

УДК 631.46.631.445.41:631.84

ДИНАМІКА ЧИСЕЛЬНОСТІ МІКРООРГАНІЗМІВ У СІРОМУ ЛІСОВОМУ ҐРУНТІ, ЗАБРУДНЕНОМУ НАФТОПРОДУКТАМИ

І. М. МАЛИНОВСЬКА, Н. А. ЗІНОВ'ЄВА, Л. С. ЯСТРЕМСЬКА

Національний авіаційний університет, м. Київ

Досліджували динаміку чисельності мікроорганізмів у сірому лісовому ґрунті, забрудненому нафтопродуктами у концентрації від 0 до 20%. Встановлено, що протягом 7 місяців суттєво збільшується чисельність амоніфікувальних, полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів, мобілізаторів органо- і мінеральних фосфатів, а чисельність нітрифікувальних бактерій – зменшується з часом та із зростанням рівня забруднення. Кількість полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів, які приймають безпосередню участь у деструкції нафтопродуктів, збільшується порівняно із незабрудненим ґрунтом за концентрації нафтопродуктів 1% – у 1,78 рази, 5% – 33,3, за 10% – 60,9, за 20% – у 30,8 рази.

Чисельність автохтонних мікроорганізмів стає залежною від концентрації нафтопродуктів після 7-місячного інкубування забрудненого ґрунту. Одночасно із зменшенням чисельності автохтонних мікроорганізмів знижується активність мінералізації гумусових сполук: за концентрації нафтопродуктів 5% - у 10,5 рази, за концентрації 10% - 16,8, за концентрації 20% - у 7,50 рази.

Ключові слова: *мікробіоценоз, амоніфікувальні, нітрифікувальні, автохтонні, полісахаридсинтезувальні мікроорганізми, гумус, сірий лісовий ґрунт, нафтопродукти.*

Вступ. Інтенсивне використання нафтопродуктів як основного джерела енергії у промисловості та повсякденному житті призводить до збільшення

забруднених нафтопродуктами територій. Ґрунт акумулює більшу частину нафтових вуглеводневих забруднюючих речовин, які принципово змінюють властивості ґрунтів: фізичні, агрохімічні та мікробіологічні [3]. Накопичення забруднюючих речовин в тканинах тваринних і рослинних організмів може призвести до їх загибелі або виникнення мутацій [6]. Біодеградація нафтопродуктів природними популяціями мікроорганізмів є одним з основних неінвазивних механізмів, за допомогою яких вуглеводневі забруднювачі можуть бути видалені з навколишнього середовища [11].

Таким чином, необхідно розробити основи для екологічно безпечних та економічно обґрунтованих методів інтенсифікації вуглеводневих біодеградацій і відновлення родючості ґрунту.

Матеріали та методи досліджень. Модельний дослід був проведений з використанням сірого лісового крупнопилувато-легкосуглинкового ґрунту моніторингового полігону лабораторії інтенсивних технологій зернових колосових культур і кукурудзи ННЦ «Інститут землеробства НААН» (дослідне господарство «Чабани», Києво-Святошинський район Київської області). У 0-20 см шарі ґрунту містилося: гумусу 2,74%, лужногідролізованого азоту 9,33 мг, рухомого фосфору 36,8 мг та обмінного калію 15,3 мг на 100 г сухого ґрунту, $pH_{(KCl)}$ - 5,6. Фітоценоз ділянок перелогу сформувався у результаті спонтанного заростання протягом 22 років і представлений, в основному, злаковими травами. Ґрунт відбирали восени і перед проведенням дослідів відновлювали його біологічну активність шляхом зволоження та термостатування за 25°C протягом 21 доби. Нафтопродукти вносили в концентраціях від 0 до 20% у вигляді водної емульсії. У якості нафтопродуктів використовували авіаційне паливо марки ТС-1. Стан мікробіоценозу вивчали через 1, 23 доби і 7 місяців після внесення нафтопродуктів. Чисельність мікроорганізмів основних еколого-трофічних груп, спрямованість мікробіологічних процесів визначали методами, які описані раніше [4].

Результати та їх обговорення. Інкубування ґрунту, забрудненого нафтопродуктами протягом 7 місяців, призводило до суттєвих змін у чисельності та фізіологічній активності ґрунтових мікроорганізмів порівняно із вихідним станом і строком забруднення 23 доби. Так, чисельність амоніфікаторів протягом 7 місяців збільшилася порівняно із показниками першої доби за концентрації нафтопродуктів 1% - у 1,13 рази, 5% - 11,8, 10% - 31,4, 20% - у 27,4 рази, порівняно із 23 добою за концентрації нафтопродуктів 1% - у 1,18 рази, 5% - 5,46, 10% - 7,15, 20% - у 5,11 разів, що свідчить про більшу активність деструкції нафтопродуктів ґрунтовими мікроорганізмами протягом першого місяця (рис. 1). Чисельність мікроорганізмів у забрудненому нафтопродуктами ґрунті набагато перевищує їхню чисельність у контролі (незабруднений ґрунт), що пов'язано із включенням нафтопродуктів у метаболічні шляхи ґрунтових мікроорганізмів.

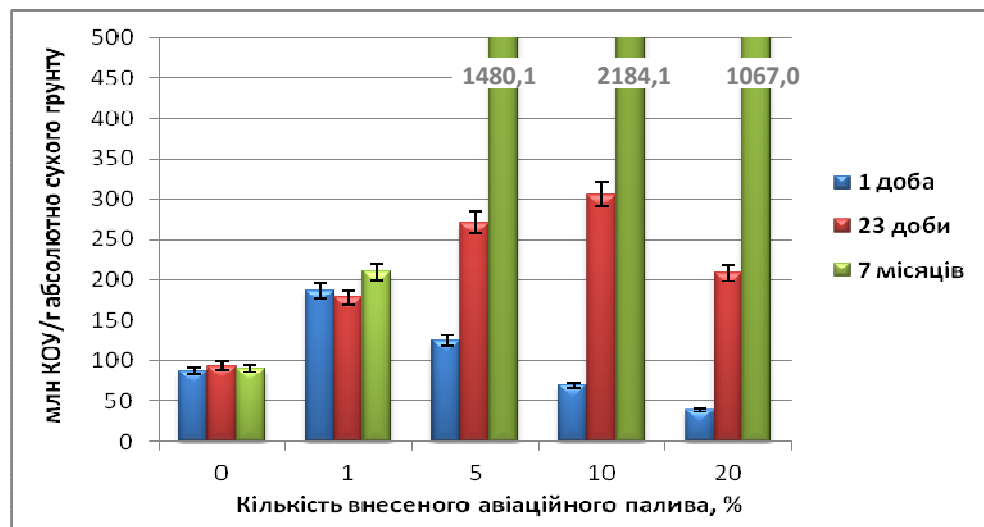


Рис. 1. Динаміка чисельності амоніфікувальних бактерій в сірому лісовому ґрунті протягом 7 місяців

Чисельність нітрифікаторів зменшувалась порівняно з показниками незабрудненого ґрунту через добу на 28,4-33,5%, через 23 доби ступінь інгібування з боку нафтопродуктів залишався таким же (за виключенням варіанту з 1% нафтопродуктів), однак, через 7 місяців чисельність нітрифікаторів істотно зменшувалась (в 4,9-14,7 рази) (рис. 2). Отже, негативна

дія нафтопродуктів щодо нітрифікаторів посилюється з часом і збільшується із зростанням рівня забруднення. Стійка негативна дія нафтопродуктів щодо нітрифікаторів, можливо, пояснюється тим, що нафтопродукти створюють в ґрунті анаеробні умови, і нітрифікатори, будучи облигатними аеробами, відчувають нестачу кисню. Причиною зниження чисельності та фізіолого-біохімічної активності нітрифікаторів, які є автотрофами, може бути також їхня висока чутливість до водорозчинних органічних речовин, концентрація яких поступово підвищується в ґрунті у процесі мікробної деградації молекул авіаційного керосину.

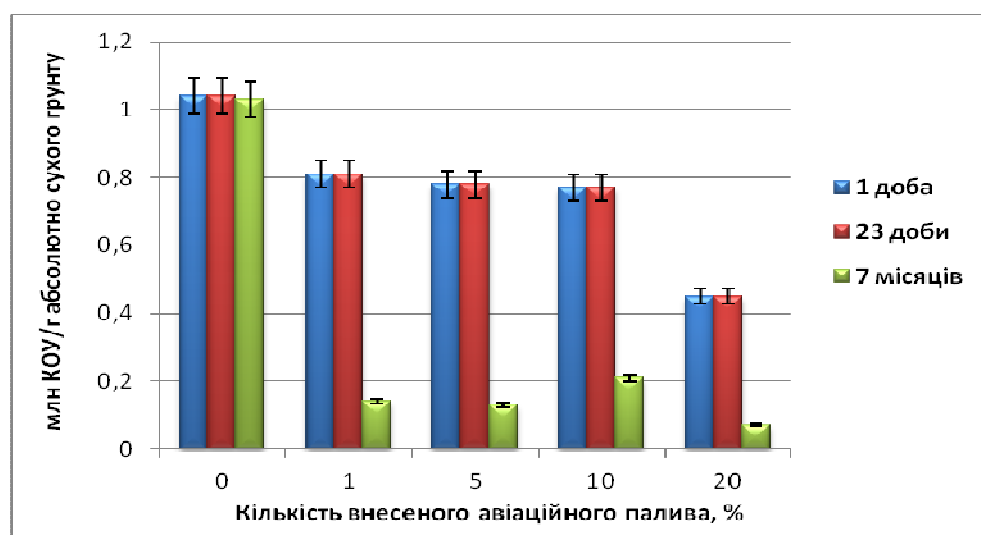


Рис. 2. Динаміка чисельності нітрифікувальних бактерій в сірому лісовому ґрунті протягом 7 місяців

Протягом всього періоду спостережень чисельність денітрифікаторів в забрудненому ґрунті перевищувала чисельність цих мікроорганізмів у контролі на 25,7-44,7% (рис. 3). Отримані нами дані підтверджуються результатами досліджень Н.М. Ісмаїлова [2], згідно яких забруднення ґрунту нафтою пригнічує діяльність нітрифікаторів і підвищує чисельність амоніфікаторів і денітрифікаторів. Про зниження нітрифікаційної здатності забрудненого нафтою ґрунту свідчать також дослідження М.Ю. Гілязова [1].

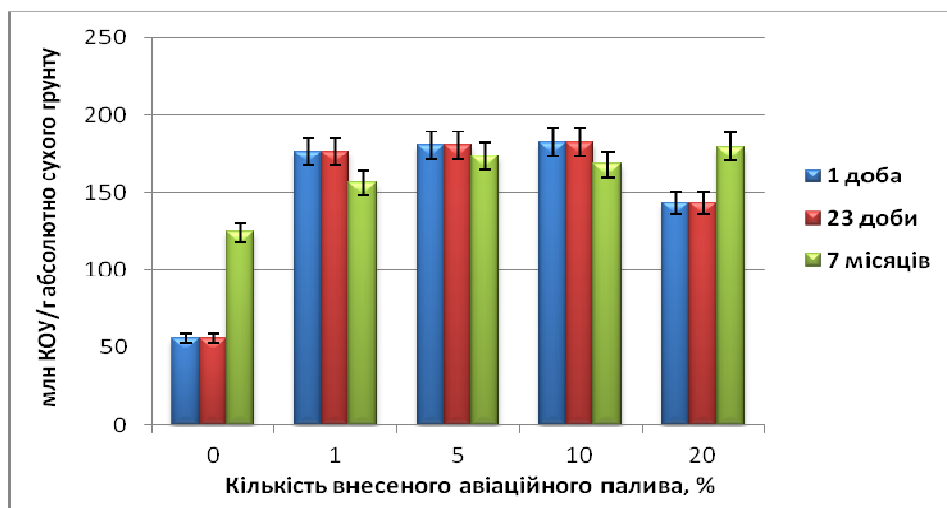


Рис. 3. Динаміка чисельності денітрифікувальних бактерій в сірому лісовому ґрунті протягом 7 місяців

Кількість мобілізаторів орґанофосфатів протягом інкубування забрудненого ґрунту зростала: через добу тільки за низьких концентрацій нафтопродуктів, через 23 доби за концентрації нафтопродуктів 1% - у 4,58 рази, 5% - 3,26, 10% - 2,78, 20% – у 2,33 рази (рис. 4).

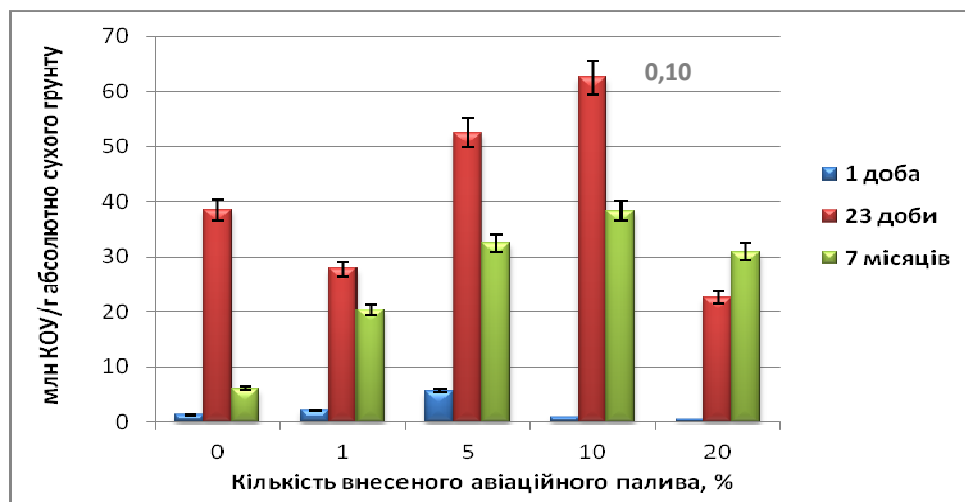


Рис. 4. Динаміка чисельності мобілізаторів орґанофосфатів в сірому лісовому ґрунті протягом 7 місяців

Через 7 місяців забруднення максимальна чисельність мобілізаторів орґанофосфатів спостерігалась у варіантах із концентрацією нафтопродуктів 5-20%. Аналогічна закономірність спостерігалась щодо зміни чисельності мобілізаторів мінеральних фосфатів. Поясненням цього явища може бути

зниження концентрації фосфору у нафтозабруднених ґрунтах [5], в результаті чого актуальною стає діяльність мікроорганізмів, які вивільняють фосфор з органічних і мінеральних сполук.

Через добу після внесення нафтопродуктів чисельність полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів зменшувалась порівняно з контролем на 21,1 – 89,9% (рис. 5), але через 23 доби спостерігалась зворотна закономірність: кількість полісахаридсинтезувальних бактерій збільшувалась порівняно з контролем за концентрації нафтопродуктів 1% - у 9,91 рази, 5% - 8,36, 10% - 42,6 та 20% - у 13,9 рази. Через 7 місяців інкубування забрудненого ґрунту чисельність полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів істотно збільшувалась порівняно із контролем: за концентрації нафтопродуктів 1% - у 1,78 рази, за 5% – 33,3, за 10% – 60,9, за 20% – у 30,8 рази. Враховуючи здатність бактеріальних екзополісахаридів емульгувати молекули гідрофобних поллютантів і збільшувати їхню доступність для біодеградації [7-10, 12], можна зробити висновок про те, що збільшення чисельності полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів є індикаторним показником інтенсифікації процесу деструкції нафтопродуктів.

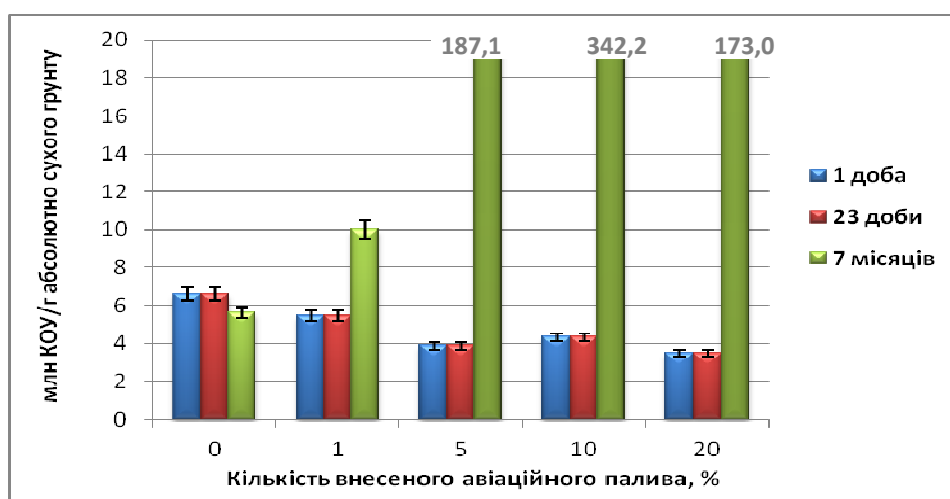


Рис. 5. Динаміка чисельності полісахаридсинтезувальних бактерій в сірому лісовому ґрунті протягом 7 місяців

Дані табл. 1. свідчать, що із збільшенням чисельності полісахаридсинтезувальних бактерій зростає не тільки абсолютна кількість деструктованих нафтопродуктів з 0,303 до 6,77 мг, а й їхній відсоток з 7,77 (за початкової концентрації нафтопродуктів 1%) до 8,68 % (за початкової концентрації нафтопродуктів 20%). Отже, тривале інкубування забрудненого нафтопродуктами ґрунту призводить до суттєвого збільшення чисельності полісахаридсинтезувальних бактерій, які приймають безпосередню участь у деструкції нафтопродуктів, роблячи їх більш доступними для споживання мікроорганізмами.

Таблиця 1

**Деградація нафтопродуктів за їх різних початкових концентрацій
у сірому лісовому ґрунті протягом 7 місяців**

| Варіант | Вміст нафтопродуктів у ґрунті за терміном інкубування, мг/г ґрунту | | |
|-------------------------------|--|-------------|-------------|
| | 0 діб | 23 доби | 7 місяців |
| Контроль: оброблення водою | 0 | 0 | 0 |
| 1% нафтопродуктів | 7,80 ± 1,02 | 3,6 ± 0,45 | 2,78 ± 0,37 |
| 5% нафтопродуктів | 39,0 ± 4,60 | 17,9 ± 2,30 | 14,9 ± 2,02 |
| 10% нафтопродуктів | 78,0 ± 9,60 | 35,6 ± 4,70 | 34,0 ± 4,24 |
| 20% нафтопродуктів | 156,0 ± 12,6 | 73,0 ± 10,1 | 71,2 ± 9,20 |

Чисельність автохтонних мікроорганізмів як на першу, так і на 23 добу інкубації не залежала від рівня забруднення і статистично не відрізнялася від контрольних показників (рис. 6). Однак, після 7-місячного інкубування забрудненого ґрунту чисельність автохтонних мікроорганізмів стає залежною від концентрації нафтопродуктів: чим вищий рівень забруднення, тим менший вміст мікроорганізмів цієї групи. Одночасно із зменшенням чисельності автохтонних мікроорганізмів знижувалась і активність мінералізації гумусових сполук: за концентрації нафтопродуктів 5% - у 10,5 рази, за концентрації 10% - 16,8, за концентрації 20% - у 7,50 рази (табл. 2). Можливою причиною сповільнення мінералізації гумусу може бути використання нафтопродуктів як

альтернативного джерела вуглецю для автохтонних і гетеротрофних мікроорганізмів. Отримані дані підтверджуються результатами Ф.Х. Хазієва з співав. [5], згідно яких при забрудненні нафтою у ґрунті зростає вміст гумусу, поглинутих основ, значення рН та інших показників.

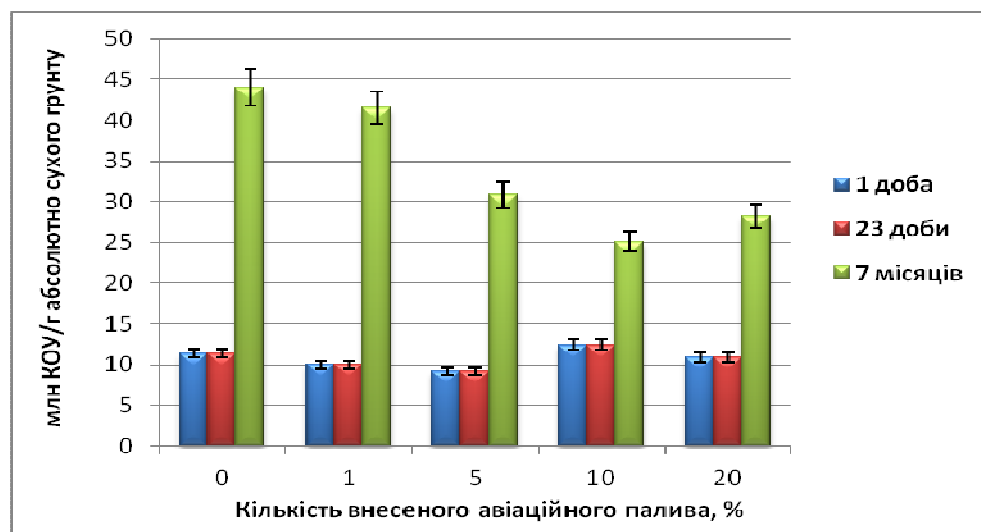


Рис. 6. Динаміка чисельності автохтонних бактерій в сірому лісовому ґрунті протягом 7 місяців

Таблиця 2

Показники інтенсивності мінералізаційних процесів і фітотоксичні властивості сірого лісового ґрунту через 7 місяців після внесення нафтопродуктів у зростаючих концентраціях

| Варіант | Індекс педотрофності | Коефіцієнт оліготрофності | Коефіцієнт мінералізації азоту | Активність мінералізації гумусу, % | Маса 100 рослин тест-культури озимої пшениці, г | | |
|----------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---|---------|---------------|
| | | | | | стебло | коріння | загальна маса |
| Контроль: оброблення водою | 1,25 | 0,72 | 1,12 | 39,2 | 8,33 | 5,97 | 14,3 |
| 1% нафтопродуктів | 0,55 | 0,41 | 0,97 | 35,6 | 7,35 | 5,67 | 13,0 |
| 5% нафтопродуктів | 0,56 | 0,31 | 0,88 | 3,73 | 7,29 | 7,18 | 14,5 |
| 10% нафтопродуктів | 0,49 | 0,19 | 0,96 | 2,34 | 6,06 | 5,29 | 11,4 |
| 20% нафтопродуктів | 0,51 | 0,34 | 0,78 | 5,23 | 2,25 | 3,75 | 6,00 |

Таким чином, тривале забруднення ґрунтів нафтопродуктами призводить до зміни чисельності мікроорганізмів більшості функціональних і еколого-трофічних груп. Основною причиною цих змін є використання мікроорганізмами молекул нафтопродуктів як джерела енергії і субстрату, а також зміна фізико-хімічних властивостей ґрунту як середовища існування досліджених мікроорганізмів.

ВИСНОВКИ

1. Інкубування ґрунту, забрудненого нафтопродуктами, протягом 7 місяців призводить до суттєвих змін у чисельності мікроорганізмів основних функціональних і еколого-трофічних груп порівняно з вихідним станом і строком забруднення 1 і 23 доби. Суттєво збільшувалась чисельність амоніфікаторів, мобілізаторів органо- і мінеральних фосфатів, чисельність нітрифікаторів, навпроти, зменшувалась з часом та із зростанням рівня забруднення.

2. Через 7 місяців інкубування забрудненого ґрунту чисельність полісахаридсинтезувальних мікроорганізмів, які приймають безпосередню участь у деструкції нафтопродуктів, збільшувалась порівняно із незабрудненим ґрунтом за концентрації нафтопродуктів 1% - у 1,78 рази, 5% – 33,3, за 10% – 60,9, за 20% – у 30,8 рази, що корелює з активністю розкладання молекул нафтопродуктів.

3. Чисельність автохтонних мікроорганізмів стає залежною від концентрації нафтопродуктів після 7-місячного інкубування. Одночасно із зменшенням чисельності автохтонних мікроорганізмів знижувалась активність мінералізації гумусових сполук: за концентрації нафтопродуктів 5% - у 10,5 рази, за концентрації 10% - 16,8, за концентрації 20% - у 7,50 рази.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гилязов М.Ю. Изменение некоторых агрохимических свойств выщелоченного чернозема при загрязнении нефтью / М. Ю. Гилязов // Агрохимия. – 1980. – № 12. – С. 72-75.

2. Исмаилов Н.М. Влияние нефтезагрязнения на круговорот азота в почве / Н.М. Исмаилов // Микробиология. – 1983. – Т. 52. – Вып. 6. – С. 1003-1007.
3. Применение препарата для рекультивации нефтезагрязненных почв / [А.К. Злотников, Л.К. Садовникова, А.В. Баландина, К.М. Злотников, А.В. Казаков] // Вестник РАСХН. – 2007. – № 1. – С. 65-67.
4. Малиновська І.М. Мікробіологічні процеси в ризосфері рослин у забрудненому нафтопродуктами ґрунті / І.М. Малиновська, Н.А. Зінов'єва // Микробиологія і біотехнологія. – 2011. – № 2. – С.83-91.
5. Хазиев Ф.Х. Влияние нефтяного загрязнения на некоторые компоненты агроэкосистемы / Ф.Х. Хазиев, Е.И. Тишкина, Н.А. Киреева // Агрехимия. – 1988. – № 2. – 89 с.
6. Alvarez P.J.J. Substrate interactions of benzene, toluene, and para-xylene during microbial degradation by pure cultures and mixed culture aquifer slurries / P.J.J. Alvarez, T.M. Vogel // Applied and Environmental Microbiology. – 1991. – Vol. 57. – № 10. – P. 2981–2985.
7. Noordman W.H. Rhamnolipid stimulates uptake of hydrophobic compounds by *Pseudomonas aeruginosa* / W.H. Noordman, D.B. Janssen. // Appl. Environ. Microbiol. Rev. – 2002. – Vol. 68. – № 9. – P. 4502-4508.
8. Rosenberg M. High and low molecular mass microbial surfactants / M. Rosenberg, E.Z. Ron // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1999. – Vol. 52. – № 2. – P. 154-162.
9. Pines O. Role of emulsan in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 / O. Pines, D.L. Gutnic // FEMS Microbiol. Lett. – 1986. – Vol. 22. – № 1. – P. 307-311.
10. Rosenberg M. Role of adherence in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 on hexadecane / M. Rosenberg, E. Rosenberg // J. Bacteriol. – 1981. – Vol. 148. – N 1. – P. 51-57.

11. Ulrici W. Contaminant soil areas, different countries and contaminant monitoring of contaminants / W. Ulrici // Soil Decontamination Biotechnology. – 2000. – Vol. 11. – P. 5-42.

12. Walzer G. The Acinetobacter outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier / G. Walzer, M. Rosenberg, E. Z. Ron // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 8. – № 6. – P. 1026-1032.

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ МИКРООРГАНИЗМОВ В ЗАГРЯЗНЕННОЙ НЕФТЕПРОДУКТАМИ СЕРОЙ ЛЕСНОЙ ПОЧВЕ

И. М. Малиновская, Н. А. Зиновьева, Л. С. Ястремская

Национальный авиационный университет, г. Киев

Исследовали динамику численности микроорганизмов в серой лесной почве, загрязненной нефтепродуктами в концентрации от 0 до 20%. Установлено, что загрязнение протяженностью 7 месяцев сопровождается увеличением численности аммонификаторов, мобилизаторов органических и минеральных фосфатов, полисахаридсинтезирующих микроорганизмов, и снижением численности нитрификаторов. Количество полисахаридсинтезирующих бактерий, принимающих непосредственное участие в деструкции нефтепродуктов, увеличивалась по сравнению с незагрязненной почвой при концентрации нефтепродуктов 1% - в 1,78 раза, при 5% – 33,3, при 10% – 60,9, при 20% – в 30,8 раза.

Зависимость численности автохтонных микроорганизмов от концентрации нефтепродуктов наступает после 7-месячной инкубации загрязненной почвы. Одновременно с уменьшением численности автохтонных микроорганизмов ослабляется активность минерализации гумусовых соединений: при концентрации нефтепродуктов 5% - в 10,5 раза, при концентрации 10% - 16,8, при концентрации 20% - в 7,5 раза.

Ключевые слова: микробиоценоз, аммонификаторы, автохтонные и полисахаридсинтезирующие микроорганизмы, нитрификаторы, гумус, серая лесная почва, нефтепродукты.

THE DYNAMICS OF THE NUMBER OF BACTERIA IN PETROLEUM CONTAMINATED GRAY FOREST SOIL

I. M. Malinovska, N. A. Zinovieva, L. S. Yastremska

National Aviation University, Kiev

We investigated the dynamics of microorganisms in the gray forest soil contaminated by petroleum products in concentrations from 0 to 20%. Found that the pollution over 7 months was accompanied by increased numbers of ammonifying, mineral and organo phosphate mobilizing, polysaccharide synthesizing microorganisms and decrease the number of nitrifying bacteria. Number of polysaccharide synthesizing bacteria are directly involved in the degradation of petroleum products increased compared to non-contaminated soil at a concentration of 1% oil - 1.78 times at 5% - 33.3, 10% - 60.9, with 20% - 30.8 times.

The dependence of the number of autochthonic microorganisms on the concentration of oil comes after a 7-month incubation of contaminated soil. Along with the decrease in the number of autochthonous microbial activity weakened mineralization of humus compounds: oil products at a concentration of 5% - 10.5 times, with a concentration of 10% - 16.8, at a concentration of 20% - to 7.5 times.

Keywords: *microbiocenosis, ammonifying, polysaccharide synthesizing, autochthonic, nitrifying microorganisms, humus, gray forest soil, oil products.*