

На правах рукописи



СМОРКАЛОВ Иван Александрович

**РОЛЬ ФОТОГЕТЕРОТРОФНЫХ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ В
САМООЧИЩЕНИИ ПОЧВЫ ОТ УГЛЕВОДОРОДОВ**

03.00.16 – экология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Уфа – 2009

Работа выполнена на кафедре физиологии и биохимии растений Уральского государственного университета им. А.М. Горького

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Фирсов Николай Николаевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Киреева Наиля Ахняфовна

доктор биологических наук, профессор
Кураков Александр Васильевич

Ведущая организация: **Институт биологии Коми НЦ УрО РАН**

Защита состоится «18» сентября 2009 г. в 14-00 часов на заседании Объединенного диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054, г.Уфа, Проспект Октября, 69.

Тел. /факс(347) 235-62-47.

E-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте <http://ib.anrb.ru/sovet.html>

Автореферат разослан « 4 » августа 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат биологических наук, доцент



Уразгильдин Р.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Загрязнение природной среды нефтью и нефтепродуктами – острейшая экологическая проблема во многих регионах России и во всем мире. Ежегодно в мире добывается свыше 3.5 млрд. тонн сырой нефти, из них в 2001 году в России было добыто 348 млн. Химическое загрязнение окружающей среды происходит на всех стадиях технологического процесса: при добыче, транспортировке, хранении и переработке нефти. При одном прорыве нефтепровода в среднем вытекает 2 т нефти, при этом в негодность приводится 1 тыс. м² земли. Из-за аварий нефтепроводов в России ежегодно разливается 15-20 млн. тонн нефти (Арзамасцев, 2008).

При попадании нефти и нефтепродуктов в почву происходят глубокие и часто необратимые изменения физических, морфологических, физико-химических, микробиологических свойств, что делает невозможным дальнейшее хозяйственное использование загрязненных территорий. Углеводороды нефти в процессе трансформации способны образовывать токсичные соединения, обладающие канцерогенными свойствами и способностью поступать из почвы в растения, что значительно снижает качество возделываемых культур и создает определенную угрозу для здоровья человека (Биодеградация нефти и..., 2003).

Биотехнологии защиты окружающей среды – это тот инструментарий, который призван обеспечить восстановление затронутых деятельностью человека экосистем. В настоящее время происходит развитие экобиотехнологий, которые основаны на поиске, селекции и интродукции наиболее активных микроорганизмов-деструкторов, получении ассоциаций микроорганизмов, обладающих желаемыми свойствами. (Янкевич, 2002).

В случае загрязнения углеводородами, помимо методов рекультивации, предусматривающих интродукцию углеводородокисляющих микроорганизмов в экосистему, большое значение приобретают методы, основанные на стимуляции естественной нефтеокисляющей микрофлоры (Коронелли, 1996), т.к. внесение углеводородокисляющих микроорганизмов не более эффективно, чем стимулирование аборигенной микрофлоры (Atlas, Cerniglia, 1995), а иногда и менее эффективно (A feasibility study on..., 1997). Поэтому необходимо изучать все группы микроорганизмов, способные участвовать в деструкции нефти и нефтепродуктов. Целесообразно изучение ассоциаций микроорганизмов с различными спектрами биохимических особенностей и их взаимодействия в процессе биодеградации углеводородов нефти. Но в исследованиях, посвященных углеводород-ассимилирующим микроорганизмам, большинство авторов сосредотачивают свое внимание на

аэробных хемотрофных бактериях и микроскопических грибах. В то же время существуют исследования, показавшие важную роль фототрофных бактерий в деградации нефтепродуктов (Драчук, 2004; Effect of Photosynthetic..., 2004), при этом сведения о возможном участии в биodeградации нефти фотогетеротрофных организмов очень ограничены.

Пурпурные несерные бактерии являются специфической микрофлорой почв, загрязненных углеводородами (Драчук, 2004), обладают широким спектром метаболических путей, в том числе способностью к азотфиксации. Поэтому, их участие в биodeградации нефти в составе смешанных микробных культур или как самостоятельных деструкторов углеводородов представляет большой интерес. Мало изученным является вопрос о распространении этих микроорганизмов в почвах и грунтах, подверженных загрязнению нефтью или нефтепродуктами, и роли их в самоочищении земель от подобных поллютантов.

Цель работы: выяснить роль фотогетеротрофных пурпурных бактерий в процессах самоочищения почв и грунтов от углеводородного загрязнения.

Задачи:

- 1) Изучить ход самоочищения почвы и грунта от углеводородов при экспериментальном загрязнении: при этом проследить динамику численности аэробных нефтеокисляющих бактерий, нефтеокисляющих грибов, несерных пурпурных бактерий и интенсивность деградации углеводородов в течение 2-3 сезонов.
- 2) Выявить закономерности появления и распространения фотогетеротрофных бактерий в почвах и грунтах, загрязненных нефтепродуктами.
- 3) Оценить роль разных групп микроорганизмов в биodeградации углеводородов в почве.
- 4) Определить влияние несерных пурпурных бактерий на скорость деградации углеводородов в почве и грунте.

Научная новизна. Проведено параллельное наблюдение за динамикой процессов самоочищения от углеводородов почвы и грунта с различными абиотическими и биологическими показателями, начиная с самого момента загрязнения. При анализе имеющихся и вновь полученных данных выявлены условия, влияющие на появление и распространение пурпурных бактерий в почвах, загрязненных углеводородами. Получены данные о вкладе несерных пурпурных в деградацию нефтепродуктов в почве. Впервые показано положительное влияние несерных пурпурных бактерий на процессы самоочищения земель от углеводородного загрязнения.

Теоретическое и практическое значение. Полученные данные уточняют ход микробиологических процессов в загрязненных углеводородами почвах, дают понятие о роли отдельных групп нефтеокисляющих микроорганизмов в биодegradации этих поллютантов и о взаимоотношении между различными группами микроорганизмов. Результаты работы расширяют представления об экологии пурпурных бактерий, дают представление о роли этих микроорганизмов в процессах самоочищения почв от нефтепродуктов. Данные о влиянии культур фотогетеротрофных бактерий на эффективность биодegradации углеводородов в почве, позволяют использовать их для стимуляции аборигенной нефтеокисляющей микрофлоры при проведении рекультивации земель, загрязненных нефтью и нефтепродуктами.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Скорость самоочищения почвы от нефтепродуктов зависит от ее физико-химических свойств и функционального состояния микробоценоза. Устоявшийся и сбалансированный микробоценоз более устойчив к незначительному (<5%) углеводородному загрязнению и поэтому эффективней справляется с таким стрессом.

2. На появление и распространение фотогетеротрофных бактерий в почвах и грунтах влияют такие факторы, как количество углеводородов, биотический прессинг, численность нефтеокисляющих грибов.

3. Несерные пурпурные бактерии повышают эффективность биодegradации углеводородов, проводя их аэробное окисление и/или стимулируя основные группы нефтеокисляющих организмов. Между фотогетеротрофными бактериями и нефтеокисляющими грибами возможны мутуалистические взаимоотношения.

Апробация работы. Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на конференциях молодых ученых «Экология: от Арктики до Антарктики», Екатеринбург, 2007; «Экология в современном мире: взгляд научной молодежи», Улан-Уде, 2007; III Всероссийская научно-практическая конференция «Проблемы экологии Южного Урала», Оренбург, 2007; «Биосфера земли: прошлое, настоящее, будущее», Екатеринбург, 2008; «Современные методы и подходы в биологии и экологии», Уфа, 2008.

Публикации. По материалам исследований опубликовано 5 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов и списка литературы, включающего 110 наименований, из которых 30 на иностранных языках. Работа изложена на 142 страницах компьютерного текста, содержит 4 таблицы и 35 рисунков.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ЭКОЛОГИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ (обзор литературы)

В разделе рассматриваются работы, посвященные вопросам изменения характеристик почв при загрязнении углеводородами, деградации нефтепродуктов в различных видах почв, влияния углеводородного загрязнения на почвенные микробсообщества, а так же конкретным представителям нефтеокисляющих микроорганизмов, и фотогетеротрофным бактериям, как компонентам микробсообществ нефтезагрязненных земель.

ГЛАВА 2. ПУТИ МЕТАБОЛИЗМА УГЛЕВОДОРОДОВ (обзор литературы)

В главе дается обзор работ, посвященных механизмам усвоения углеводородов отдельными микроорганизмами (аэробное, анаэробное и неполное окисление) и возможности деградации нефтепродуктов смешанными культурами микробов.

ГЛАВА 3. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Характеристика объектов исследования. Объектами исследования послужили:

1. Грунт, образовавшийся в связи с нарушением почвы при строительстве плотины Усть-Сысертского водохранилища – средняя глина (Практикум по..., 1986), кислотность – 6.1, количество доступного фосфора – 17.51 мг $P_2O_5/100$ г, содержание калия – 44.69 мг $K_2O/100$ г, массовая доля щелочно-гидролизуемого азота по Корнфилду – 9.52 мг/100 г, массовая доля углерода – 3.61 %. Горизонты не выражены, на глубине 10 см начинается слой щебня.

2. Нативная почва прируслового растительного комплекса – легкий суглинок, кислотность – 5.2, количество доступного фосфора – 4.02 мг $P_2O_5/100$ г, содержание калия – 7.23 мг $K_2O/100$ г, массовая доля щелочно-гидролизуемого азота по Корнфилду – 13.72 мг/100 г, массовая доля углерода – 5.49%. Горизонты на глубине взятия проб не выражены

Исследуемые почвы находятся друг от друга на расстоянии около 500 м, на ровных площадках, на одинаковом удалении от берега реки.

3.2. Закладка опытных площадок. Площадки 0.5×0.5 м² освобождали от растительного покрова. Затем вносили поллютант: 2 л дизельного топлива и 2 л отработанного моторного масла в площадки на грунте, 2 и 5 л дизельного топлива в площадки на почве, и давали отстояться сутки. Контролем служили

площадки без углеводородного загрязнения. Все опытные и контрольные площадки были заложены в двух повторностях.

3.3. Взятие почвенных образцов. Взятие почвенных проб проводили в мае–сентябре 2006-2008 годов. Образцы почвы собирали методом «конверта»: из пяти произвольных мест на площадке с глубины 1-10 см брали по 3-5 г почвы и перемешивали – получали одну пробу. Для каждой площадки образцы были взяты в трехкратной повторности. Отобранные образцы в течение не более 4-х часов доставляли в лабораторию и подвергали анализам.

3.4. Определение содержания углеводов в почвенных образцах. Определение содержания углеводов проводили методом инфра-красной спектрометрии с экстракцией в четыреххлористом углероде (ЧХУ) на приборе КН-2.

0.5 г почвы, освобожденной от растительных остатков, заливали 5 мл ЧХУ (химически чистый для экстракции из водных сред) и экстрагировали в темноте не менее 3-х часов при регулярном перемешивании (Экстракция и анализ..., 2005). Экстракты фильтровали через бумажные фильтры, предварительно промытые ЧХУ. Для удаления воды из полученных экстрактов использовали заранее подготовленный безводный сульфат натрия (не менее 1-2 г сульфата на 5 мл экстракта), для чего перед употреблением безводный сульфат натрия высушивали при температуре 105-110°С в течение 8 часов в сушильном шкафу (Методика выполнения ..., 2000).

Частью высушенного экстракта промывали кювету, а оставшийся экстракт использовали для измерения. В случае выхода концентрации углеводов в определяемом образце за пределы измерения прибора, производили разведение экстракта четыреххлористым углеродом.

Концентрацию нефтепродуктов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{X_{изм} * V_{ЧХУ} * K_p}{m_{почвы}}, \text{ где}$$

$X_{изм}$ – показание прибора (мг/л);

$V_{ЧХУ}$ – объем четыреххлористого углерода, использованного для экстракции (л);

K_p – коэффициент разбавления;

$m_{почвы}$ – навеска почвы для экстракции, в пересчете на 1 г сухого вещества почвы. Почву высушивали пять часов при 100-105°С (Аринюшкина, 1970).

3.5. Определение численности почвенных микроорганизмов.

3.5.1. Определение численности аэробных хемотрофных

нефтеокисляющих микроорганизмов. Почвенные разведения, используемые для определения количества микроорганизмов в почве, готовили по общепринятой методике (Лабораторные занятия по..., 1960; Методы почвенной микробиологии, 1980).

Для определения количества аэробных нефтеокисляющих бактерий и нефтеокисляющих мицелиальных грибов проводили поверхностный посев на агаризованные питательные среды, разлитые в стерильные чашки Петри. Для определения числа аэробных нефтеокисляющих бактерий использовали агаризованную среду следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 1.0; KH_2PO_4 – 1.0; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 2.0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; Na_2CO_3 – 0.2; NaCl – 1.0; $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.02; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.01; агар–агар – 15. В качестве единственного источника углерода и энергии вносили 1 об. % дизельного топлива (Численность, видовой состав..., 1991). Количество нефтеокисляющих мицелиальных грибов определяли на агаризованной среде Чапека без сахарозы с дизельным топливом (1 об. %). После стерилизации pH среды доводили стерильным раствором H_3PO_4 до pH 5.0 – 5.5 (Каневская, 1984). Чтобы исключить рост бактерий на этой среде в неё добавляли антибиотики: бициллин-5 (200 ед./мл) и тетрациклин (5 мкг/мл) (Литвинов, 1969; Методы экспериментальной микологии, 1982).

На этих же средах выделяли чистые культуры аэробных нефтеокисляющих бактерий и нефтеокисляющих грибов, которые в дальнейшем использовали для постановки опытов.

3.5.2. *Определение количества фотогетеротрофных бактерий.*

Определение количества анаэробных фотогетеротрофных бактерий в почве проводили методом посева в толщу питательной среды. В стерильные пробирки разливали по 1 мл соответствующего почвенного разведения, затем добавляли по 9 мл расплавленной и охлажденной до +40-50°C среды для пурпурных несерных бактерий, тщательно перемешивая содержимое пробирок. Для создания анаэробноз столбик агаризованной среды в пробирке заливали слоем стерильного вазелинового масла. Пробирки инкубировали на свету (в люминостате) при температуре +30°C в течение 30 суток. По числу образовавшихся в толще агара дисковидных тёмно-красных колоний определяли количество фотогетеротрофных пурпурных бактерий в почве. Результаты выражали в пересчете на 1 г абсолютно сухого вещества почвы. Для выявления пурпурных бактерий в почве также осуществляли постановку накопительных культур, для чего в стеклянные флаконы объемом 50 или 100 мл помещали 1 г исследуемой почвы, заливали соответствующей стерильной

жидкой средой, закрывали флакон резиновой пробкой и инкубировали на свету в термостате при +30°C в течение 30 суток.

Среда для пурпурных бактерий (среда ПНБ) имела следующий состав (г/л): яблочная кислота – 2.5; NH₄Cl – 1.2; MgSO₄·7H₂O – 0.2; CaCl₂·6H₂O – 0.07; K₂HPO₄ – 0.9; KH₂PO₄ – 0.6; дрожжевой экстракт – 0.5; агар-агар – 15; раствор микроэлементов по Пфеннигу – 4 мл. Уровень pH среды стерильным раствором H₃PO₄ устанавливали в пределах 6.8 – 7.0.

Питательные среды стерилизовали в автоклаве при давлении 1.0 избыточная атмосфера в течение 30 минут.

3.6. Выделение чистых культур пурпурных бактерий. Для выделения чистых культур использовали колонии, которые выросли в пробирках при подсчете пурпурных бактерий в почве и грунте. В стерильных условиях выбранные колонии пастеровскими пипетками переносили в пробирки с жидкой средой ПНБ, которые помещали в люминостат. Культуры бактерий выращивали при +30°C. Процедуру выделения бактерий из отдельных колоний для каждого штамма повторяли 5-6 раз.

Чистоту выделенных культур контролировали истощающим посевом на МПА в чашках Петри, а так же путем регулярного просмотра культур в световом микроскопе.

3.7. Снятие спектров поглощения живых клеток пурпурных бактерий. На спектрофотометре Shimadzu UV-1650PC снимали спектры поглощения чистых культур пурпурных бактерий, изолированных из экспериментально загрязненных углеводородами почвы и грунта, а так же культур *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodopseudomonas sphaeroides* из коллекции кафедры микробиологии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, и культур *Rhodopseudomonas acidophila* (штамм S1), *Rhodopseudomonas* sp. (штамм 12-1a) из коллекции лаборатории микробиологии биологического факультета УрГУ им. А.М. Горького. В опыте использовали 14-дневные культуры пурпурных бактерий. Контролем служила стерильная жидкая среда ПНБ.

3.8. Определение вклада разных групп микроорганизмов в деградацию дизельного топлива в почве.

3.8.1. Подготовка почвы. Почву, отобранную с глубины 2-15 см, освобождали от крупных растительных остатков и мелкого щебня, измельчали до частиц с максимальным размером 1.5-2 мм и сушили 4 часа при 110° С. По 15 г высушенной и измельченной почвы помещали в 20 мл пробирки, которые закрывали ватными пробками, и проводили трехкратную стерилизацию автоклавированием (0.5 ати, 30 мин).

3.8.2. *Постановка опыта.* В пробирки с почвой, подготовленной по п. 3.8.1., вносили культуры микроорганизмов из коллекции лаборатории микробиологии биологического факультета УрГУ им. Горького: фотогетеротрофные бактерии (ФТБ) *Rhodopseudomonas acidophila* штамма S1, и *Rhodopseudomonas palustris* в количестве 5×10^6 клеток/г, адаптированные к дизельному топливу грибы (НГ) (5×10^6 КОЕ/г) и штаммы нефтеокисляющих бактерий (НОБ) (50×10^6 клеток/г), выделенные из почвы загрязненной дизельным топливом, во всех возможных комбинациях (НОБ, НГ, ФТБ, НОБ+НГ, НОБ+ФТБ, НГ+ФТБ, НОБ+НГ+ФТБ). Стерильное дизельное топливо вносили в количестве 2.5 % и увлажняли почву до 60% полной влагоемкости.

Контролем служила почва без углеводородного загрязнения и почва с 2.5% дизельного топлива без внесения культур микробов.

Для определения влияния концентрации дизельного топлива на эффективность его усвоения культурами НГ и ФТБ, в пробирки с подготовленной почвой вносили их культуры в тех же количествах и стерильное дизельное топливо в количестве 0, 2.5, 5, 10%.

Контролем служила почва, в которую не вносили микроорганизмы.

Пробирки инкубировали в темноте 56 дней в термостате при постоянной температуре 20⁰С и влажности.

Определение численности микроорганизмов и количества углеводов проводили на 14, 28, 56 сутки.

Для измерения концентрации углеводов, почву заливали 20 мл ЧХУ и экстрагировали как в п. 3.4. Для определения численности микроорганизмов, почву из пробирок количественно переносили в колбу с 150 мл стерильной водопроводной воды – таким образом, получали первое разведение. Далее действовали как в п. 3.5.

3.9. Отбор почвенных образцов с «естественно»-загрязненных полигонов. Пробы были отобраны на территории Свердловской области в местах точечных загрязнений нефтепродуктами: места стоянки сельскохозяйственной техники, около коллективных садов (на торфяной почве), с полотна железной дороги. Контролем служили пробы без визуальных признаков углеводородного загрязнения, отобранные на участках с травянистым покровом в непосредственной близости от загрязненных участков. Анализ проб проводили по п.п. 3.4. и 3.5.

3.10. Выявление пороговой для выживания пурпурных бактерий концентрации дизельного топлива в почве. В пробирки с почвой, подготовленной по п. 3.8.1. вносили культуру *Rps. palustris* (10^6 клеток/г) и стерильное дизельное топливо в количестве 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%,

40%, 45%, 50% и культивировали в термостате при 30°C в темноте в течение 3 месяцев.

Для обнаружения выживших бактерий, делали посевы из почвенных разведений в пробирки с жидкой средой ПНБ и инкубировали в люминоостате при температуре +30°C в течение 30 суток.

3.11. Влияние фототрофных бактерий на скорость деградации дизельного топлива в почве в природных условиях. На исследуемых почвах заложили площадки как в п. 3.2., в которые внесли по 2 л дизельного топлива. Через 14 суток внесли культуры *Rps. palustris*. Контролем служили площадки без внесения пурпурных бактерий.

Через 2 месяца провели измерение количества углеводов и микроорганизмов в почве и грунте опытных и контрольных площадок, как в п.п. 3.4 и 3.5.

3.12. Определение влияния биотического фактора на выживаемость пурпурных бактерий в почве, не загрязненной углеводородами. Провели инокуляцию бактериями *Rps. palustris* исследуемых грунта и почвы в природных условиях и пробирок со стерильными образцами грунта и почвы. Пробирки инкубировали в термостате при температуре 30°C. Через 3 месяца определили наличие пурпурных бактерий постановкой накопительных культур из разведений почвы и грунта из пробирок и из природных условий.

3.13. Обработка результатов. Статистическая и математическая обработка результатов осуществляли в программах Microsoft Excel (Microsoft Inc., 1985–2000), Statistica for Windows v.6.0 (Stat Soft Inc., 1984–2001), Microcal Origin v.6.0 (Microcal Software Inc., 1991–1999), рассчитывая среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической. Достоверность различий между средними величинами оценивали с использованием U-критерия Манна и Уитни (уровень значимости $p < 0.05$). В некоторых случаях проводили полуэмпирическое моделирование (fitting).

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Ход самоочищения почвы и грунта от углеводов.

4.1.1. Изменение концентрации углеводов. Данные по изменению концентрации углеводов в грунте и почве в течение 2-х сезонов представлены на рис. 1.

Начальное загрязнение в грунте составило 17.72 мг углеводов на грамм абсолютно-сухой почвы для площадок, загрязненных дизельным топливом, и 62.07 мг углеводов на 1 грамм почвы на площадках, загрязненных отработанным моторным маслом. Начальная концентрация

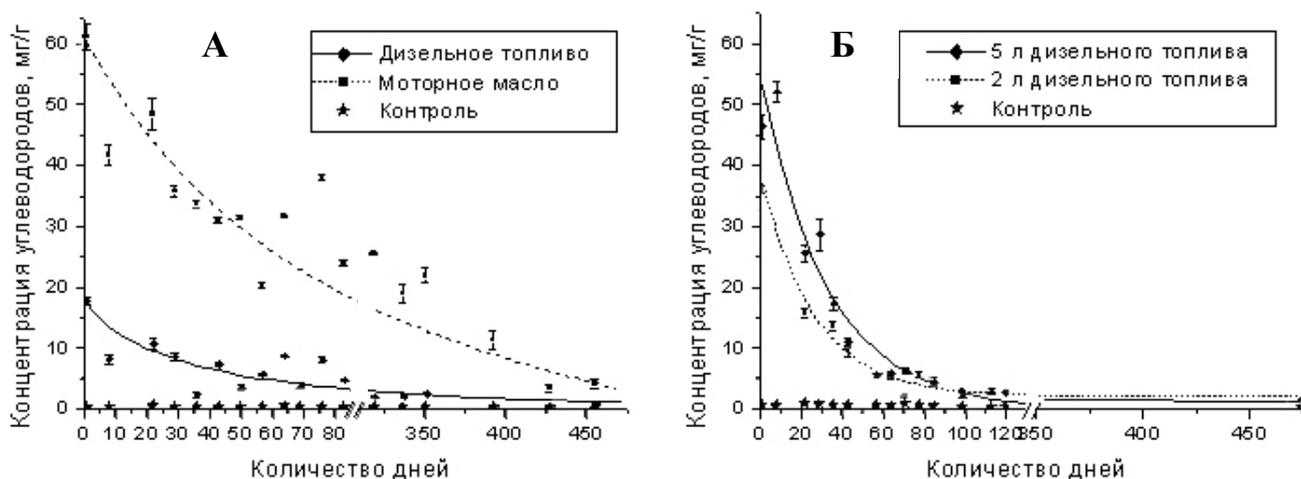


Рисунок 1 – Изменение концентрации углеводородов в грунте (А) и почве (Б).

углеводородов в почве была 37.71 мг/г при внесении 2 л и 46.35 мг/г при внесении 5 л дизельного топлива. Данные концентрации углеводородов находятся в «зоне стресса» (Роль почвенной микробиоты..., 1989), т.е. при такой степени загрязнения возникают первые нарушения в микробном сообществе, характерном для данной почвы. В контрольных площадках количество углеводородов было 0.33 мг/г почвы.

Уменьшение концентрации углеводородов в грунте и почве опытных площадок носило экспоненциальный характер, т.е. достаточно резкое в первые недели после загрязнения с последующим замедлением скорости деградации нефтепродуктов. Это мы связываем с большим вкладом физико-химических факторов деградации углеводородов на первых этапах очищения грунта, таких как испарение и вымывание в более глубокие горизонты.

К концу первого сезона убыль углеводородов составила 72.96% на площадках, загрязненных дизельным топливом, и 59.80% на площадках, загрязненных отработанным моторным маслом. К завершению второго сезона деградировало 95.08% дизельного топлива и 91.61% отработанного машинного масла. Полное очищение грунта от дизельного топлива мы зафиксировали в конце третьего сезона, когда концентрация углеводородов составила 0.170947 мг/г, т.е. оказалась на уровне контрольного варианта (0.17884 мг/г). Концентрация углеводородов в площадках, загрязненных отработанным моторным маслом, в то же время, не значительно изменилась за третий сезон и составила 3.718232 мг/г, т.е. убыло 94.01% исходного содержания углеводородов. Этот факт мы связываем с наличием в этом субстрате недоступных и токсичных для микроорганизмов компонентов, содержащихся в нем изначально и образовавшихся в процессе использования в двигателе внутреннего сгорания. В почве к концу первого сезона деградировало 94.09%

дизельного топлива на площадках, на которые вносили по 2 л углеводов, и 93.76% – на площадках, загрязненных 5 литрами поллютанта, т.е. за один сезон почва почти полностью очистилась от углеводов, в то время как такая же степень самоочищения грунта была достигнута лишь спустя два сезона.

Однако к концу второго сезона в почве осталось 1.37 мг углеводов на г почвы (3.64% исходной концентрации) на площадках с внесением 2 л ДТ и 1.74 мг/г (3,75% исходной концентрации) в почве площадок, загрязненных 5 л дизельного топлива, что больше, чем в два раза превышало контрольные показатели – 0.49 мг/г. Это, по нашему мнению, объясняется использованием для загрязнения почвы дизельного топлива марки «зимнее», при изготовлении которого в дизельное топливо добавляют такие присадки, как сополимеры этилена, которые могут быть недоступны для микроорганизмов и, поэтому, остаются в почве продолжительное время.

4.1.2. Динамика численности нефтеокисляющих микроорганизмов и фотогетеротрофных бактерий. Динамика численности аэробных хемогетеротрофных бактерий (НОБ) в грунте и в почве в течение 2-х сезонов представлена на рис. 2.

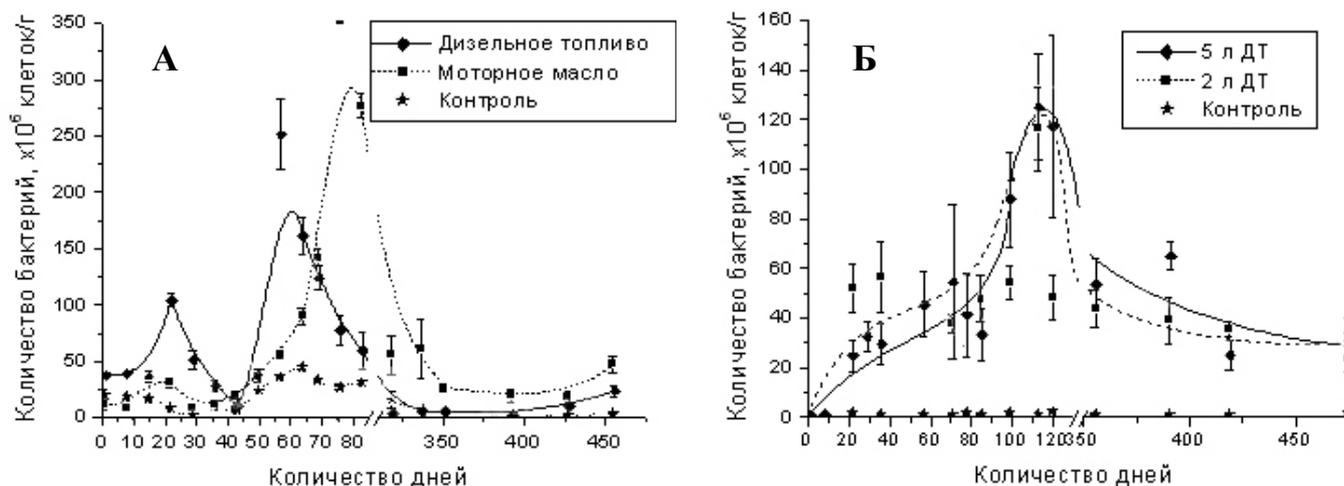


Рисунок 2 – Динамика численности аэробных нефтеокисляющих бактерий (НОБ) в грунте (А) и почве (Б).

В течение 1-2 месяцев после загрязнения грунта и почвы углеводородами происходило резкое возрастание численности нефтеокисляющих бактерий. Это объясняется появлением пищевого субстрата для этих прокариот, а так же подавлением микроорганизмов, с которыми НОБ конкурируют за ресурсы в обычных условиях (Наблюдение за самоочищением..., 1982). После достижения пика численности, произошло снижение числа нефтеокисляющих бактерий, что, очевидно, связано с исчерпанием субстрата.

Стоит также отметить, что максимальная численность нефтеокисляющих бактерий в почве была вдвое меньше, максимальной численности этих микроорганизмов в грунте. Это мы так же связываем с менее жесткой конкуренцией за субстрат в грунте, чем в почве, где, кроме НОБ, активно развиваются в больших количествах и нефтеокисляющие грибы (рис. 3.).

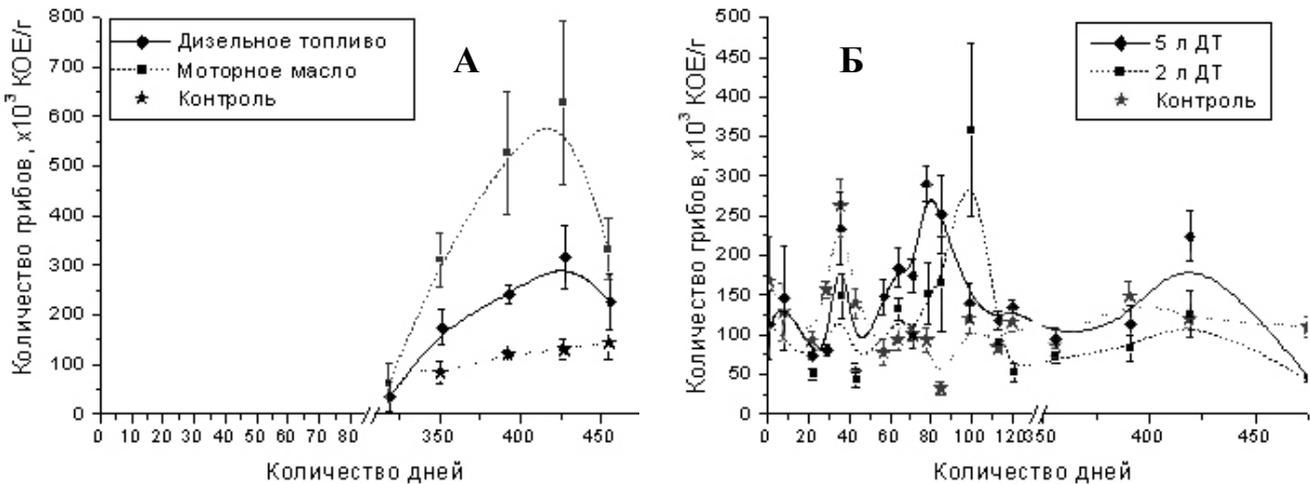


Рисунок 3 – Динамика численности нефтеокисляющих грибов в грунте (А) и почве (Б).

В грунте в течение первого сезона нам не удалось выявить нефтеокисляющие грибы ни в опытных, ни в контрольных площадках, за исключением единичных клеток. При этом, высева разведений на среду Чапека с сахарозой давали положительный результат: число грибов колебалось от $12 \cdot 10^3$ до $47 \cdot 10^3$ КОЕ на грамм абсолютно сухой почвы. Во второй сезон произошло резкое увеличение нефтеокисляющих грибов на всех площадках, в том числе и контрольных. Такую задержку роста численности нефтеокисляющих грибов на загрязненных площадках мы связываем с изначально малым числом КОЕ углеводородокисляющих грибов в грунте и, возможно, антагонистическим влиянием бурно развившихся НОБ. В конце третьего сезона численность грибов осталась высокой: $395 \cdot 10^3$ КОЕ/г на площадках, загрязненных 2 литрами дизельного топлива, $526 \cdot 10^3$ КОЕ/г на площадках с отработанным моторным маслом, и $134 \cdot 10^3$ КОЕ/г – в контроле.

Количество нефтеокисляющих грибов в почве не значительно различалось на загрязненных и контрольных площадках и было относительно велико в течение всего времени наблюдений, что подтверждает тезис о том, что микробиоценоз исследуемой почвы – сообщество сложившееся и сбалансированное, и, поэтому, более устойчиво к действию неблагоприятных факторов, в том числе и к загрязнению углеводородами. Однако, как можно

видеть из рисунков, на загрязненных площадках происходит резкое увеличение численности нефтеокисляющих грибов (99 день на площадках, загрязненных 2 литрами дизельного топлива, и на 78 – на площадках, загрязненных 5 литрами поллютанта). После чего происходит еще более резкое снижение их числа. При этом, время уменьшения численности нефтеокисляющих грибов совпадает со временем пиков численности НОБ (113 день), что подтверждает наше предположение об угнетающем действии большого числа НОБ на нефтеокисляющие грибы.

Пурпурные бактерии в грунте были обнаружены только на загрязненных углеводородами площадках на 393-й день наблюдений, что мы связываем с развитием нефтеокисляющих грибов и накоплением продуктов неполного окисления ими углеводородов, которые являются питательным субстратом для фотогетеротрофных бактерий (Драчук, 2004). За последующие 2 месяца их численность выросла в несколько раз (с $365.8 \cdot 10^3$ до $3449.2 \cdot 10^3$ клеток/г и с $631.6 \cdot 10^3$ до $4416.1 \cdot 10^3$ клеток/г при загрязнении грунта дизельным топливом и отработанным моторным маслом, соответственно). Эти бактерии сохранили высокую численность в грунте и к концу третьего сезона.

В почве единичные клетки фотогетеротрофных бактерий мы обнаруживали уже в первый сезон, начиная с 57 дня эксперимента. Далее эти бактерии выявлялись в почве эпизодически, не во всех пробах, и, обычно, на фоне пиков численности нефтеокисляющих грибов. Т.е. в почве пурпурные бактерии так и не смогли прочно занять свою нишу, что, очевидно, связано с большой конкуренцией за пищевые ресурсы и хищничеством почвенных простейших.

4.1.3. Идентификация пурпурных бактерий. Из экспериментальных площадок было выделено 18 штаммов пурпурных бактерий.

Рост в фотогетеротрофных условиях с использованием низкомолекулярных органических кислот в качестве источника углерода, невозможность использовать восстановленные соединения серы в качестве доноров электронов, наличие бактериохлорофилла *a* (судя по длинноволновым максимумам поглощения, лежащим в диапазоне 830-890 нм), позволили отнести выделенные культуры к несерным пурпурным бактериям.

Изучение морфологии клеток выделенных штаммов при помощи фазово-контрастного светового микроскопа показало, что клетки имели форму палочек, у них наблюдалось неравномерное деление, многие клетки были подвижны, в старых культурах были видны агрегаты в виде розеток. Морфология клеток исследованных бактерий была сходна с морфологией коллекционной культуры *Rhodopseudomonas palustris*. Спектры поглощения

исследуемых и коллекционных культур так же были схожи. Поэтому выделенные штаммы могут быть отнесены к роду *Rhodopseudomonas*.

4.2. Некоторые аспекты распространения пурпурных бактерий в почвах и грунтах.

4.2.1. Условия появления пурпурных бактерий в почвах и грунтах. Для выявления таких условий нами были проанализированы результаты по определению численности нефтеокисляющих микроорганизмов, фотогетеротрофных бактерий и содержанию углеводов в пробах почв и грунтов, взятых с участков, имеющих признаки загрязнения нефтепродуктами, не загрязненных и экспериментально загрязненных участков. Для анализа мы так же использовали данные С.В. Драчука по определению количества фотогетеротрофных пурпурных бактерий, аэробных нефтеокисляющих бактерий и нефтеокисляющих грибов в почвах с различной степенью загрязнения углеводородами (Драчук, 2004).

Анализ данных показал, что на появление в почве или грунте пурпурных бактерий оказывает влияние 3 фактора из исследованных: содержание углеводов, почвенные условия и численность нефтеокисляющих грибов.

Углеводороды не способствуют развитию фотогетеротрофных бактерий как при высоком содержании (более 40% в почве и более 10% в грунте (Драчук, 2004)), так и низком (менее 0.1%).

Независимо от наличия или отсутствия углеводородного загрязнения пурпурные бактерии обнаруживаются только в торфе. Они являются обычными обитателями торфа, что, видимо, связано с высокой влажностью на болотах и большим количеством органического вещества в этом субстрате. Благодаря способности к азотфиксации эти прокариоты могут успешно конкурировать с другими гетеротрофными бактериями в условиях верховых болот, отличающихся недостатком азота (Imhoff, Trüper, 1991).

Так же, мы отметили, что количество пурпурных бактерий, в большинстве случаев, находится в положительной обратной связи от численности нефтеокисляющих грибов, что объясняется возможностью использования фотогетеротрофными бактериями продуктов неполного окисления углеводов грибами (Драчук, 2004), которые могут накапливаться в среде в следствие лимита по некоторым элементам (азот, фосфор и др.) (Экскреция метаболитов..., 1981). Однако, фактор числа нефтеокисляющих грибов играет, очевидно, второстепенную роль по сравнению с содержанием углеводов и почвенными условиями. Так, в почве приусловного растительного комплекса, пурпурные бактерии так и не смогли заселиться, не смотря на высокую численность грибов, т.к., видимо, степень загрязнения была не столь

значительна, что бы вызвать необратимые сдвиги в микробоценозе. А в торфе пурпурные бактерии присутствовали и при почти полном отсутствии нефтеокисляющих грибов.

4.2.2. Влияние биотического фактора на распространение пурпурных бактерий в почве. Через 3 месяца фототрофные бактерии остались жизнеспособны во всех исследованных образцах стерильной почвы и грунта. Что подтверждает наличие биотического прессинга со стороны хищников или конкурентов в незагрязненных углеводородами или загрязненных незначительно почвах и грунтах (Одум, 1975).

При интродукции большого числа бактерий ($2 \cdot 10^8$ клеток на 1 г абсолютно сухой почвы) *Rhodopseudomonas palustris* в незагрязненную почву и грунт в природных условиях, они определялись в пробах и через 3 месяца после инокуляции.

Очевидно, пурпурные бактерии регулярно попадают в почву в количествах, не позволяющих им восстанавливать свою численность под прессом хищников и успешно конкурировать с другими гетеротрофными микроорганизмами за субстрат. Так, в почве приуровного растительного комплекса, они неоднократно выявлялись на площадках с углеводородным загрязнением при бурном развитии нефтеокисляющих грибов, т.е. когда в почве появлялся избыток органического вещества и конкуренция за субстрат ослабевала, но, при возвращении микробоценоза к нормальным для него (контрольным) показателям, обнаруживать их не удавалось.

4.2.3. Влияние концентрации дизельного топлива на выживаемость пурпурных бактерий в почве. Через 2 месяца пурпурные бактерии *Rhodopseudomonas palustris* были обнаружены при всех исследованных концентрациях дизельного топлива. Стоит отметить, что уже при внесении 45% дизельного топлива, нефтепродукт полностью пропитывал почву и его избыток располагался отдельным слоем над поверхностью почвы. Значит, эти бактерии являются устойчивыми к токсическому действию дизельного топлива. К тому же, они находились в условиях почти полного отсутствия кислорода, а так как способность к анаэробной ассимиляции углеводов у пурпурных бактерий обнаружить не удалось (Драчук, 2004), следовательно, все это время они использовали органическое вещество почвы.

Таким образом, заселение почвы или грунта фотогетеротрофными бактериями зависит от нескольких факторов, таких как содержание углеводов и вся совокупность почвенных условий (развитость микробоценоза, химический состав, влажность и др.). При этом, от почвенных условий зависит принципиальная возможность поселения в них пурпурных

бактерий. Основным лимитирующим фактором для развития этих прокариот в незагрязненных почвах и грунтах является биотический прессинг со стороны хищных микроорганизмов и конкурентов за пищевые ресурсы. Углеводы могут как создать благоприятные условия для заселения почвы или грунта фотогетеротрофными бактериями, подавив деятельность какой-либо из лимитирующих их развитие групп микроорганизмов, так и, наоборот, сделать условия неподходящими для успешного размножения этих бактерий, если концентрация поллютанта будет слишком высока. Потенциально, пурпурные бактерии могут жить в почве, залитой дизельным топливом, но, очевидно, только до момента исчерпания доступной органики, которая в таких условиях может восстанавливаться за счет деятельности сульфат-восстанавливающих бактерий, способных окислять алканы до жирных кислот в анаэробных условиях (Anaerobic Transformation of..., 2003). Так же углеводородное загрязнение может никак не повлиять на появление ниши для пурпурных бактерий, если будет недостаточно велико для того, что бы привести к значительным изменениям в микробном сообществе данной почвы.

4.3. Вклад разных групп микроорганизмов в деградацию дизельного топлива в почве.

Наиболее эффективно дизельное топливо деградировали ассоциации, состоящие из нефтеокисляющих грибов и пурпурных бактерий и включающие все группы исследуемых микроорганизмов (рис. 4.): за 56 дней в этих вариантах убыло 39.21% и 40.82% исходного содержания углеводов, соответственно. Разница в степени убыли дизельного топлива между этими двумя вариантами была не достоверна, согласно U-критерию Манна-Уитни. Но их вклад достоверно отличался от степени деградации углеводов всеми остальными ассоциациями микроорганизмов.

Значительная убыль дизельного топлива (31.28%) в варианте с ассоциацией фототрофных бактерий подтверждает возможность аэробного использования углеводов этими микроорганизмами.

Численность всех микроорганизмов через 14 дней после начала опыта была значительно ниже начальных показателей, что, очевидно, связано с прямым токсическим действием дизельного топлива на клетки. После снижения численности, число клеток нефтеокисляющих бактерий практически не изменялось до конца опыта и было сходным ($\sim 5 \cdot 10^6$ клеток/г) во всех ассоциациях, в которых эти бактерии присутствовали. Только в моноассоциации нефтеокисляющих бактерий их количество не так резко опустилось до числа этих прокариот в ассоциациях с другими микроорганизмами. Очевидно, что такая численность оптимальна для НОБ в

данных условиях и не зависит от наличия других микроорганизмов.

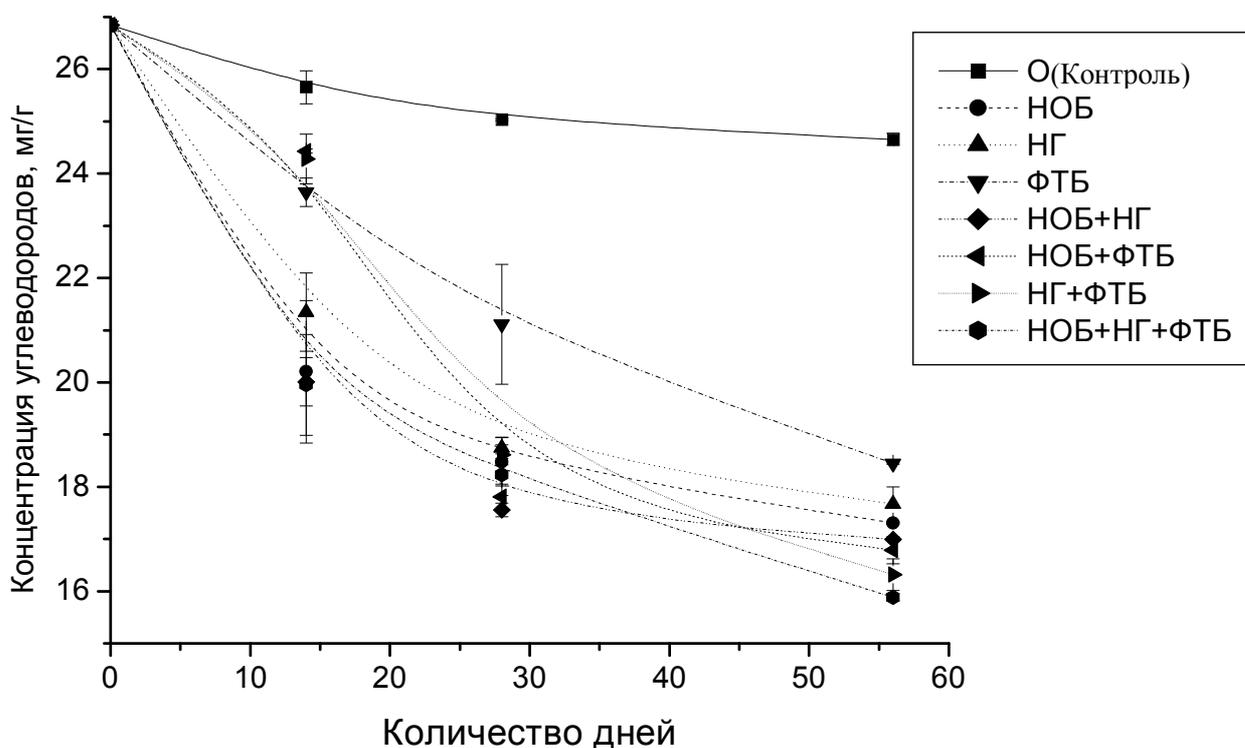


Рисунок 4 – Деградация углеводов в почве разными ассоциациями микроорганизмов

Численность нефтеокисляющих грибов, после начального уменьшения, к концу опыта в несколько раз превышало начальные показатели (от $12.7 \cdot 10^6$ до $23 \cdot 10^6$ КОЕ/г в разных ассоциациях). Такое большое число КОЕ грибов объясняется благоприятными условиями для их развития (низкий рН почвы, аэробные условия) и замкнутостью пространства, препятствовавшей перемещению спор.

Наибольшее количество КОЕ грибов в конце опыта было зафиксировано в моноассоциации этих микроорганизмов, а наименьшее – в ассоциации с нефтеокисляющими бактериями, что еще раз подтвердило наши предположения о негативном влиянии этих бактерий на развитие грибов.

Число фототрофных бактерий, после резкого уменьшения, увеличилось только в варианте моноассоциации разных видов этих бактерий. В остальных вариантах их численность продолжала снижаться до конца опыта. Это подтверждает тезис о том, что пурпурные бактерии являются стресс-толерантами. А т.к. в природных условиях в почве почти всегда присутствуют такие микроорганизмы как нефтеокисляющие бактерии и грибы, то, даже не смотря на способность фототрофных бактерий достаточно эффективно

справляться с незначительным загрязнением нефтепродуктами, нельзя считать, что пурпурные бактерии напрямую эффективно влияют на процессы самоочищения почвы от углеводов.

4.4. Эффективность усвоения углеводов нефтеокисляющими грибами и фототрофными бактериями в почве при различной величине исходного загрязнения.

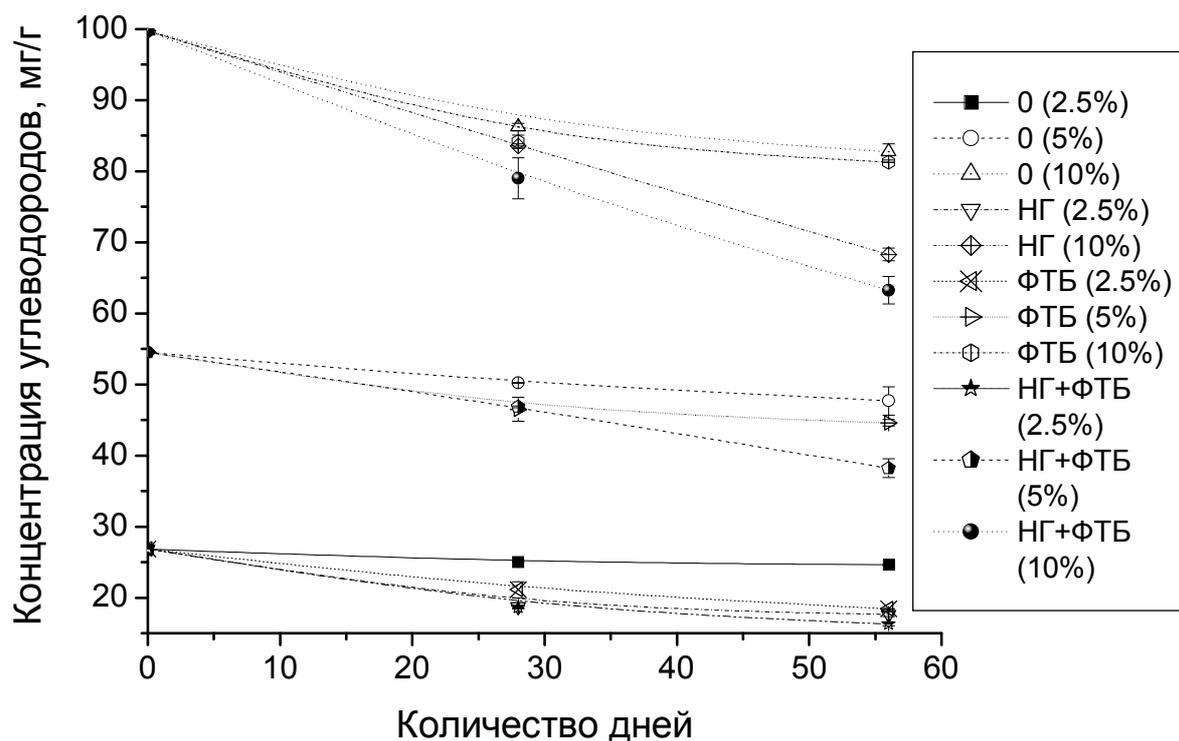


Рисунок 5 – Деградация углеводов в почве ассоциациями нефтеокисляющих грибов и пурпурных бактерий при разной величине начального загрязнения.

При всех величинах загрязнения ассоциация НГ+ФТБ наиболее эффективно разлагали углеводороды (рис. 5). При этом, если при 2.5% загрязнении такое превосходство можно объяснить совместным прямым воздействием на поллютант, т.к. и моноассоциация фототрофных бактерий эффективно очищала почву от загрязнения, то при 5 и 10% дизельного топлива разница между убылью углеводов в варианте с моноассоциацией пурпурных бактерий и в контроле незначима, согласно U-критерию Манна-Уитни, а значит потребление дизельного топлива в смешанных ассоциациях нефтеокисляющих грибов и пурпурных бактерий осуществлялось в основном грибами.

Пурпурные бактерии, очевидно, стимулируют усвоение углеводов нефтеокисляющими грибами. В случае почвы, богатой азотом, такое

стимулирующее действие может быть объяснено тем, что фототрофные бактерии поглощают органические кислоты, являющиеся продуктами неполного окисления углеводов грибами, которые при накоплении ингибируют углеводородокисляющую деятельность грибов, либо тем, что эти прокариоты поставляют в почву необходимые грибам факторы (например, витамин B1 (Ермакова, 1970)).

При всех начальных концентрациях дизельного топлива в случаях ассоциации пурпурных бактерий с грибами, численность бактерий уменьшалась по сравнению с начальным количеством клеток. При отсутствии загрязнения, количество бактерий в моноассоциации практически не менялось. В случае ассоциации с грибами и без внесения дизельного топлива, численность бактерий сначала возрастала почти в два раза, что объясняется, очевидно, стимулирующим действием среды с культурой грибов (Драчук, 2004), а потом резко снижалась в связи с развитием большого количества грибов. При начальном содержании 2.5% процентов углеводов происходило стимулирование развития пурпурных бактерий и их количество увеличивалось с самого начала опыта. К 5 и 10% содержанию фотогетеротрофным бактериям надо адаптироваться, после чего их численность в моноассоциациях начинала возрастать.

Таким образом, показано, что в лабораторных условиях при невысоком уровне загрязнения (2.5% дизельного топлива) все исследованные группы микроорганизмов в виде моноассоциаций могут эффективно потреблять углеводороды, однако ассоциации разных групп микроорганизмов деградируют дизельное топливо эффективней. Наиболее эффективными оказались ассоциация нефтеокисляющих грибов и пурпурных бактерий и ассоциация, содержащая представителей всех трех групп микробов.

Численность нефтеокисляющих бактерий не зависела от того, в составе какой ассоциации они находились. Развитие нефтеокисляющих грибов было наилучшим в моноассоциации и сильно подавлялось в присутствии нефтеокисляющих бактерий. Пурпурные бактерии успешно развивались только в моноассоциации. В ассоциациях с другими микроорганизмами, их численность значительно снижалась.

При повышении начальной концентрации дизельного топлива до 5 и 10%, резко падала способность фототрофных бактерий к аэробному окислению углеводов. С повышением в 2 раза начального количества поллютанта, количество потребленных углеводов уменьшалось в 2 раза (6.21 мг/г при 2.5% дизельного топлива, 3.08 мг/г – при 5%, 1.49 мг/г – при 10%). Очевидно,

это происходило из-за ухудшения доступа кислорода к клеткам, что и приводило к ингибированию аэробного окисления.

Нефтеоокисляющие грибы, обладая воздушным мицелием, способны выходить за пределы смоченных нефтепродуктом почвенных частиц, получая доступ к кислороду. Поэтому интенсивность усвоения ими углеводов возрастала с увеличением содержания последних.

При любом начальном загрязнении, эффективность деградации дизельного топлива ассоциацией нефтеоокисляющих грибов и пурпурных бактерий была достоверно больше, чем другими ассоциациями микроорганизмов. Это дает основание считать, что фототрофные бактерии стимулируют потребление нефтепродуктов грибами, поглощая продукты неполного окисления углеводов грибами, а так же поставляя грибам внеклеточные ауторегуляторы (витамины, азот и др. элементы), которые попадают в среду после гибели бактериальной клетки.

4.5. Влияние пурпурных бактерий на самоочищение почвы от дизельного топлива в природных условиях.

Таблица – Сравнение микробиологических показателей и степени очищения почвы и грунта от дизельного топлива в зависимости от внесения культуры пурпурных бактерий.

Вариант опыта	Концентрация углеводов, мг/г		Фотогетеротрофные бактерии, 10^6 клеток/г		Нефтеоокисляющие бактерии, $\times 10^6$ клеток/г		Нефтеоокисляющие грибы, $\times 10^3$ КОЕ/г	
	начало	конец	начало	конец	начало	конец	начало	конец
Грунт	20.24	7.89	0	0	34.31	87.50	0	0
Грунт + ФТБ	31.15	9.54	3.64	1.77	39.24	206.22	0	34.03
почва	13.42	8.02	0	0	24.82	285.19	41.82	10.76
Почва + ФТБ	22.01	10.09	20.73	2.87	20.63	102.51	45.13	53.95

При добавлении культуры пурпурных бактерий степень самоочищения от углеводов увеличилась и в грунте, и в почве (табл.). В грунте без внесения фототрофных бактерий за 2 месяца убыло 60.97% от количества дизельного топлива в начале эксперимента, с внесением бактерий – 69.39%. В почве за то же время убыль углеводов составила 40.21% и 54.17% без добавления и с добавлением культуры фототрофных бактерий, соответственно. При загрязнении $13.42-31.15 \text{ мг}_{\text{углеводородов}}/\text{г}_{\text{почвы}}$ (~1.5-3%) влияние внесенных пурпурных бактерий может быть как прямым (аэробное окисление углеводов), так и косвенным (стимулирование аборигенной микрофлоры).

Число пурпурных бактерий за время эксперимента уменьшилось и в грунте, и в почве. На площадках, в которые не вносили культуру фототрофных бактерий, эти бактерии обнаружены не были.

Внесение фотогетеротрофных бактерий не влияло на численность нефтеокисляющих бактерий, число которых возросло на всех опытных площадках и соответствовало показателям, зафиксированным в опыте по изучению самоочищения почвы и грунта от углеводов.

В грунте, который не инокулировали культурой фототрофных бактерий, нефтеокисляющие грибы не были выявлены ни в начале, ни в конце опыта. В варианте с внесением пурпурных бактерий, в конце опыта нефтеокисляющие грибы были обнаружены. Это связано, очевидно, с тем, что при внесении культуры бактерий грунт обогатился необходимыми для развития грибов соединениями (витамины, азот, микроэлементы), что стимулировало их рост и включение в процесс деградации углеводов.

Таким образом, увеличение скорости самоочищения почвы и грунта от углеводов при внесении культуры несерных пурпурных бактерий может быть объяснено двумя причинами. Во-первых, при незначительном загрязнении углеводородами (до 5%) имеет место прямое аэробное окисление нефтепродуктов фототрофными бактериями. Это предположение подтверждают наши лабораторные эксперименты и опыты, проведенные С.В. Драчуком (Драчук, 2004), в которых была показана способность к аэробному росту в темноте на среде с дизельным топливом в качестве единственного источника углерода и энергии у одного штамма *Rhodopseudomonas acidophila* и двух штаммов *Rhodopseudomonas palustris*. С увеличением содержания углеводов в почве усиливается анаэробноз и аэробное усвоение углеводов пурпурными бактериями ингибируется. Это происходит из-за обволакивания нефтепродуктами почвенных частиц, на которых адсорбированы бактерии. Создающаяся пленка углеводов препятствует поступлению кислорода к бактериям. Нефтеокисляющие грибы, обладая воздушным мицелием, преодолевают такой барьер, получая кислород в незаполненных порах. Поэтому грибы способны к аэробному усвоению углеводов при большей степени загрязнения, чем фототрофные бактерии. Во-вторых, культура пурпурных бактерий может косвенно влиять на интенсивность деградации нефтепродуктов, стимулируя основные группы нефтеокисляющих микроорганизмов. Так, С.В. Драчуком установлено, что присутствие азотфиксирующих фотогетеротрофных пурпурных бактерий компенсирует недостаток азота в среде оказывает положительное влияние на окисление углеводов аэробными гетеротрофными бактериями *Dietzia maris*

(Драчук, 2004). Тен с сотрудниками показали, что добавление жидкой культуры фотосинтетических бактерий в почву облегчает разрушение нефтепродуктов, а так же стимулирует рост углеводородоокисляющих микроорганизмов (Effect of Photosynthetic..., 2004). Гусев с соавторами обнаружили, что присутствие в водной экосистеме внеклеточных выделений цианобактерий, а так же самих клеток оказывает положительное влияние на процесс биodeградации дизельного топлива (Влияние выделений и..., 1982). В наших лабораторных опытах, наибольшее влияние на очищение почвы от углеводов пурпурные бактерии оказывали в ассоциации с нефтеокисляющими грибами. В случае недостатка азота пурпурные бактерии могут фиксировать молекулярный азот, обогащая почву этим биогенным элементом, что должно положительно сказываться на жизнедеятельность других групп микроорганизмов. Но при высоком содержании связанного азота, очевидно, имеет место и другой механизм стимуляции. С одной стороны, фотогетеротрофные бактерии поглощают из окружающей среды органические кислоты, которые являются продуктами неполного окисления углеводов грибами и накапливаются в среде при избытке углеводов, недостатке азота, фосфора, серы (Экскреция метаболитов..., 1981), кислорода, тиамина (Ермакова, 1970), определенной кислотности, концентрации железа (Изучение влияния условий..., 1975), и могут приводить к субстратному ингибированию ферментных систем окисления углеводов (Рубан, 1980; Breuil, Kushner, 1980). С другой стороны – эти бактерии могут поставлять грибам необходимые для развития факторы (витамины, аминокислоты, микроэлементы и др.), которые попадают в среду, очевидно, после гибели бактериальной клетки. Тем самым они не только стимулируют метаболизм грибов, но и минимизируют негативное действие нефтеокисляющих бактерий. Это утверждение подтверждается динамикой численности грибов и НОБ в лабораторных и естественных условиях. Возможность антагонистические взаимоотношения между прокариотными и эукариотными культурами (вплоть до паразитизма) при росте на углеводородах предполагали так же Яранцева М.М. и Фахрутдинов А.И. (Яранцева, Фахрутдинов, 2007).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы показано, что полное очищение грунта от низкомолекулярных углеводов дизельного топлива заняло 3 сезона (более 800 дней), а почвы 1 сезон (120 дней). Менее доступные для микроорганизмов углеводороды, содержащиеся в отработанном моторном масле и, в качестве присадок, в дизельном топливе марки «зимнее», остались не деградированными

как в грунте, так и в почве. Именно малая скорость деградации высокомолекулярных метано-нафтеновых, ароматических и полиароматических углеводородов, для большинства из которых известны, главным образом, кометаболические пути биodeградации, определяет продолжительное время полного самоочищения почв при нефтяном загрязнении (Гузев, Левин, 1989).

Внесение культуры пурпурных несерных бактерий увеличивало степень самоочищения от углеводородов как почвы, так и грунта, что объясняется как прямым, так косвенным влиянием этих прокариот на процессы деградации нефтепродуктов.

Существование фотогетеротрофных бактерий в почве в природных условиях зависит от нескольких факторов. Во-первых, содержание углеводородов, во-вторых, совокупность почвенных условий (развитость микробоценоза, химический состав, влажность и др.). При этом, от почвенных условий зависит принципиальная возможность поселения в них пурпурных бактерий. Основным лимитирующим фактором для развития этих прокариот в незагрязненных почвах и грунтах является биотический прессинг со стороны хищных микроорганизмов и конкурентов за пищевые ресурсы, что объясняется реализацией у пурпурных бактерий экологической стратегии стресс-толерантности, т.е. они обладают низкими конкурентными способностями, в связи с относительно низкой скоростью размножения. В то же время, при большом начальном количестве, они могут на длительный срок закрепиться и в незагрязненной почве, однако естественным путем попадание такого числа клеток невозможно.

Углеводородное загрязнение, в зависимости от степени, может либо создать в почве нишу для пурпурных бактерий (если будет достаточным для подавления деятельности микроорганизмов, лимитирующих распространение фотогетеротрофных бактерий), либо сделать условия неподходящими для их успешного развития (если будет слишком велико), либо никак не повлиять на возможность появления пурпурных бактерий (если будет мало для того, что бы привести к значительным изменениям в микробоценозе данной почвы).

Среди исследованных нами факторов почвенных условий, для распространения фотогетеротрофных бактерий так же имеет значение численность нефтеокисляющих грибов: высокое содержание нефтеокисляющих грибов, сопровождается, в большинстве случаев, повышенным количеством пурпурных несерных бактерий. Это, очевидно, связано с использованием бактериями продуктов неполного окисления углеводородов грибами.

Таким образом, пурпурные несерные бактерии, не являясь частью

автохтонной микрофлоры почв и грунтов, способны занять возникающую нишу, образуемую при углеводородном загрязнении, и играют важную роль в процессах самоочищения почв и грунтов от этих поллютантов. Они могут прямо влиять на скорость деструкции нефтепродуктов, осуществляя аэробное окисление, либо оказывать косвенное влияние, обогащая почву необходимыми веществами, такими как связанный азот, фосфор, микроэлементы, витамины, аминокислоты и др. и стимулируя тем самым деятельность основных групп нефтеокисляющих микроорганизмов, осуществляющих аэробное или анаэробное разложение углеводов.

Внесение культур пурпурных несерных бактерий, наряду с другими мероприятиями, может иметь практическое значение при рекультивации нефтезагрязненных почв.

ВЫВОДЫ

1. Скорость самоочищения почвы и грунта от углеводов при экспериментальном загрязнении различна. Полное освобождение исследованной почвы от загрязнения дизельным топливом <5% произошло за один сезон (120 дней), грунта – за три сезона (более 800 дней). Микробоценоз почвы более устойчив к исследованному загрязнению и не меняет своих качественных характеристик, а количественные меняются незначительно и кратковременно. В микробоценозе грунта при загрязнении нефтепродуктами прослеживаются четкие сукцессионные изменения: подавляющее доминирование нефтеокисляющих бактерий => снижение численности НОБ и развитие нефтеокисляющих грибов => появление несерных пурпурных бактерий.

2. На появление и распространение фотогетеротрофных бактерий в почвах и грунтах влияют следующие факторы: количество углеводов, биотический прессинг (пурпурные бактерии – стресс-толеранты), численность нефтеокисляющих грибов.

3. Наиболее эффективными деструкторами углеводов в почве являются аэробные нефтеокисляющие бактерии и нефтеокисляющие грибы. Нефтеокисляющие бактерии проявляют антагонистическое влияние в отношении грибов. Между нефтеокисляющими грибами и пурпурными бактериями существуют мутуалистические связи.

4. Фотогетеротрофные бактерии увеличивают скорость биodeградации нефтепродуктов и в почве, и в грунте. Это увеличение может происходить как за счет прямого аэробного окисления углеводов самими фототрофными бактериями (при загрязнении <5%), так и благодаря их положительному

влиянию на углеводородокисляющие способности других групп микроорганизмов. На основе лабораторных экспериментов установлено, что наиболее сильно фотогетеротрофные бактерии стимулируют деятельность нефтеокисляющих грибов. Полученные данные свидетельствуют о возможности использования культур несерных пурпурных бактерий при проведении рекультивации нефтезагрязненных земель.

ОСНОВНЫЕ РАБОТЫ, ОПУБЛИКОВАННЫЕ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. **Сморкалов И.А.** Фотогетеротрофные пурпурные бактерии как компоненты микробного сообщества почв, загрязненных нефтепродуктами / И.А. Сморкалов, П.В. Кочубей, Н.Н. Фирсов // Проблемы экологии Южного Урала / Вестник Оренбургского государственного университета – 2007. – № 75. Спец. вып. – С. 330–333.

2. Веретнова И.С. Внутрисезонная динамика численности микроорганизмов в почвах, загрязненных различными углеводородами / И.С. Веретнова, П.В. Кочубей, **И.А. Сморкалов** // Экология: от Арктики до Антарктики: Мат-лы конф. молодых ученых. Екатеринбург: Академкнига, 2007. С. 44–45.

3. Веретнова И.С. Сезонная динамика численности микроорганизмов в почвах, загрязненных различными углеводородами / И.С. Веретнова, П.В. Кочубей, **И.А. Сморкалов** // Экология в современном мире: взгляд научной молодежи: Мат-лы Всерос. конф. молодых ученых. Улан-Удэ: Изд-во ГУЗ РЦМП МЗ РБ, 2007. С. 72–73.

4. Кочубей П.В. Изменение микробного пейзажа при самоочищении почв от нефтепродуктов / П.В. Кочубей, **И.А. Сморкалов** // Биосфера Земли: прошлое, настоящее, будущее: Мат-лы конф. молодых ученых. Екатеринбург: изд-во «Гощицкий», 2008. С. 105–106.

5. **Сморкалов И.А.** Влияние фотогетеротрофных пурпурных бактерий на скорость деградации дизельного топлива в почве / И.А. Сморкалов // Аграрная Россия – 2009. – Специальный выпуск. – С. 63–64

Сморкалов Иван Александрович

РОЛЬ ФОТОГЕТЕРОТРОФНЫХ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ В САМООЧИЩЕНИИ
ПОЧВЫ ОТ УГЛЕВОДОРОДОВ

Автореферат

Подписано в печать 28.07.2009

Усл. печ. л. 1.6. Тираж 150 экз.

Заказ № 179

Типография «Уральский центр академического обслуживания»
620219, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 91