

УДК 631.46: 581.5: 504.53.062.4
DOI: 10.17072/1994-9952-2019-1-72-77.

А. В. Назаров

Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

ВЛИЯНИЕ ВЛАЖНОСТИ ПОЧВЫ НА ДЕСТРУКЦИЮ ФЕНАНТРЕНА И ОКТАДЕКАНА МИКРОБНО-РАСТИТЕЛЬНОЙ АССОЦИАЦИЕЙ НА ОСНОВЕ КЛЕВЕРА ЛУГОВОГО

Изучено влияние влажности почвы на деструкцию фенантрена и октадекана микробно-растительной ассоциацией на основе клевера лугового (*Trifolium pratense* L.). Обнаружено большее снижение концентрации углеводородов в почве при периодическом изменении ее влажности от 25 до 35%, чем в почвах с постоянной влажностью 25 и 35%. Для объяснения стимулирующего воздействия на деструкцию углеводородов выдвинуто предположение, что при подсыхании почвы уменьшается расстояние диффузии в ней корневых выделений. В результате ризосферные микроорганизмы в отдельные периоды времени оказываются за пределами ризосферы, вне влияния органических веществ корневых экссудатов, которые ингибируют окисление углеводородов из-за катаболической репрессии. Изученные режимы увлажнения почвы не влияли на численность почвенных микроорганизмов-деструкторов. Полученные данные могут быть использованы при разработке методов очистки почв, загрязненных углеводородами.

Ключевые слова: влажность почвы; фиторемедиация углеводородов; фенантрен; октадекан.

A. V. Nazarov

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russian Federation

EFFECT OF SOIL MOISTURE ON THE DESTRUCTION OF PHENANTHRENE AND OCTADECANE BY A MICROBIAL-PLANT ASSOCIATION BASED ON A RED CLOVER

The effect of soil moisture on the phenanthrene and octadecane destruction by the microbial-plant association based on meadow clover (*Trifolium pratense* L.) was studied. It was found that the greatest decrease in the concentration of hydrocarbons in the soil was observed with a periodic change in humidity from 25 to 35%. At the same time, the variants of experiments with constant soil moisture of 25 and 35% did not differ in the rate of decomposition of hydrocarbons. To explain the stimulating effect of periodic drying of the soil on the destruction of hydrocarbons, it has been suggested that this reduces the diffusion distance of root exudates. As a result, rhizosphere microorganisms in certain periods of time are outside the rhizosphere, outside the influence of organic substances of root exudates, which inhibit the oxidation of hydrocarbons due to catabolic repression. The studied soil moisture regimes did not affect the number of soil destructive microorganisms. The data obtained can be used in the development of methods for the purification of soils contaminated with hydrocarbons.

Key words: soil moisture; phytoremediation of hydrocarbons; phenanthrene; octadecane.

Введение

В настоящее время использование растений для очистки окружающей среды от разнообразных загрязнителей (фиторемедиация) является перспективным направлением в биотехнологии. Эффективность фиторемедиации почв, загрязненных углеводородами, была показана во многих работах. Основным объяснением положительного влияния растений на деструкцию углеводородов в почве считается выделение через корни органических веществ, вследствие чего в прикорневой зоне почвы повышается численность и активность ассоциированных с растениями

микроорганизмов-деструкторов [Kuiper et al., 2004; Kirk et al., 2005]. Однако многие вопросы взаимодействия микробно-растительных ассоциаций с загрязненной почвой остаются малоизученными. Известно, что влажность почвы – один из важнейших экологических факторов, влияющий на все микробиологические процессы в почве [Звягинцев, 1987]. При этом влияние экологических факторов и, в частности, влажности почвы на деструкцию углеводородов микробно-растительными ассоциациями исследовано недостаточно.

Цель данной работы – оценка влияния влажности почвы на деструкцию фенантрена и октадекана

микробно-растительной ассоциацией на основе клевера лугового.

Материал и методы исследования

В экспериментах проростки клевера лугового (*Trifolium pratense* L.) через 5 сут. после прорастания семян высаживали в среднесуглинистую дерново-подзолистую почву, загрязненную октадеканом и фенантреном в дозах 0.1% каждого. Почву высушивали до воздушно-сухого состояния, просеивали через сито с диаметром отверстий 2 мм. Семена для опытов проращивались на свету в течение 5 сут. после появления корней.

Растения выращивали в стеклянных бюксах диаметром 35 мм и высотой 70 мм с 10 г почвы в течение 12 сут. Октадекан и фенантрен вносили в почву в сухом виде и гомогенизировали полученную смесь растиранием в ступке. Загрязненную почву в количестве 2 г насыпали в бюксы, в бюксы помещали проростки растений в количестве от 1 до 100 штук и засыпали сверху 8 г почвы. Корни растений с помощью шпателя равномерно распределяли в толще почвы. Для оценки влияния влажности на деструкцию углеводородов почву увлажняли до 25 и 35% в зависимости от варианта опыта. Почву в вариантах опыта с постоянной влажностью поддерживали на уровне 25 и 35% в течение всего эксперимента. Почву с периодически изменяемой влажностью увлажняли до 35%, а через

2 сут. бюксы открывали и подсушивали почву в течение 16–18 ч. до влажности 25%, затем через 2 сут., включая время сушки, почву увлажняли до 35%, 2-суточный цикл увлажнения-подсушивания повторяли до конца эксперимента. Влажность почвы контролировали взвешиванием бюксов с растениями. В качестве контрольных вариантов использовали почву с внесенными углеводородами без растений.

По окончании эксперимента растения вынимали из бюксов, измеряли массу и длину корней. Массу корней растений определяли после высушивания при 70°C. Среднюю толщину почвенного слоя вокруг корней растений (1/2 среднего расстояния между корнями растений) вычисляли по формуле [Назаров, Шестакова, Ананьина, 2017]

$$R = \sqrt{\frac{V}{\pi h}} \times 10,$$

где R – средняя толщина почвенного слоя вокруг одного корня растения (половина среднего расстояния между корнями растений), мм, V – объем почвы в бюксе, равный 8.7 см³, h – общая длина корней растений в бюксе в конце опыта (см).

Так как не было отмечено влияния влажности на массу и длину корней, варианты с одинаковой численностью растений и разной влажностью почвы объединили в одну повторность. Варианты модельного опыта с высадкой растений приведены в таблице.

Численность, общая биомасса и длина корней, а также средняя толщина почвенного слоя вокруг одного корня растения (R) в вариантах опыта через 12 сут. культивирования

Варианты опыта	Численность растений в бюксе	Общая масса корней растений, мг/10 г почвы	Общая длина корней растений, см/10 г почвы	R , мм
1	1	1.1±0.3	3.3±1.1	9.2
2	5	4.5±0.4	15.6±2.7	4.2
3	10	7.2±0.7	30.4±6.1	3.0
4	50	48.2±3.4	155.3±23.8	1.3
5	100	152.4±31.9	278.3±18.7	1.0

Концентрацию октадекана и фенантрена в хлороформных экстрактах измеряли на хромато-масс-спектрометре Agilent 6890/5973N (Agilent, США), с кварцевой колонкой RESTEK RTx-5MS (Restek, США). В качестве газа-носителя использовали гелий, скорость потока составляла 1 мл/мин. Температура испарителя – 280°C. Программирование подъема температуры осуществляли от 180 до 220°C со скоростью 5°C/мин. Ионизирующее напряжение источника – 70 эВ. Анализ хроматограмм проводили программой MSD ProductivityChemStation (Agilent, США). Расчет концентраций октадекана и фенантрена вели по площадям пиков в сравнении с площадью пиков контрольного образца.

Численность микроорганизмов-деструкторов октадекана и фенантрена определяли высевом

почвенной суспензии на агаризованную минеральную среду Раймонда [Розанова, Назина, 1982] с добавлением в нее, соответственно, октадекана или фенантрена по методу [Rice, Hemmingsen, 1997] с последующим подсчетом общего числа выросших колоний, образующих вокруг себя зоны просветления в результате разрушения добавленных в среду углеводородов. Для микробиологического анализа готовили объединенный образец почвы, смешивая образцы всех повторностей одного варианта опыта. Посев проводили в 5-кратной повторности, инкубировали в течение 2 недель при температуре 27°C. Численность микроорганизмов выражали в количестве колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 г почвы.

Результаты и их обсуждение

С увеличением количества высаженных проростков и массы корней в почве повышалась численность почвенных бактерий-деструкторов углеводов (рис. 1). Максимальная численность почвенных микроорганизмов-деструкторов углеводов отмечена в вариантах опыта 5, с наибольшим ко-

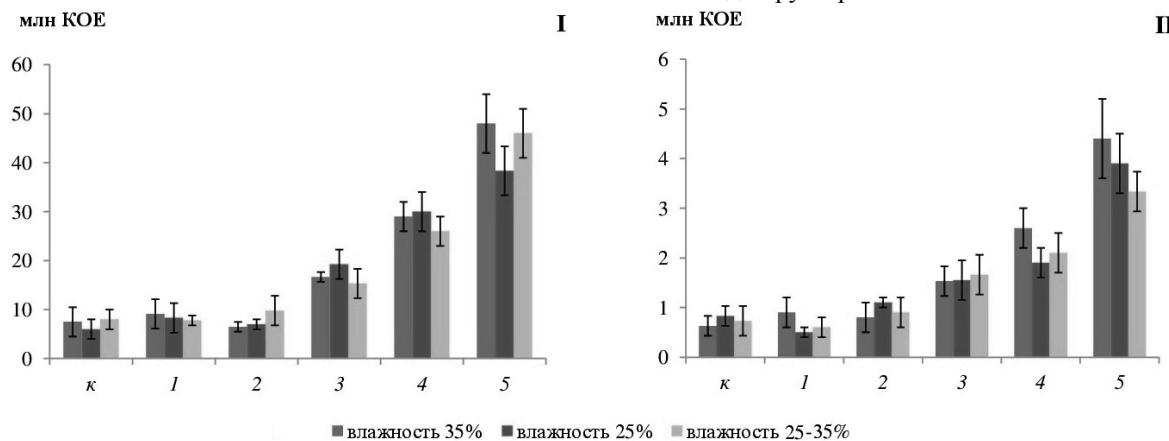


Рис. 1. Влияние постоянной влажности почвы 25 и 35%, а также периодически изменяемой влажности почвы от 25 до 35% на численность микроорганизмов-деструкторов октадекана (I) и фенантрена (II) в почве: 1–5 – варианты опыта (см. таблица); к – почва без растений

Положительное влияние растений на деструкцию фенантрена также возрастало с увеличением массы корней в почве (рис. 2). В условиях периодического изменения влажности почвы в вариантах 3, 4 и 5 отмечено большее снижение концентрации фенантрена в сравнении с теми же вариантами с постоянной влажностью. Данное уменьшение концентрации фенантрена при периодическом изменении влажности почвы не было обусловлено испарением углеводорода при ее подсушивании,

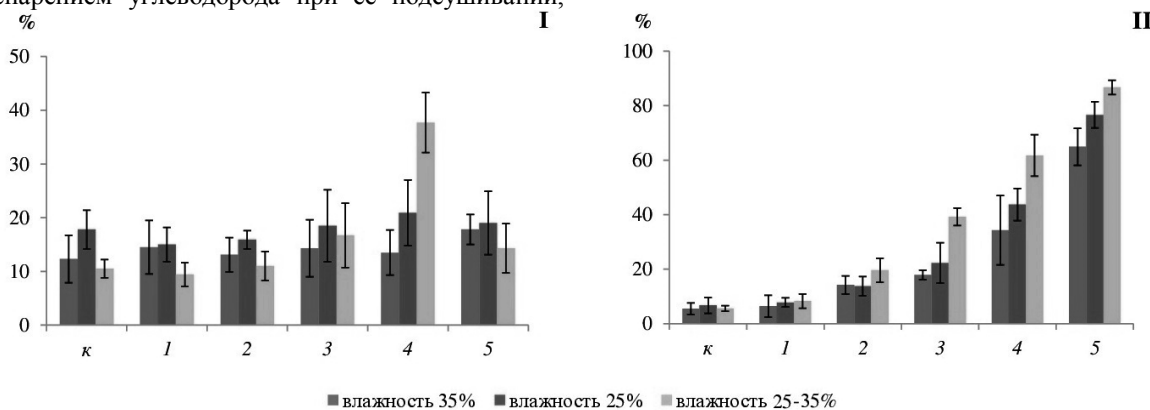


Рис. 2. Влияние постоянной влажности почвы 25 и 35%, а также периодически изменяемой влажности почвы от 25 до 35% на деструкцию октадекана (I) и фенантрена (II) в почве: 1–5 – варианты опыта (см. таблица); к – почва без растений

Известно, что растения через корни выделяют разнообразные низкомолекулярные органические соединения (экссудаты): карбоновые кислоты, углеводы, аминокислоты и др., количество которых в

среднем составляет от 10 до 20% в расчете на фиксированный растениями углерод [Curl, Truelove, 1986]. Вследствие этого в ризосфере – почве, находящейся под влиянием корней, увеличивается

числом посаженных проростков и массой корней в почве. В данных вариантах численность микроорганизмов-деструкторов октадекана была выше, чем в почве без растений в 5.8–6.4 раз, фенантрена – в 4.6–7.0 раз. При этом почвы, различающиеся режимами увлажнения, не отличались между собой по численности почвенных микроорганизмов-деструкторов.

так как оно не влияло на содержание фенантрена в конце опыта в почве без растений и в почве вариантов 1 и 2. Положительного воздействия микробно-растительных ассоциаций на деструкцию октадекана не отмечено, исключение составляет вариант 4 при периодическом изменении влажности почвы, в котором содержание данного углеводорода уменьшилось в 1.4 раза по сравнению с вариантом с почвой без растений (рис. 2).

числом посаженных проростков и массой корней в почве. В данных вариантах численность микроорганизмов-деструкторов октадекана была выше, чем в почве без растений в 5.8–6.4 раз, фенантрена – в 4.6–7.0 раз. При этом почвы, различающиеся режимами увлажнения, не отличались между собой по численности почвенных микроорганизмов-деструкторов.

численность и активность ассоциированных с растениями микроорганизмов, в том числе и микроорганизмов-деструкторов углеводов, что, как считается, положительно воздействует на очистку почв от углеводородного загрязнения [Siciliano et al., 2003; Gerhardt et al., 2009].

Однако в ряде работ установлено, что добавление корневых экссудатов в почву или в среду с культурой бактерий увеличивает численность микроорганизмов-деструкторов, но снижает скорость деструкции углеводов из-за катаболитной репрессии легкодоступными органическими веществами корневых выделений [Rentz, Alvarez, Schnoor, 2004; Cébron et al., 2011]. Ранее предложена гипотеза [Назаров, Шестакова, Ананьина, 2017], которая снимает существующие противоречия в объяснениях эффекта положительного воздействия растений на очистку почвы от углеводов, согласно которой микроорганизмы осуществляют деструкцию углеводов совместно с растениями.

Известно, что растительные ферменты способны к разрушению и трансформации самых разнообразных ксенобиотиков [Заалишвили и др., 2000]. Однако поступление углеводов через корни и их деструкцию в клетках растений сильно ограничивает их гидрофобность и нерастворимость в воде [Wild, Jones, 1992]. С другой стороны, при окислении углеводов микроорганизмами возникают метаболиты с меньшей гидрофобностью и большей растворимостью в воде. Поэтому микроорганизмы являются основными деструкторами углеводов в почве и разлагают их до соединений, которые способны усваиваться корнями растений и разрушаться внутри их клеток. Растения поглощают данные микробные метаболиты, тем самым ускоряя окисление углеводов почвенными микроорганизмами.

Так как при окислении фенантрена микроорганизмами метаболиты, способные к поглощению растениями, образуются на более ранних этапах пути деструкции, чем при окислении октадекана, изученная микробно-растительная ассоциация в большей степени влияла на деструкцию в почве фенантена, чем октадекана [Назаров, Шестакова, Ананьина, 2017]. Кроме того, наиболее интенсивное разложение углеводов микробно-растительными ассоциациями происходит, по видимому, в почвенных микроразнообразиях, располагающихся на некотором расстоянии от корней растений из-за ингибирующего влияния органических веществ поступающих от корней. Так, например, средняя толщина почвенного слоя вокруг одного корня растения в варианте опыта 4 с периодически изменяемой влажностью почвы, в котором отмечено наибольшее снижение содержания октадекана, составляло 1.3 мм (таблица). Ранее были пред-

ложены следующие объяснения данного явления [Назаров, Шестакова, Ананьина, 2017]. 1. Данные микроразнообразия почвы находятся в удаленных от корней участках ризосферы, в которых пониженная концентрация органических веществ корневых выделений не имеет выраженного ингибирующего влияния на микробную деструкцию углеводов. 2. Микроразнообразия почвы находятся за границей поступления органических веществ корневых экссудатов, при этом увеличение скорости деструкции происходит вследствие повышения численности клеток бактерий-деструкторов углеводов из-за хемотаксиса из ризосферы растений. 3. При периодическом подсыхании почвы уменьшается расстояние диффузии корневых выделений, в результате ризосферные микроорганизмы в отдельные периоды времени оказываются за пределами ризосферы, вне влияния органических веществ корневых экссудатов.

Очевидно, что увеличение влажности почвы будет способствовать диффузии органических веществ и хемотаксису бактерий-деструкторов. Однако в проведенном опыте при постоянной влажности почвы увлажнение 35% не увеличивало скорость деструкции углеводов по сравнению с увлажнением 25%. С другой стороны, наибольшее снижение содержания углеводов в почве наблюдалось при периодическом изменении влажности от 25 до 35%, что указывает на наличие стимулирующего действия уменьшения расстояния диффузии корневых выделений при периодическом подсыхании почвы на деструкцию углеводов микробно-растительными ассоциациями.

Заключение

Таким образом, обнаружено, что наибольшее снижение содержания углеводов в почве наблюдалось именно при периодическом изменении влажности от 25 до 35% в сравнении с почвами с постоянной влажностью 25 и 35%. Для объяснения стимулирующего воздействия периодического изменения влажности почвы на деструкцию углеводов выдвинуто предположение, что при этом уменьшается расстояние диффузии корневых выделений. В результате ризосферные микроорганизмы в отдельные периоды времени оказываются за пределами ризосферы, вне влияния органических веществ корневых экссудатов, которые ингибируют окисление углеводов из-за катаболитной репрессии. Изученные режимы увлажнения почвы не влияли на численность почвенных бактерий-деструкторов. Полученные данные могут быть использованы при разработке методов очистки почв, загрязненных углеводородами.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: 01201353249.

Библиографический список

- Залишвили Г.В. и др. Детоксикационный потенциал растений // Прикладная биохимия и микробиология. 2000. Т. 36, № 5. С. 515–524.
- Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1987. 255 с.
- Назаров А.В., Шестакова Е.А., Ананьина Л.Н. Влияние клевера лугового на микробную трансформацию фенантрена и октадекана в почве // Почвоведение. 2017. № 8. С. 1002–1008.
- Розанова Е.П., Назина Т.Н. Угледородородоксилюющие бактерии и их активность в нефтяных пластах // Микробиология. 1982. Т. 51. С. 324–348.
- Cébron A. et al. Root exudates modify bacterial diversity of phenanthrene degraders in PAH-polluted soil but not phenanthrene degradation rates // Environmental Microbiology. 2011. Vol. 13, № 3. P. 722–736.
- Curl E.A., Truelove B. The Rhizosphere. Berlin: Springer, 1986. 288 p.
- Gerhardt K.E. et al. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges // Plant Science. 2009. Vol. 176. P. 20–30.
- Kirk J.L. et al. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil // Environmental Pollution. 2005. Vol. 133. P. 455–465. doi 10.1016/j.envpol.2004.06.002
- Kuiper I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., Lugtenberg B.J. Rhizoremediation: A beneficial plant microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. V. 17 (2004): pp. 6-15.
- Nazarov A.V., Shestakova E.A., Anan'ina L.N. Effect of Red Clover on the Microbial Transformation of Phenanthrene and Octadecane in the Soil. *Eurasian Soil Science*. V. 50, N 8 (2017): pp. 971-976. (In Russ.).
- Rentz J.A., Alvarez P.J.J., Schnoor J.L. Repression of *Pseudomonas putida* phenanthrene-degrading activity by plant root extracts and exudates. *Environmental Microbiology*. V. 6 (2004): pp. 574-583.
- Rice L.E., Hemmingsen B.B. Enumeration of hydrocarbondegrading bacteria. *Methods in Biotechnology*. V. 2 (1997): pp. 99-109.
- Rozanova E.P., Nazina T.N. [Hydrocarbon-oxidizing bacteria and their activity in oil reservoirs]. *Mikrobiologija*. V. 51 (1982): pp. 324-348. (In Russ.).
- Siciliano S.D., Germida J.J., Banks K., Greer C.W. Changes in Microbial Community Composition and Function during a Polyaromatic Hydrocarbon Phytoremediation Field Trial. *Applied and Environmental Microbiology*. V. 69 (2003): pp. 483-489.
- Wild S.R., Jones K.C. Organic chemicals entering agricultural soils in sewage sludges: screening for their potential to transfer to crop plants and livestock. *The Science of the Total Environment*. V. 119 (1992): pp. 85-119.
- Zaalışvili G., Khatishashvili G., Ugrekhelidze D., Gordeziani M., Kvesitadze G. [Plant potential for detoxification]. *Prikladnaja biochimija i milrobiologija*. V. 36, N 5 (2000): pp. 443-451. (In Russ.).
- Zvyagintsev D.G. *Počva i mikroorganizmy* [Soil and microorganisms]. Moscow: MSU Publ., 1987. 255 p. (In Russ.).

References

Cébron A., Louvel B., Faure P., France-Lanord C., Chen Y., Murrell J.C., Leyval C. Root exudates

Поступила в редакцию 10.12.2018

Об авторе

Назаров Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии и биотехнологии
Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» - филиал ПФИЦ УрО РАН
ORCID: 0000-0003-4753-4061
614081, г. Пермь, ул. Голева, 13;
nazarov@iegm.ru; (342)2808431

About the author

Nazarov Alexey Vladimirovi, candidate of biology, senior researcher of laboratory of molecular microbiology and biotechnology
Institute of Ecology and Genetics of Microorganism UB RAS.
ORCID: 0000-0003-4753-4061
13, Golev str., Perm, Russia, 614081;
nazarov@iegm.ru; (342)2808431

Информация для цитирования:

Назаров А.В. Влияние влажности почвы на деструкцию фенантрена и октадекана микробно-растительной ассоциацией на основе клевера лугового // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2019. Вып. 1. С. 72–77. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-1-72-77.

Nazarov A.V. [Effect of soil moisture on the destruction of phenanthrene and octadecane by a microbial-plant association based on a red clover]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 1 (2019): pp. 72-77. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-1-72-77.

