороха и консорциума Б наблюдали стабильно высокий показатель базального дыхания. Рост респираторной активности в начале эксперимента (20-30 сут.), по-видимому, связан с повышением численности микроорганизмов, в первую очередь, углеводородокисляющих.

Внесение минерального удобрения активизировало «дыхательную» активную почвенных микроорганизмов – на протяжении 60 сут. уровень базального дыхания оставался высоким. Максимальные значения респираторной активности свидетельствуют о развитии в почве резистентных к углеводам форм микроорганизмов.

Заключение

В вегетационном опыте на темно-серой лесной почве консорциум аборигенных углеводородокисляющих микроорганизмов Б проявил высокую эффективность деструкции углеводов до 76,4%. Использование ассоциации Б способствовало также улучшению состояния нефтезагрязненной почвы по изученным биологическим параметрам (численность углеводородокисляющих, гетеротрофных

микроорганизмов, микромицетов, респираторная активность).

Таким образом, микроорганизмы–деструкторы углеводов широкого спектра действия, составляющие консорциум Б, могут быть использованы для создания эффективных биотехнологии рекультивации загрязненных почв в конкретных природно-климатических условиях.

Литература

1. Дегтярева, И.А. Оценка влияния природных ассоциаций углеводородокисляющих микроорганизмов на состояние нефтезагрязненной почвы / И.А. Дегтярева, А.Я. Хидиятуллина // Ученые записки Казанского ун-та. – Казань, 2011. – Том 153, кн. 3. – С. 137-143.
2. Дегтярева, И.А. Рекультивация нефтезагрязненной почвы при использовании микроорганизмов-деструкторов и бентонита / И.А. Дегтярева, А.Я. Хидиятуллина // Вестник Казанского технологического университета. - Казань, 2012. – Том 15, №5. – С. 134-136.
3. Дегтярева, И.А. Предпосевная обработка семян сельскохозяйственных культур диазотрофными и фосфатмобилизующими микроорганизмами // И.А. Дегтярева, А.Х. Яппаров, Д.С. Дмитричева, С.К. Зарипова // Вестник Казанского технологического университета. - Казань, 2012. – Том 15, №7. – С. 133-137.
4. Колешко, О.И. Экология микроорганизмов почвы. Лабораторный практикум / О.И. Колешко // Минск: Высшая школа. – 1981. – 175 с.
5. Методы почвенной микробиологии и биохимии / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: МГУ. – 1991. – 304 с.
6. Зенова, Г.М. Практикум по микробиологии почв / Г.М. Зенова, А.Л. Степанов, Н.А. Лихачева и др. // М.: Изд-во Моск. ун-та. – 2002. – 120 с.
7. Microbiological methods for assessing soil quality / ed. By J. Dloem, D.W. Hopkins, A. Benedetti // CABI Publishing. – 2006. – 307 p.
8. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. – М., 1998. – 35 с.
9. Maila, M.P. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants — perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review / M.P. Maila, T.E. Cloete // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2005. – V. 55. – P. 1-8.

© И. А. Дегтярева – д-р биол. наук, зав. лаб. агроэкологии и микробиологии ГНУ Татарский НИИ АХП Россельхозакадемии, kindness2006@yandex.ru; А. Я. Хидиятуллина – науч. сотр. той же лаборатории, peace-1963@mail.ru.

© I. A. Dektyareva - doctor of the biological sciences, State scientific establishment is the Tatar scientific research institute of agrochemistry and pedology of Russian academy of agricultural sciences, kindness2006@yandex.ru; A. Ya. Hidiyatullina - scientific worker, State scientific establishment is the Tatar scientific research institute of agrochemistry and pedology of Russian academy of agricultural sciences, peace-1963@mail.ru.