
ЕКОЛОГІЯ ЗЕМЕЛЬНИХ РЕСУРСІВ ТА ҐРУНТІВ

УДК 579.262:665.7

DOI <https://doi.org/10.32846/2306-9716-2018-4-23-24>

РОСЛИННО-МІКРОБНІ ВЗАЄМОВІДНОСИНИ ОБЛІПИХИ КРУШИНОВИДНОЇ – ОСНОВА ЕФЕКТИВНОЇ ФІТОРЕМЕДІАЦІЇ НАФТОЗАБРУДНЕНИХ ҐРУНТІВ

Шевчик Л.З.¹, Романюк О.І.¹, Борсукевич Б.М.²

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин
Інституту фізико-органічної хімії і вуглехімії імені Л.М. Литвиненка
Національної академії наук України
вул. Наукова, 3а, 79053, м. Львів
lesyashevchik@gmail.com

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, 79005, м. Львів

Показано, що в умовах зростання обліпики крушиновидної на нафтозабруднених ґрунтах має місце симбіоз її кореневої системи з азотофіксуючими мікроорганізмами роду *Frankia*. Інфікування коренів обліпики мікроорганізмами відбувається ще в молодому віці, що значно покращує приживання й ріст рослин. Установлено, що в процесі фітореємедіації нафтозабруднених ґрунтів рослинами *H. rhamnoides* оптимізуються умови ґрунту: відбувається покращення мікробіологічних показників, збільшується кількість гетеротрофів у 10 000 разів, деструкторів нафти – у 1000 разів, азотофіксуючих мікроорганізмів – у 10 разів; підвищується вміст загального й амонійного азоту. *Ключові слова*: нафтозабруднені ґрунти, рослинно-мікробні взаємовідносини, азотофіксуючі мікроорганізми, фітореємедіація, *Hippophae rhamnoides* L.

Растительно-микробные взаимоотношения облепихи крушиновидной – основа эффективной фитореємедіації нефтезагрязненных почв. Шевчик Л.З., Романюк О.І., Борсукевич Б.М. Показано, что в условиях роста облепихи крушиновидной на нефтезагрязненных почвах имеет место симбиоз ее корневой системы с азотфиксирующими микроорганизмами рода *Frankia*. Инфицирование корней облепихи микроорганизмами происходит еще в молодом возрасте, что значительно улучшает приживаемость и рост растений. Установлено, что в процессе фитореємедіації нефтезагрязненных почв растениями *H. rhamnoides* оптимизируются условия почвы: происходит улучшение микробиологических показателей, увеличивается количество гетеротрофов в 10 000 раз, деструкторов нефти – в 1000 раз, азотфиксирующих микроорганизмов – в 10 раз, повышается содержание общего и аммонийного азота. *Ключевые слова*: нефтезагрязненные почвы, растительно-микробные взаимоотношения, азотфиксирующие микроорганизмы, фитореємедіація, *Hippophae rhamnoides* L.

Plant-microbe interaction of *Hippophae rhamnoides* L. in the conditions of growth on oil-contaminated soils. Shevchuk L., Romaniuk O., Borsukevych B. It is shown that in the conditions of the growth of *H. rhamnoides* plants in the oil-contaminated soils, there is a symbiosis of its root system with nitrogen-fixing microorganisms of the genus *Frankia*. Infection of the roots of *H. rhamnoides* by microorganisms occurs at a young age. It greatly improves the survival and growth of plants in the oil-contaminated soils. It is established that in the process of phytoreємедіації of oil contaminated soils by *H. rhamnoides* plants the soils conditions are optimized: the microbiological parameters are improved – the number of heterotroph microorganisms is increased by 10,000 times, oil destructive microorganisms – 1000 times and the nitrogen-fixing microorganisms – 10 times, increases content of total nitrogen and ammonia. *Key words*: oil-contaminated soils, plant-microbe interaction, nitrogen-fixing microorganisms, phytoreємедіація, *Hippophae rhamnoides* L.

Постановка проблеми. Нині актуальною залишається проблема очищення ґрунтів від нафтового забруднення. Серед наявних технологій, розроблених для її вирішення, найбільш перспективними вважаються ті, що базуються на біологічних методах очистки, зокрема фітореємедіації, яка приваблює своєю природністю, екологічністю, економічністю, характеризується тривалішим впливом і стабільним покращенням екологічної ситуації [10; 11; 13].

Однак застосування фітореємедіаційних технологій для нафтозабруднених ґрунтів стримується високою токсичністю поллютанта (нафти) й неможливістю зростання більшості рослин на таких ґрунтах. Крім цього, нафтозабруднені ґрунти набувають гідрофобності, у них порушується водно-повітряний баланс, співвідношення між основними елементами живлення N:C, що ускладнює приживання фітореємедіантів.

Актуальність дослідження. Для успішного застосування фітореMediaційних технологій головна увага приділяється відбору рослин, стійких до нафтового забруднення. Ця стійкість забезпечується насамперед кореневою системою рослини. Здатність до симбіотичної взаємодії з мікроорганізмами підвищує адаптацію до стресів завдяки оптимізації мінерального живлення та захисту рослин від патогенів. Перевагу слід віддавати рослинам, які в симбіозі з мікроорганізмами здатні трансформувати токсичну частину забруднень у менш рухому форму. Важливу роль у цьому плані відіграють кореневі виділення, що впливають на забруднювач як прямо, так і опосередковано. Пряма дія полягає в солюбілізації, трансформації й деградації забруднювача під впливом ферментів, що виділяються в ризосферу. Опосередкована – у стимуляції корневими виділеннями ґрунтових мікроорганізмів-деструкторів, що супроводжується збільшенням їхньої чисельності й оптимізацією фізико-хімічних умов ґрунту [8; 12].

Відомо про метаболічний потенціал (у контексті біоремедіації) бактерій роду *Frankia*, здатних розкладати поліароматичні вуглеводні, нафталін, феноли й утворювати симбіотичні азотфіксуючі асоціації з більш ніж 220 видами деревних дводольних рослин [9; 15]. *Frankia* належать до грамозитивних ниткоподібних азотфіксувальних актинобактерій, які фіксують азот шляхом перетворення атмосферного азоту в біологічно корисний аміак і постачають рослину-господаря джерелом відновленого азоту.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. У попередніх наших дослідженнях [6; 16] показана стійкість обліпихи крушиновидної (*Hippophae rhamnoides* L.) до несприятливих умов техногенних нафтозабруднених ґрунтів, експериментально доведено, що ця рослина, розмножуючись корневими паростками, поширюється на забруднені території

навіть за високого рівня забруднення (12–15% нафти в ґрунті). Обліпиха входить у перелік актиноризних рослин, що вступають у симбіоз з азотфіксувальними бактеріями роду *Frankia* [5].

Метою роботи було встановити, що в умовах зростання обліпихи крушиновидної на нафтозабруднених ґрунтах має місце симбіоз з азотфіксувальними мікроорганізмами роду *Frankia* і відбувається оптимізація властивостей ґрунту.

Методика досліджень. Дослідження проводили в польових умовах на нафтозабруднених техногенних відвальних ґрунтах озокеритовидобутку м. Борислава. Закладали дослідні ділянки на ґрунтах різного рівня забруднення нафтою: 97 г/кг, 123 г/кг, 150 г/кг (9,7%, 12,3%, 15%), в які рано навесні без додаткового внесення добрив, мікроорганізмів чи поливу висаджували двома рядами в шаховому порядку відсадки висотою до 30–40 см обліпихи крушиновидної в лунки глибиною 15–20 см, відстань між рослинами – 1,5 м, відстань між рядами – 1 м. Польові дослідження для забруднення ґрунту нафтою 123 г/кг проводили в трьох повторностях: закладали три фітореMediaційні ділянки, кожна площею 10 м², на яких висаджували 14 саджанців за вищеописаною схемою. Відстань між ділянками складала 4,5 м. Експерименти проводили з 2–4-річними саджанцями на ділянках забруднення ґрунту нафтою у кількості 12,3%.

Чисельність мікроорганізмів у ґрунті визначали методом серійних розведень [7]. Мікроорганізмидеструктори нафти виділяли методом накопичувальної культури на середовищі Шишкіної-Троценко з нафтою й рідкими парафінами як джерелами вуглецю [14]. Чисельність олігонітрофільних і азотфіксувальних мікроорганізмів визначали на середовищі Ешбі [3]. Вміст загального азоту в ґрунті визначали колориметрично з реактивом Неслера [1], вміст



Рис. 1. Корені обліпихи крушиновидної з азотфіксувальними мікроорганізмами в нафтозабрудненому ґрунті



Рис. 2. Бульбочки азотофіксуювальних мікроорганізмів на корінні молодих дворічних особин обліпихи крушиновидної

амонійного азоту в ґрунті – за методом ЦІНАО [2]. Результати досліджень опрацьовували статистично.

Виклад основного матеріалу. Утворення рослиною-живителем спеціалізованих структур, що містять мікробні клітини (бульбочки), є характерною ознакою симбіозу. Ці утворення є екологічною нішею для симбіонта, структурною основою для обміну метаболітами, а також для контролю

чисельності й фізіологічної активності симбіонта. У бульбочках створюються оптимальні умови для обміну між партнерами карбонвмісними і нітрогенвмісними сполуками, а також мікроаерофільні умови, необхідні для функціонування нітрогеназного комплексу.

У результаті проведених досліджень установлено, що на корінні рослин обліпихи крушиновидної, яка росла в умовах нафтового забруднення, формуються бульбочки. Це дає можливість говорити про наявність симбіозу обліпихи з азотофіксуювальними мікроорганізмами роду *Frankia*. Ці бактерії ініціюють утворення спеціалізованих органів – бульбочок – на коренях *H. rhamnoides* (рис. 1). *Frankia* зв'язують молекулярний азот атмосфери, передають його рослині, яка забезпечує мікроорганізми поживними речовинами.

Забезпеченість азотом сприяє виживанню та зростанню рослин на нафтозабрудненому ґрунті, що призводить до поліпшення екологічного стану ґрунту. Позитивний вплив азотофіксуювальних мікроорганізмів на рослину не обмежується лише поліпшенням азотного живлення. Бактеризація сприяє трансформації важкорозчинних сполук у форми, що легко засвоюються рослинами. При цьому корисні мікроорганізми, заселивши корені, не допускають інфікування рослин патогенними мікроорганізмами, збільшуючи стійкість рослин до хвороб [4].

Варто зазначити, що бульбочки наявні як на корінні дорослих особин, так і на корінні молодих особин дворічної обліпихи, яка розростається, поширюючись на забруднені території (рис. 2).

Таким чином, інфікування коренів обліпихи крушиновидної азотофіксуювальними мікроорганізмами

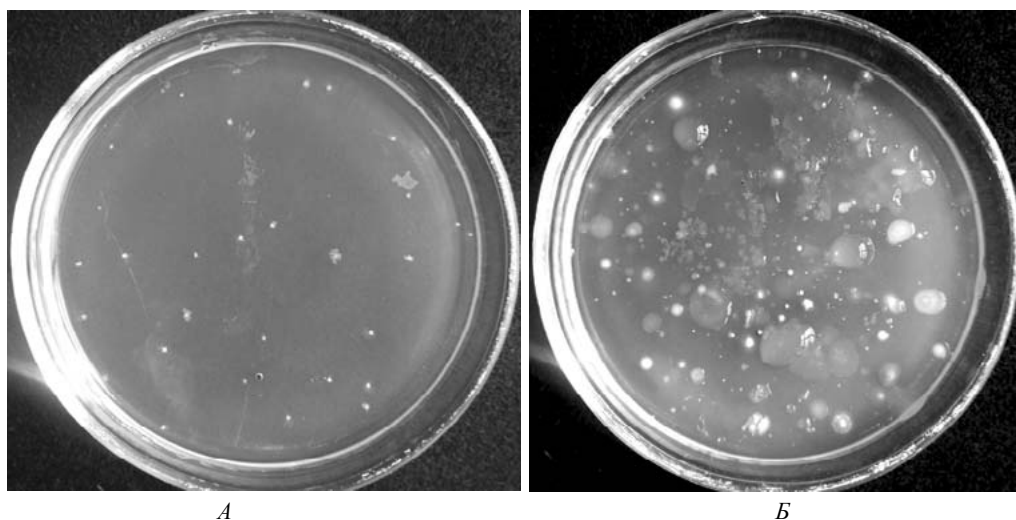


Рис. 3. Колонії азотофіксуювальних мікроорганізмів на нафтозабруднених ґрунтах: (А) – до фітореMediaції, (Б) – після фітореMediaції *H. rhamnoides*

Таблиця 1

Вплив нафти й *Hippophae rhamnoides* на чисельність мікроорганізмів у нафтозабрудненому ґрунті

Ґрунтові мікроорганізми, КОУ/г ґрунту	Нафтозабруднений ґрунт	Ґрунт після ремедіації <i>H. rhamnoides</i>
Азотофіксувальні мікроорганізми	3×10^8	2×10^9
Гетеротрофи	2×10^4	2×10^8
Деструктори нафти	5×10^2	3×10^5

Таблиця 2

Вміст азоту в нафтозабруднених ґрунтах до й після фіторемердіації обліпихою крушиновидною

Вміст азоту в ґрунті	Нафтозабруднений ґрунт (12,3% нафти в ґрунті)	до фіторемердіації	після чотирьох років фіторемердіації
	N-NH ₄ ⁺ , мг/кг		23,6 ± 0,3
N (мінеральний) (N-NO ₃ + N-NH ₄ ⁺), мг/кг		29,5 ± 0,2	32,19 ± 0,2
N (загальний), %		0,05 ± 0,01	0,15 ± 0,02

Таблиця 3

Вплив рослин *Hippophae rhamnoides* на біодеградацію нафти в ґрунті впродовж 1–4 років зростання, початкове забруднення ґрунту 123 г/кг [6]

	Часовий період ремедіації			
	0-й рік	1-й рік	2-й рік	4-й рік
Вміст нафти в ґрунті, г/кг	123	26,5	13,9	9,0
Сумарне очищення ґрунту, %	0	77,5	88,7	92,7

відбувається ще в молодому віці, що значно покращує приживання й ріст рослин на забруднених ґрунтах. Це робить обліпиху придатною для безпосереднього використання в якості посадкового матеріалу для фіторемердіації ґрунтів, забруднених нафтою.

У процесі фіторемердіації нафтозабруднених ґрунтів рослинами *H. rhamnoides* відбувається покращення мікробіологічних показників цих ґрунтів. Так, на четвертий рік зростання обліпихи на нафтозабрудненому ґрунті кількість ґрунтових мікроорганізмів у ньому зростає: гетеротрофів – у 10 000 разів, деструкторів нафти – у 1000 разів, азотофіксувальних мікроорганізмів – у 10 разів порівняно з нерекультивованим ґрунтом. Збільшується видова різноманітність азотфіксаторів: для нафтозабрудненого ґрунту характерні однотипні невеликі колонії, а в ґрунті після фіторемердіації обліпихою спостерігали колонії різного розміру, форми, кольору, консистенції (рис. 3).

Зокрема, виявлено чималу кількість слизистих пігментованих колоній, які характерні для мікроорганізмів роду *Azotobacter*, і міцелієподібні колонії, які характерні для актинобактерій, зокрема роду *Frankia*.

Спостерігається також збільшення загального й амонійного азоту. Так, вміст амонійного азоту в нерекультивованому ґрунті сягає 23,6 мг/кг, а в нафтозабрудненому ґрунті, рекультивованому обліпихою, становить 30,00 мг/кг. Збільшується і вміст мінерального азоту, який є сумою нітратного й амонійного та характеризує забезпеченість ґрунтів азотом, його доступність для рослин (табл. 2).

Завдяки такій фіторемердіації відбувається ефективне очищення нафтозабруднених ґрунтів: на четвертий рік росту обліпихи ступінь очистки сягає 92,7% за початкового забруднення ґрунту нафтою 123 г/кг (табл. 3).

Головні висновки. Проведені дослідження свідчать, що в умовах зростання обліпихи крушиновидної на нафтозабруднених ґрунтах має місце симбіоз її кореневої системи з азотофіксувальними мікроорганізмами роду *Frankia*. Рослинно-мікробні взаємовідносини забезпечують ефективну фіторемердіацію нафтозабруднених ґрунтів: оптимізуються умови ґрунту, збільшується чисельність ґрунтових мікроорганізмів, зростає забезпеченість доступним для рослин мінеральним азотом, відбувається очищення ґрунту від нафтопродуктів до 92,7%.

Література

1. ГОСТ 26107-84. Почвы. Методы определения общего азота. Москва: Изд-во стандартов, 1984. 11 с.
2. ГОСТ 26489-85. Почвы. Определение обменного аммония по методу ЦИНАО. Москва: Изд-во стандартов, 1985. 5 с.
3. Гудзь С., Гнатух С., Яворська Г., Білінська І., Борсукевич Б. Практикум з мікробіології: підручник: для студ. вищ. навч. закл. Львів: ЛНУ імені Івана Франка, 2014. 436 с.
4. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями / отв. ред. В. Игнатов. Москва: Наука, 2005. 262 с.
5. Надкернична О. Азотфіксуючі мікробно-рослинні симбіози. Сільськогосподарська мікробіологія: міжвід. темат. наук. зб. Чернігів, 2005. Вип. 1–2. С. 105–127.
6. Романюк О., Шевчик Л., Терек О. Пат. на корисну модель 86572 UA. Спосіб очищення техногенних ґрунтів, забруднених нафтою. № u2013 05665; заявл. 30.04.2013; опубл. 10.01.2014; Бюл. № 1.
7. Сэги Й. Методы почвенной микробиологии. Москва: Колос, 1983. С. 107–109.
8. Турковская О., Муратова А. Биодegradация органических поллютантов в корневой зоне растений. Молекулярные основы взаимоотношений ассоциативных микроорганизмов с растениями. Москва: Наука, 2005. С. 180–208.
9. Baker E., Tang Y., Chu F.X., Tisa L.S. Molecular responses of Frankia sp. strain QA3 to naphthalene. *Canadian Journal of Microbiology*. 2015. 61(4). P. 281–292.
10. Banks M., Kulakow P., Schwab A., Chen Z., Rathbone K. Degradation of crude oil in the rhizosphere of Sorghum bicolor. *Intern. J. Phytoremediation*. 2003. Vol. 5, № 3. P. 225–234.
11. Cunningham S., Anderson T., Schwab A., Hsu F. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron*. 1996. Vol. 56. P. 55–114.
12. Dashti N., Khanafer M., El-Nemr I., Sorkhoh N., Ali N., Radwan S. The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere*. 2009. Vol. 74(10). P.1354–1359.
13. Gerhardt K., Huang X.-D., Glick B., Greenberg B. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 2009. 176 (1). P. 20–30.
14. Ilyina A., Castillo Sanchez M., Villarreal Sanchez J., Ramirez Esquivel G. Isolation of soil bacteria for bioremediation of hydrocarbon contamination. *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия*. 2003. Т. 44, № 1. С. 88–91.
15. Rehan M., Swanson E., Tisa L. Frankia as a Biodegrading Agent. *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*. 2016. Chapter 11. P. 271–290.
16. Shevchuk L., Romaniuk O. The optimal way of biological cleaning of oil-contaminated soils. *Mediterranean Journal of Biosciences*. 2016. № 1(3). P. 109–113.