

**І.Б. Русин¹, О.М. Фігурка¹, У.М. Фігурка¹,
Н.М. Джура², О.М. Мороз², В.П. Новіков¹**

¹Національний університет „Львівська політехніка”, вул. С. Бандери, 12, м. Львів,
79013, Україна, e-mail: rib@gala.net

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

МІКРОБІОТА НАФТОЗАБРУДНЕНОГО ҐРУНТУ, РЕКУЛЬТИВОВАНОГО РОСЛИНАМИ *CAREX HIRTA*

*Проаналізовано динаміку чисельності ґрунтових мікроорганізмів основних фізіологічних груп (целюлозоруйнівні, азотфіксувальні, нітрифікувальні, денітрифікатори, амоніфікатори, дріжджі) нафтозабрудненого ґрунту, рівень мікробної деструкції вуглеводнів та особливості впливу на ці процеси рекультивациі осокою шершавою *Carex hirta* та вторинного заростання рослинами. В перші місяці після нафтового забруднення виявлено зниження чисельності мікроорганізмів багатьох фізіологічних груп та водночас активізацію розвитку вуглеводнеутилізувальної мікробіоти. Відмічено позитивний вплив *C. hirta* на ріст мікроорганізмів більшості фізіологічних груп та рівень мікробної деструкції вуглеводнів нафти в перші місяці після забруднення. Через 1,5 роки кількість мікроорганізмів усіх фізіологічних груп практично повністю відновилась, а вміст вуглеводнів у ґрунті був залишковим.*

*К л ю ч о в і с л о в а: нафтозабруднений ґрунт, мікроорганізми, *Carex hirta*.*

Комбінована рекультивациа нафтозабруднених ґрунтів за участю мікроорганізмів та рослин є перспективним методом їх очищення [1]. Цікавим в цьому плані є використання осоки шершавої *Carex hirta*. Дана рослина нафтостійка, її довгі кореневища покращують повітряно-водний режим ґрунту, а виділення кореневищ збагачують ґрунт мінеральними та органічними речовинами [2, 3, 4]. Ці фактори сприяють інтенсифікації розвитку в нафтозабруднених ґрунтах мікроорганізмів деструкторів та активному вторинному заростанню ґрунтів рослинами.

Метою роботи був моніторинг за процесом відновлення ґрунтів від нафтового забруднення при рекультивациі осокою шершавою та без рекультивацийних заходів, коли ґрунтові мікроорганізми були основним фактором самовідновлення ґрунтів для оцінки ефективності фітомікроборемедиациі. Для цього було проведено аналіз динаміки чисельності ґрунтової мікробіоти основних фізіологічних груп, визначення рівня мікробної деструкції вуглеводнів нафти та особливості впливу на ці процеси рекультивациі осокою шершавою *C. hirta*.

Матеріали і методи

Експериментальні дослідження проводили протягом 18 місяців з глинистими ґрунтами, які переважають біля нафтових свердловин Прикарпатського регіону та



постійно зазнають нафтової контамінації. Для моделювання процесу забруднення використано неочищену нафту із Бориславської свердловини в кількості 5, 50 і 75 г/кг сухого ґрунту. Половину дослідних ґрунтів рекультивували осокою шершавою *C. hirta*, яку для цього спеціально висаджували в нафтозабруднений ґрунт через місяць після забруднення. Інша частина дослідних зразків була позбавлена рослинного покриву. Через рік після внесення нафтового забруднення в усіх зразках ґрунту спостерігалось вторинне заростання рослинами. Найбільш інтенсивно рослини розвивались в ґрунті, рекультивованому осокою шершавою.

Для виділення з ґрунту вільноживучих азотфіксаторів, целюлозо-деструкторів, нітрифікаторів, денітрифікаторів, амоніфікаторів, дріжджів використовували селективні середовища Ешбі, Гетченсона, крохмало-аміачний агар, середовище Чапека, Гільтая, Баалсруда, м'ясо-пептонний агар, сусло-агар [5]. Виявлення анаеробних мікроорганізмів проводили за допомогою системи Анаерораск [6]. Виділення та дослідження росту вуглеводнеутілізувальних мікроорганізмів проводили на середовищах, де джерелом вуглецю була неочищена нафта. Як емульгатор використовували SPAN 80 (сорбітанмоноолеат). Забір середньої проби ґрунту, підготовку зразка, виготовлення ґрунтової суспензії, висів на відповідні середовища проводили як описано [7]. Кількість клітин мікроорганізмів (КУО — колонієутворювальних одиниць) в 1 г сухого ґрунту визначали, враховуючи розведення суспензії і відносну вологість ґрунту. Обрахунок кількості клітин целюлозо-утилізувальних мікроорганізмів проводили, враховуючи ступінь обростання часточок ґрунту на селективному середовищі [7]. Вміст вуглеводнів у ґрунті визначали за модифікованою методикою [8] шляхом екстракційного концентрування нафтопродуктів з ґрунту тетрахлоридом вуглецю з наступним ІЧ-спектроскопічним визначенням за калібрувальним графіком.

Результати та їх обговорення

В перші місяці після нафтового забруднення в ґрунтах без рекультиваційних заходів виявлено пригнічувальний вплив нафти на чисельність більшості досліджуваних фізіологічних груп аеробних мікроорганізмів: вільноживучих азотфіксаторів, деструкторів целюлози, нітрифікаторів, амоніфікаторів, дріжджів. Так, наприклад, в забрудненому нафтою ґрунті (75 г нафти/кг сухого ґрунту) без рекультиваційних заходів ріст нітрифікаторів практично був відсутній, кількість целюлозоруйнівних мікроорганізмів знизилась у 6,31 рази, азотфіксаторів мікроорганізмів у 5,46 рази, аеробних дріжджів в 6,91 рази порівняно з їх чисельністю у контрольному зразку ґрунту без забруднення (рис. 1–3). Дана тенденція до зменшення кількості мікроорганізмів спостерігалась в ґрунтах із нафтою у всіх досліджуваних концентраціях.

В той же час відбувався активний розвиток анаеробних мікроорганізмів, які, ймовірно, брали участь у деструкції вуглеводнів нафти. Даний ефект можна пояснити тим, що нафтове забруднення зумовлює збільшення кількості анаеробних зон ґрунту та забезпечує створення оптимальних умов даній групі мікроорганізмів. Зважаючи на сучасні дані про процеси анаеробного катаболізму вуглеводнів [9] цікаво було прослідкувати за динамікою чисельності анаеробних мікроорганізмів в нафтозабруднених ґрунтах, а особливо, дріжджів, серед яких багато видів належать до активних аеробних деструкторів вуглеводнів нафти [10]. В нафтозабруднених зразках ґрунту виявлено зростання кількості анаеробних дріжджів та денітрифікаторів. Так, через 3 місяці після внесення в ґрунт нафти кількість анаеробних дріжджів зросла у 1,07–5,99 разів порівняно із ґрунтом без забруднення (рис. 4).



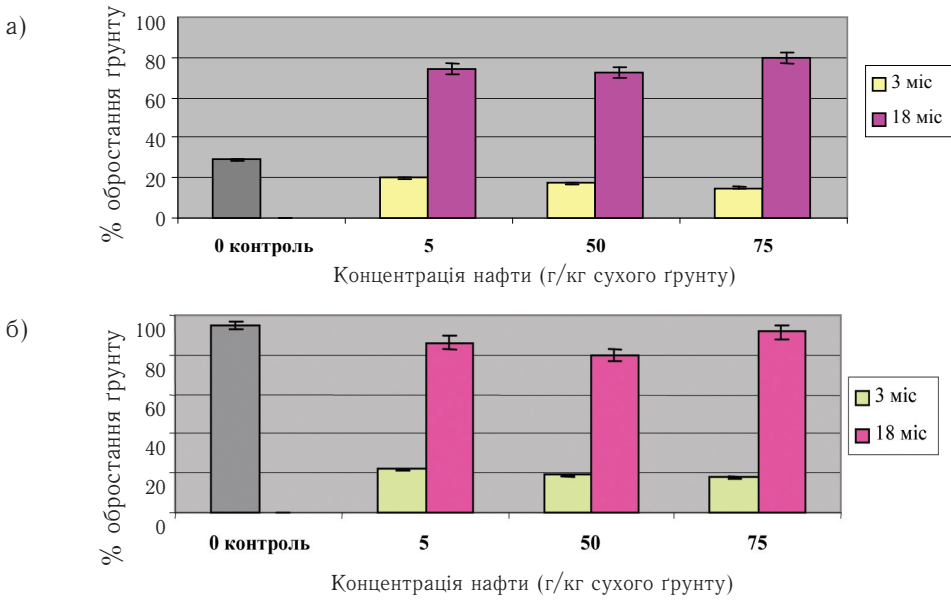


Рис. 1 Динаміка чисельності целюлозоруйнівних мікроорганізмів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації; б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 1 Dynamics of cellulose-degraded microorganisms quantity of oil contaminated soil: a) without recultivation; b) recultivated by *C. hirta*

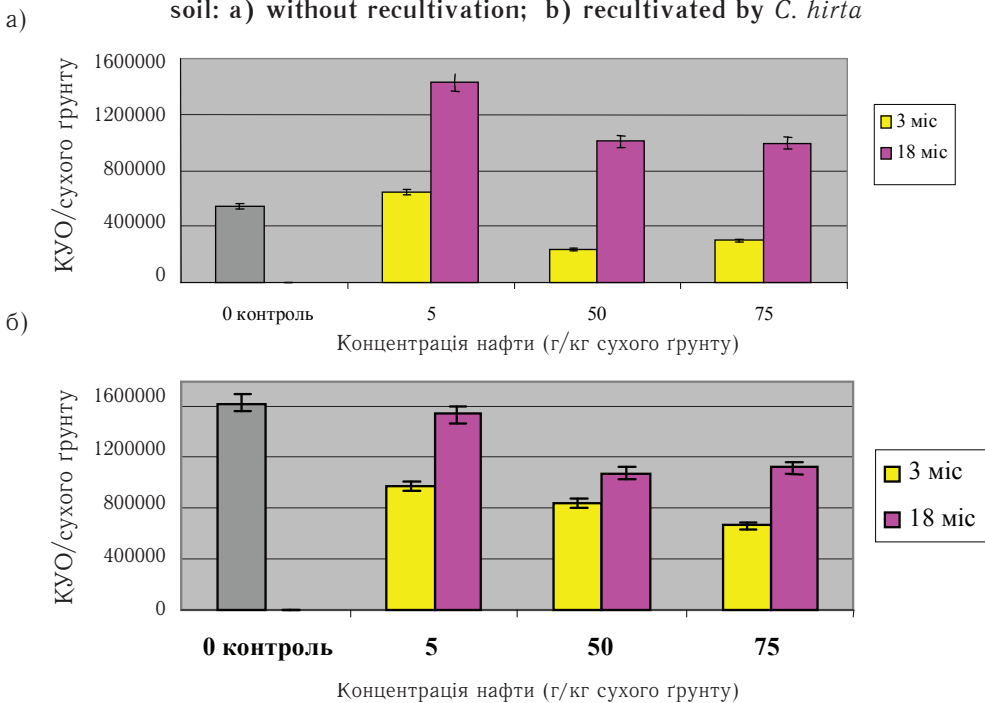


Рис. 2 Динаміка чисельності азотфіксувальних мікроорганізмів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 2 Dynamics of nitrogen-fixing microorganisms quantity of oil contaminated soil: a) without recultivation; b) recultivated by *C. hirta*

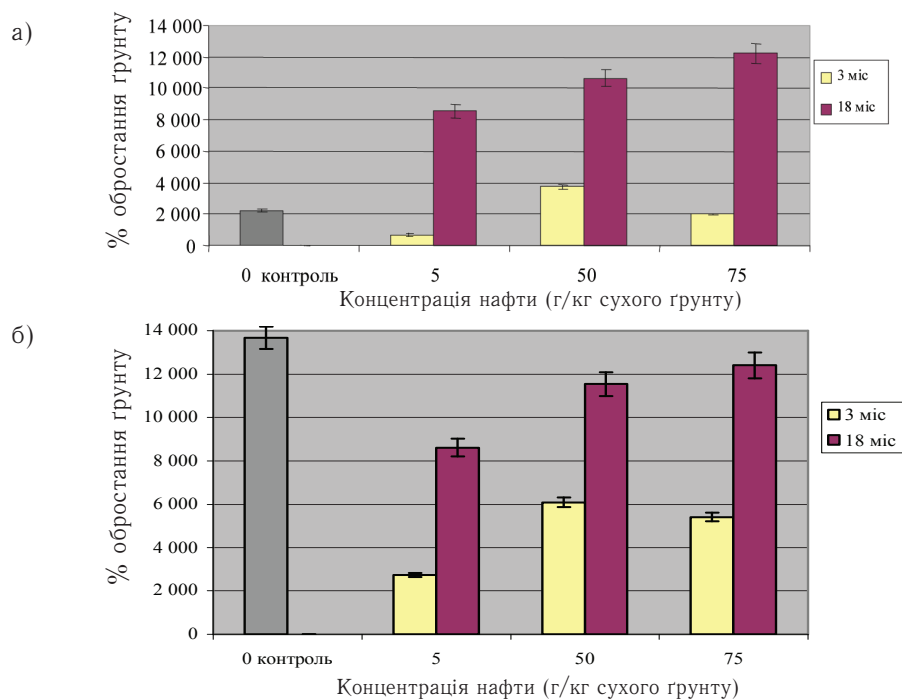


Рис. 3 Динаміка чисельності аеробних дріжджів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації; б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 3 Dynamics of aerobic yeast quantity of oil contaminated soil: а) without recultivation; б) recultivated by *C. hirta*

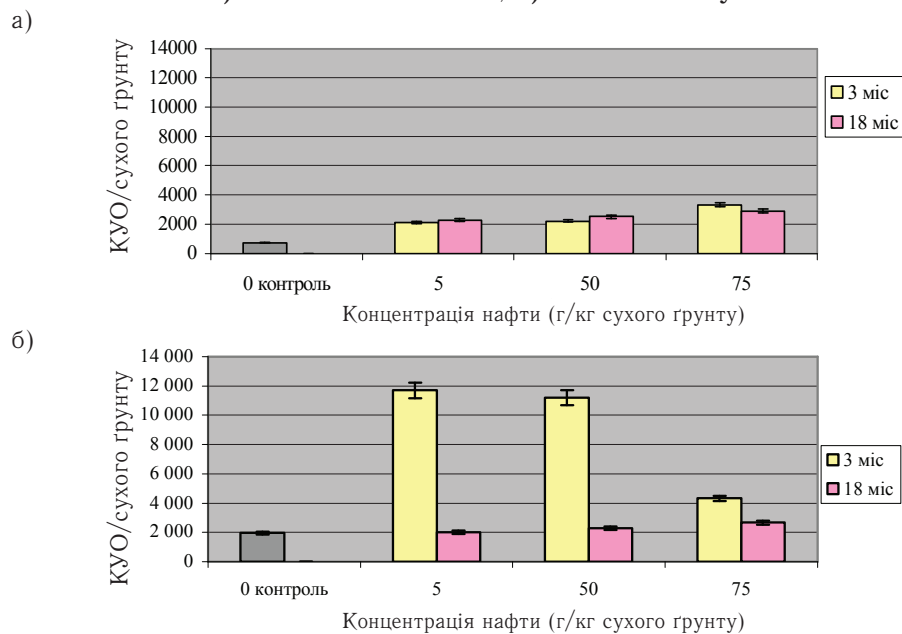


Рис. 4 Динаміка чисельності анаеробних дріжджів нафтозабрудненого ґрунту: а) без рекультивації; б) рекультивованого *C. hirta*

Fig. 4 Dynamics of anaerobic yeast quantity of oil contaminated soil: а) without recultivation; б) recultivated by *C. hirta*

Осока шершава, поглинаючи нафту, знижувала її токсичний ефект та створювала оптимальні умови для розвитку мікроорганізмів, тому в рекультивованому ґрунті чисельність мікроорганізмів більшості проаналізованих фізіологічних груп була вищою, ніж у ґрунті без рослин (рис. 1–4). Так, наприклад, у ґрунтах із нафтою (50 г/кг сухого ґрунту) з висадженою осокою шершавою кількість азотфіксаторів була в 3,6 рази вищою, нітрифікаторів в 2,3 рази, дріжджів в 1,6 рази, целюлозоруйнівних мікроорганізмів в 1,1 рази, ніж популяція мікроорганізмів цих фізіологічних груп у ґрунтах з аналогічним забрудненням нафтою, але без рекультиваційних заходів. Виявлено здатність мікроорганізмів, виділених з нафтозабрудненого ґрунту, утилізувати вуглеводні нафти.

C. hirta позитивно впливала і на рівень мікробної деструкції вуглеводнів нафти. Цей ефект особливо виявлявся у перші місяці після забруднення. В ґрунтах, засаджених осокою шершавою рівень мікробної деструкції вуглеводнів був вищим на 6,1%, ніж в ґрунтах без рекультиваційних заходів. За 3 місяці вміст вуглеводнів знизився на 75,3% і 81,4% (табл.) у зразках ґрунту відповідно без рослин та з осокою шершавою.

Таблиця

Біодеградація нафти в ґрунті протягом 12 місяців при рекультивації осокою шершавою *C. hirta* та без рекультиваційних заходів

Table

Biodegradation of oil in soil for 12 months being recultivated by *Carex hirta* and without any recultivative methods

Рекультиваційні заходи	Вихідний вміст нафти у ґрунті, г/кг	Очищення ґрунту від нафти, %	
		3 міс	12 міс
не проводили	50,0	75,3±2,28*	93,2±1,24*
проводили	50,0	81,4±1,65*	97,6±1,98*

Примітка: * — різниця між контрольним і дослідними варіантами достовірна при $P < 0,05$

Через 18 міс після нафтового забруднення кількість мікроорганізмів усіх фізіологічних груп практично повністю відновилася, а анаеробних мікроорганізмів знизилася і була близькою до рівня їх чисельності у контрольних зразках ґрунту без забруднення (рис. 1–4). За цей період вміст нафтопродуктів в усіх ґрунтових пробах знизився до залишкового (табл.).

Таким чином, виявлено позитивний вплив *C. hirta* на чисельність мікроорганізмів ґрунтової мікробіоти досліджуваних фізіологічних груп та рівень мікробної деструкції вуглеводнів нафти. Отримані результати вказують на перспективність застосування рекультивації *C. hirta* для фітомікроборемедіації нафтозабруднених ґрунтів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Боронин А.М., Кочетков В.В. Биотехнологические основы восстановления плодородия почвы на базе микробно-растительного взаимодействия // Материалы научно-практической конференции «Актуальные проблемы сельскохозяйственной биотехнологии», Воронеж, 18–19 мая 2004 г. — Москва, «Златограф». — 2004. — С. 7.
2. Джура Н.М., Романюк О.І., Гонсьор Я., Цвілинюк О.М., Терек О.І. Використання рослин для рекультивациі ґрунтів, забруднених нафтою та нафтопродуктами // Екологія та ноосферологія. — 2006. — Т. 17, № 1–2. — С. 55–60.
3. Джура Н., Цвілинюк О., Терек О. Вплив нафтового забруднення ґрунту на морфофізіологічні особливості рослин // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. — 2005. — Вип. 40. — С. 51–58.
4. Цайтлер М.Й. Відновлення рослинного покриву і зміни структури ценопопуляцій трав'яних рослин на нафтозабруднених територіях Бориславського нафтового родовища: Автореферат дис. канд. біол. наук. — Д., 2001. — 16 с.
5. Гудзь С., Гнатуш С., Білінська І. Практикум з мікробіології. Ч. 1. Навчальний посібник. — Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2003. — 80 с.
6. Delaney M.L., Onderdonk A.B. Evaluation of the Anaeropack system for growth of clinically significant anaerobes // J. Clin. Microbiol. — 1997. — vol. 35, № 3. — P. 558–562.
7. Теннер Е.З., Шильникова В.К., Переверзева Г.И. Практикум по микробиологии. 3-е изд. — М.: Агропромиздат, 1987. — 239 с.
8. Дмитриев М.Т., Казнина Н.И., Пинигина И.А. Санитарно-химический анализ веществ в окружающей среде. — М.: Химия, 1989. — 210 с.
9. Heider J, Fuchs G. Anaerobic metabolism of aromatic compounds // Eur. J. Biochem. — 1997. — № 243. — P. 577–596.
10. Neujahr H.Y. Yeast in biodegradation and biodeterioration processes // In: Verachtert H., De Mot R. (eds) Yeast biotechnology and biocatalysis. Marcel Dekker, New York, 1990. — P. 321–348.

**I.B. Rusyn¹, O.M. Figurka¹, U.M. Figurka¹,
N.M. Dzhura², O.M. Moroz², V.P. Novikov¹**

¹National University „Lviv Polytechnic”, Bandera str., 12, Lviv, 79013, Ukraine,
e-mail: rib@gala.net

²Ivan Franko National University of Lviv, Hrushevsky str., 4, Lviv, 79005, Ukraine

MICROORGANISMS OF OIL POLLUTED SOILS RECULTIVATED BY *CAREX HIRTA*

Summary

It has been conducted monitoring for the natural self-recovery of oil polluted loamy grounds by soil microorganisms as a basic factor and observing for recovering process in the soils recultivated by *Carex hirta*.

Quantity of microorganisms most of the investigated physiological groups was reduced in the first months after oil pollution, the intensific development of hydrocarbon-utilizing microorganisms in ground was observed at the same time. The positive effect of *C. hirta* on the processes of microorganisms growth most of physiological groups and microbial destruction of hydrocarbon was revealed in the first months



after oil pollution. Quantity of microorganisms of all physiological groups practically completely recovering and hydrocarbon contents in soil was remained in 18 months after oil pollution.

An oil-resistant and long-rooted plant *C. hirta* favours the intensific development of oil-destructive microorganisms in polluted soil and accordingly positively influences on the level of microbial destruction of oil hydrocarbons. Using of *C. hirta* and microorganisms in complex of bioremediation measures is a perspective method for soil purification from oil contamination.

К е у w o r d s: oil polluted soil, microorganisms, *Carex hirta*.

**И.Б. Русын¹, О.М. Фигурка¹, У.М. Фигурка¹,
Н.М. Джура², О.М. Мороз², В.П. Новиков¹**

¹Национальный университет „Львовская политехника”, ул. С. Бандеры, 12,
г. Львов, 79013, Украина, e-mail: rib@gala.net

²Львовский национальный университет имени Ивана Франка, ул. М. Грушевского,
4, г. Львов, 79005, Украина

МИКРОБИОТА НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННОЙ ПОЧВЫ, РЕКУЛЬТИВИРОВАННОЙ РАСТЕНИЯМИ *CAREX HIRTA*

Реферат

Проведен мониторинг природного процесса самовосстановления нефтезагрязнённых глинистых грунтов при участии почвенных микроорганизмов как основного фактора, а также наблюдение за ходом этого процесса в грунтах со специально высаженной осокой шершавой *Carex hirta*.

В первые месяцы после нефтяного загрязнения выявлено снижение численности микроорганизмов большинства исследуемых физиологических групп и одновременно активизацию развития углеводородутилизующей микробиоты. Отмечено позитивное влияние *C. hirta* на рост микроорганизмов большинства физиологических групп и уровень микробной деструкции углеводородов нефти в первые месяцы после загрязнения. Через 1,5 года численность микроорганизмов всех физиологических групп практически полностью восстановилась, а содержание углеводородов в почве было остаточным.

Нефтерстойкая, долгокореневищная *C. hirta* способствует интенсификации развития микроорганизмов-деструкторов на нефтезагрязнённых грунтах и соответственно деструкции углеводородов нефти. Использование *C. hirta* в комплексе микробофиторемедиационных мероприятий является перспективным методом очищения окружающей среды от нефтяных загрязнений.

К л ю ч е в ы е с л о в а: нефтезагрязнённая почва, микроорганизмы, *Carex hirta*.

