

ЭФФЕКТ ВЛАЖНОСТИ И ВЕРХНЕГО ТЕХНОГЕННО НЕЗАГРЯЗНЕННОГО СЛОЯ ПОЧВЫ В БИОДЕГРАДАЦИИ ТРИДЕКАНА

© 2004 А.В. Костерин,¹ О.А. Софинская²

В эксперименте исследовалась способность тридекана к биодegradации в условиях различной влажности почвы и притока неадаптированных к тридекану микроорганизмов в сообщество, искусственно введенное в анабиоз. Для притока неадаптированных микроорганизмов насыпали друг на друга слои почвы: "чистый" и загрязненный тридеканом. Наблюдался достоверный положительный эффект верхнего "чистого" слоя и влажности почвы в биодegradации тридекана. Установлена позиционно недоступная для биодegradации концентрация тридекана.

Введение

Биодegradация углеводов, то есть окисление их молекул в результате деятельности микробов, является основным, а порой и единственным процессом самоочищения почв от большинства углеводов нефти. Интенсивность испарения компонентов нефти в 2,5–30 раз меньше интенсивности их биодegradации [1, 2]. Доступность углеводов для биодegradации зависит от их класса, разветвленности и длины углеродной цепочки, наличия в соединении галогенов, кислорода или других гетерогенных атомов, а также концентрации углеводов в среде. Кроме того, способность к окислению углеводов зависит от штамма микроорганизмов и условий их жизнедеятельности (аэрации, содержания CO₂ в воздухе и проч.). Углеводородоокисляющие микроорганизмы — это бактерии, дрожжи и микромицеты, реже встречаются различные виды актиномицетов [3, 4].

Из всех компонентов нефти наиболее доступны для биодegradации н-алканы C₁₂–C₁₈ [3]. Оптимальные для роста микроорганизмов концентрации н-алканов в различных средах варьируют от 0,5 до 2–5% [3, 5]. Ароматические углеводороды более токсичны, поэтому оптимальными для их биодег-

¹Костерин Александр Васильевич (Alexander.Kosterin@ksu.ru), НИИ математики и механики им. Н.Г. Чеботарева Казанского государственного университета, 420008, Россия, Казань, ул. Кремлевская, 18.

²Софинская Оксана Александровна (ushik2001@mail.ru), кафедра моделирования экосистем Казанского государственного университета, 420008, Россия, Казань, ул. Кремлевская, 18.

градации являются концентрации в 10–100 раз меньшие, чем концентрации *n*-алканов [3]. Наиболее труднодоступны для биodeградации полициклические ароматические углеводороды. Нефть и ее фракции обладают, как правило, средней доступностью для микроорганизмов, однако токсичность сырой нефти часто бывает усугублена примесями сернистых соединений и тяжелыми металлами.

Биodeградация *n*-алканов начинается с окисления одной из конечных метильных групп с образованием первичного или вторичного спирта. Эта первая ступень существенно зависит от содержания кислорода в среде и в подавляющем большинстве случаев является аэробной. Затем из спирта образуется альдегид или кетон, а из них, в свою очередь, жирная кислота [3]. Жирные кислоты высококалорийны и более легкодоступны для микроорганизмов, чем предшествующие соединения. Следовательно, в дальнейшем разложении загрязнения могут участвовать менее приспособленные к нефти микроорганизмы [4], в том числе анаэробы.

Скорости окисления углеводов варьируют в зависимости от их биологической доступности, концентрации и времени приспособления микроорганизмов к изменению почвенных условий под действием загрязнителя. В почве окисление смесей углеводов идет на несколько порядков медленнее, чем в культуральной среде. Сырая нефть характеризуется промежуточной скоростью биodeградации между гексадеканом в культуральной среде и смесью полициклических ароматических углеводов в почве [1, 2, 6, 7]. Биodeградация как последней смеси, так и сырой нефти усиливается с повышением их концентрации в почве. В водно-нефтяной эмульсии условия близки к культуральной жидкости: наиболее быстро разлагаются *n*-алканы — почти полностью за 28 дней, сложнее — полициклические ароматические и моноароматические углеводороды [6, 8, 9, 10].

В почве, в отличие от условий лабораторного культивирования, действуют факторы, затрудняющие разрушение углеводов. К ним можно отнести антагонизм и выедание углеводородоксиляющих микроорганизмов другими микроорганизмами, а также позиционную недоступность углеводов. Некоторая часть углеводов в почве не может или почти не может быть подвергнута биodeградации. Это происходит даже в случае высокой биохимической доступности углеводов. Диаметр живых клеток или толщина грибных гиф бывает не менее 1–2 мкм [11, 12], в то время как углеводород теоретически способен размещаться и в более мелких почвенных порах [13]. Таким образом, ограничение на доступность накладывают размеры микроорганизмов. Из мелких пор углеводороды вытесняются водой при поливе, поэтому можно ожидать, что с повышением влажности почвы должна расти позиционная доступность углеводов для микробного окисления, а не только численность самих микроорганизмов (последнее показано в [14], но не наблюдалось в [15]).

Исходя из этой гипотезы, можно теоретически рассчитать пределы влажности почвы, в которых вероятна полная биodeградация биохимиче-

ски доступного углеводородного загрязнителя. Для расчета примем характеристики почвы, использованной в эксперименте, о котором будет сказано ниже. Почва — тяжелосуглинистый выщелоченный чернозем Алексеевского района Республики Татарстан. В состоянии набухания в приповерхностном слое почвы (0–20 см) 59% порового объема — это поры менее 3 мкм [16]. Соответственно, влагонасыщенность $0,59 \text{ см}^3/\text{см}^3$ позволяет вытеснить углеводороды из этих пор. Плотность почвы составляла $1,1 \text{ г}/\text{см}^3$, полная влагоемкость — 57% вес [16]. Тогда влагонасыщенность $0,59 \text{ см}^3/\text{см}^3$ соответствует 31% вес. влажности почвы. Таким образом, мы нашли нижний предел влажности, при которой вероятна полная биodeградация углеводорода. Поскольку вода и воздух в почве являются конкурентами за поровое пространство, верхний искомый предел должен соответствовать проценту содержания влаги в почве, при котором существенно падает доступность кислорода для микроорганизмов-углеводородокислителей. Наименьшая (или полевая) влагоемкость (НВ) данной почвы составляла 37% весовых [16], т.е. 0,65 полной влагоемкости. В то же время разные авторы считают оптимальной влажностью для биodeградации нефтяных углеводородов от 0,6–0,8 [17, 18] до 1 полной влагоемкости [2, 19]. Это позволяет предположить, что в данной почве, если нет капиллярно подпертой влаги, верхний предел влажности для полной биodeградации тридекана не достигается.

О возможности эффекта фитореабилитации

В литературе часто указывают на положительный эффект растений в биodeградации нефтяных углеводородов, называемый фитореабилитацией почв [2, 7, 8]. Однако этот эффект был отмечен лишь для достаточно взрослых растений: 5–22 недели [2], 16 недель [7]. Замечено, что пик численности бактерий, актиномицетов и грибов в ризосфере растений, совпадающий с максимумом корневых выделений, приходится на 13–14 дни вегетации в лабораторных условиях [20] и на 4 неделю вегетации в полевых условиях [21], а после этого количество корневых выделений падает и к концу вегетации достигает нуля [21]. Обильные корневые выделения "отвлекают" микроорганизмов от окисления углеводородов, поставляя им взамен гораздо более доступную органику. Мы получаем в данном случае не конкуренцию микроорганизмов за субстрат, а "конкуренцию" двух субстратов (углеводородного и растительного) за окисление микроорганизмами. Когда количество выделений сокращается, часть микроорганизмов может освоить новый субстрат. Корни растений в процессе дыхания выделяют CO_2 и тем самым участвуют в образовании углекислоты. Карбонильная группа ($\text{C}=\text{O}$), содержащаяся в углекислоте, повышает питательную ценность субстрата для микроорганизмов и позволяет более интенсивно использовать углеводороды как энергетический материал для дыхания и брожения. Таким образом, при достаточной аэрации CO_2 стимулирует микробное окисление углеводо-

родов [3]. Следовательно, фиторемедиация может иметь место тогда, когда группы микроорганизмов не получают достаточное количество легкодоступной органики корневых эксудатов, но находятся в почвенном воздухе, обогащенном углекислотой.

Эксперимент

н-Тридекан ($C_{13}H_{28}$) относится к классу н-алканов, кипит при $235\text{ }^{\circ}\text{C}$ и характеризуется низкой токсичностью и высокой доступностью для почвенных микроорганизмов по сравнению с большинством углеводов. В своем эксперименте мы исследовали его способность к биodeградации под действием различной влажности почвы, наличия растений и притока неадаптированных к углеводородам микроорганизмов. По аналогии с работой [2], насыпали друг на друга два слоя почвы: загрязненный тридеканом, а поверх его — незагрязненный, который в дальнейшем будет называться условно "чистым" (рис. 1). В работе [2] это было сделано для того, чтобы исключить влияние углеводородного загрязнения почвы на прорастание семян растений. Мы предположили, кроме того, что микроорганизмы могут переходить из "чистого" слоя в загрязненный и ускорять биodeградацию тридекана. В дальнейшем мы обозначим этот тип загрязнения почвы как "0/ТД", а тип с обоими загрязненными слоями — как "ТД/ТД". Объемы обоих слоев были равными. Условия загрязнения почвы были таковы, что происходило искусственное введение микроорганизмов в анабиоз. Впадение в анабиоз в данном случае было реакцией микроорганизмов на стрессовую ситуацию, сложившуюся при компостировании почвы с тридеканом: нехватку кислорода и влаги, а также токсичность среды.

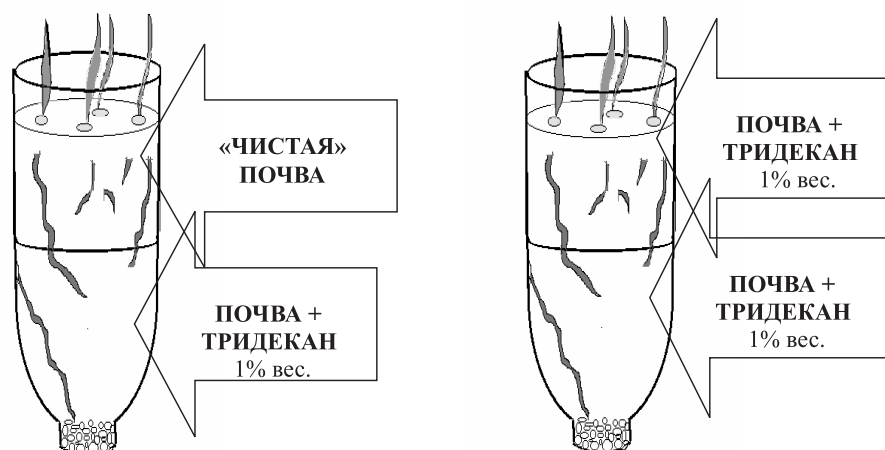


Рис. 1. Схема эксперимента

Условия проведения эксперимента

Пластиковые колонки диаметром 6 см и высотой 14 см наполняли 300 г воздушно-сухой почвы — выщелоченного чернозема (Алексеевский район, Татарстан). Верхние 150 г почвы образовывали слой 5 см, нижние — 8 см, поскольку внизу цилиндрическая колонка на 6,5 см выходила в конус. Выбор формы колонок был обусловлен формой исходного материала (стандартные пластиковые бутылки 0,6 л). В донышках колонок прорезали дренажные отверстия.

Плотность сложения почвы составляла 1,11 г/см³. Почву для набивки колонок готовили следующим образом. В воздушно сухом состоянии ее просеивали через сито с диаметром ячейки 0,4 см. Таким образом просеянная почва считается оптимальной для жизнедеятельности микроорганизмов и корней растений (ISO 11269 PT*L 93 – 4851903 0547792 283). Затем почву смешивали с 1% вес. тридекана и помещали в герметичную емкость. Емкость выдерживали при комнатной температуре 20 дней, перетряхивая ее ежедневно. Полученная концентрация тридекана проверялась хроматографически. После этого осуществляли набивку колонок согласно рис. 1. Перед набивкой на дно колонок насыпали дренаж — зерна полиэтилена. Почва увлажнялась по весу до влажностей 8–37% (НВ), которые поддерживались в течение опыта путем ежедневного полива дистиллированной водой. Так как влажность почвы не превышала НВ, стока из колонок через дренажные отверстия не происходило.

В некоторые колонки были посеяны семена овса. Семена прорастали за 3–5 дней и к моменту завершения опытов достигали 10-дневного возраста. Варианты с растениями требовали ежедневного полива до 25% влажности (обеспечение нормальной жизнедеятельности), а конечная влажность почвы создавалась только за последние 3 дня перед уборкой урожая.

Опыты длились 14–91 день. По истечении срока колонки разбирали.

Отбор проб

Разбор колонок проводили после их разрезания по первоначальной линии раздела слоев. Приграничные 2 см почвы отбрасывали, поскольку здесь слои почвы могли пересекаться из-за неравномерности набухания почвенных частиц при поливе. Каждый слой в отдельности тщательно перемешивали и отбирали пробы на влажность и содержание тридекана.

Отбор проб и определение влажности осуществлялись в соответствии со стандартной методикой (ISO 11269 PT*L 93 – 4851903 0547792 283).

Отбор проб на содержание тридекана. Навеску влажной почвы 10 г помещали в колбу на 100 мл и приливали к ней 10 мл гексана (C₆H₁₄) в качестве растворителя. Колбу встряхивали в течение 23 ч. К полученной суспензии добавляли 15 мл дистиллированной воды для того, чтобы вытеснить остатки гексанового экстракта из почвенных пор, и встряхивали

еще в течение 1 ч. Затем смесь центрифугировали и сливали гексановый экстракт в чистую колбу для хроматографии.

Хроматография гексановых экстрактов почвы

Анализ содержания тридекана в гексановом экстракте проводился методом газожидкостной хроматографии. Использовалась хроматографическая насыпная колонка длиной 1 м с фазой SE-30 на носителе AW-HMDS. Колонка находилась в термостате при температуре 130 °С. Ввод в колонку осуществлялся вручную через испарительную камеру с температурой 250 °С. Количественное определение углеводородов проводили на пламенно-ионизационном детекторе при температуре 250 °С с порогом обнаружения 0,001% вес. (соответствует в нашем случае 0,1% относительной ошибки). В качестве газа-носителя применялся гелий. Для определения массы содержащегося тридекана в пробу вводили внутренний стандарт — додекан ($C_{12}H_{26}$) в концентрации 1 мкл/мл. Аналитический повтор (повтор ввода пробы в колонку) составлял 2–3, относительная погрешность (ошибка ввода) — 5%.

Пересчет количества тридекана в 1 мл экстракта на 1 г абсолютно сухой почвы осуществлялся с учетом полноты экстракции тридекана из почв с различной влажностью. Полноту экстракции определяли в серии вспомогательных экспериментов с выщелоченным черноземом в диапазоне влажности 0–37%. По результатам этих экспериментов была построена регрессионная зависимость полноты экстракции E от влажности W , которая имела вид:

$$E(\%) = 100 - 1,92 * W.$$

Статистическая обработка результатов эксперимента

В целом было проведено 8 экспериментов. Продолжительность каждого эксперимента 14 дней. Повторность каждого варианта эксперимента 2–9. Результаты были статистически обработаны для определения ошибки измерений и ошибки наблюдений. Обработка результатов велась по диапазонам влажности почвы, сформированным из следующих физических соображений: 8% — минимальная наблюдаемая в эксперименте влажность, 17% — влажность устойчивого завядания растений в тяжелосуглинистом черноземе, соответствующая разрыву сплошности капилляров, 25% (0,7 НВ) — минимальная из рекомендуемых влажностей для экспериментов с выращиванием растений в почве (ISO 11269 PT*L 93 – 4851903 0547792 283), 31% — рассчитанный нижний предел влажности, при котором возможна полная биodeградация тридекана в данной почве (см. выше), 37% — наименьшая влагоемкость.

Варианты с "чистым" слоем сверху и без него сравнивались между собой. Для надежности сравнение проводили как исходя из предположения о

нормальном распределении выборок, так и исходя из неизвестного распределения. В последнем случае применялось непараметрическое парное сравнение элементов выборок по одностороннему критерию знаков. Гипотеза о различии дисперсий вариантов с "чистым" слоем почвы сверху и без него была проверена с помощью дисперсионного анализа (критерий Фишера). Гипотеза о различии средних в вариантах проверялась по t -тесту (критерий Стьюдента). Величина эффекта верхнего слоя почвы оценивалась по t -критерию при уровне значимости 0,15. Данный уровень значимости был продиктован точностью всех этапов измерений: 0,05 — вероятность ошибки ввода в хроматограф при анализе пробы, 0,1 — вероятность ошибки определения полноты экстракции.

На гистограмме частот всех измерений содержания тридекана выделяются два максимума (рис. 2), что говорит о сложном распределении элементов выборки. Наличие двух максимумов свидетельствует, что средняя интенсивность биodeградации тридекана в вариантах "0/ТД" и "ТД/ТД" различна, и подтверждает выдвинутую ранее гипотезу о влиянии верхнего "чистого" слоя почвы на этот процесс.

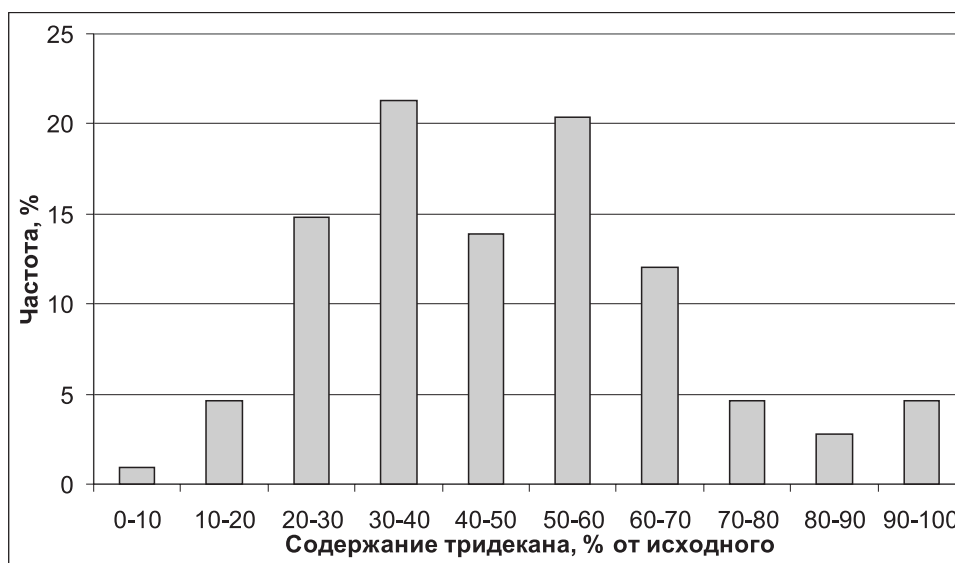


Рис. 2. Гистограмма частот содержания тридекана в почве в различных вариантах опыта

Для более строгой проверки сформулированной выше гипотезы были проанализированы распределения элементов внутри разных вариантов опыта. Они имеют по одному максимуму частоты, делящему каждую выборку пополам (рис. 3). Это указывает на совпадение моды и медианы и позволяет предположить нормальное распределение выборок внутри вариантов. Кроме того, было проведено сравнение среднего и медианы выборок. Их совпадение подтвердило нормальное распределение концентраций три-

декана внутри каждого варианта опыта. Таким образом, стало возможным сравнить интенсивность биodeградации в вариантах "0/ТД" и "ТД/ТД" с использованием критерия Стьюдента (табл. 1).

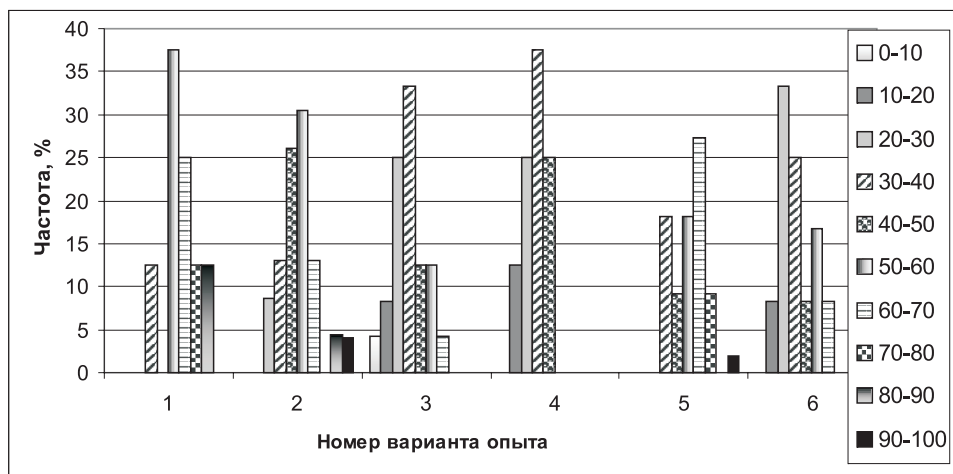


Рис. 3. Гистограммы частот содержания тридекана в почве в разных вариантах опыта (варианты: 1 — 0/ТД с растениями при влажности почвы 8–17%, 2 — ТД/ТД без растений при влажности почвы 17–25%, 3 — 0/ТД без растений при влажности почвы 17–25%, 4 — 0/ТД с растениями при влажности почвы 17–25%, 5 — ТД/ТД без растений при влажности почвы 26–30%, 6 — 0/ТД без растений при влажности почвы 26–30%; в легенде — содержание тридекана, % от исходного)

Таблица 1
Вероятность различия интенсивности биodeградации
в вариантах "0/ТД" и "ТД/ТД"

Влажность почвы, %	Вариант			
	Без растений		С растениями	
	Вероятность различия мат. ожиданий	Вероятность различия дисперсий	Вероятность различия мат. ожиданий	Вероятность различия дисперсий
8–17	0,76	0,96	0,8	0,03
17–25	1	0,48	1	0,73
26–30	0,99	0,83	—	—
31–НВ	0,96	0,56	—	—
Общая вероятность по всем уровням влажности	1	0,42	1	0,72

Эксперименты экспозиции 30–91 день были обеспечены меньшим количеством данных, по-этому полученные динамические зависимости в половине случаев носят качественный характер, а статистически достаточно оснащены лишь 4 точки.

Обсуждение результатов

14-й день опыта

В почве варианта "ТД/ТД" без растений при влажности 8–17% (рис. 4) была велика ошибка эксперимента, поэтому отличие в биодegradации тридекана при этой влажности и при больших недостоверно. Можно сказать, что в варианте опыта "ТД/ТД" без растений интенсивность биодegradации тридекана возрастала с ростом влажности до 25%, а далее практически не менялась. В варианте "ТД/ТД" с растениями и при влажности почвы 17–25% биодegradация тридекана была достоверно больше, чем при влажности 8–17%. Таким образом, различия в содержании тридекана в зависимости от влажности оказались более четкими в почве с растениями, чем в почве без растений. В диапазоне влажности 8–25% влияние корней растений на биодegradацию тридекана существенно не проявилось.

В варианте "0/ТД" биодegradация тридекана возрастала в 2 раза при влажности почвы выше 17% по сравнению с более низкой влажностью. В диапазоне влажности 17%–НВ биодegradация тридекана достоверно не изменялась. Выращивание растений в этом варианте не привело к существенному изменению картины. При влажности почвы 8–17% растения незначительно ускорили биодegradацию тридекана, однако необходимо помнить, что эта влажность не поддерживалась постоянно. В последнем случае за 3 дня до снятия опыта влажность почвы была 25%, поэтому ее низкое конечное значение является следствием активного поглощения воды корнями растений. В связи с этим можно предположить, что интенсивная деятельность корней растений сказалась и на биодegradации тридекана.

Был обнаружен достоверный эффект "чистого" верхнего слоя почвы, который проявлялся как усиление биодegradации тридекана в варианте "0/ТД" по сравнению с вариантом "ТД/ТД". Наблюдаемый эффект верхнего "чистого" слоя почвы не подчинялся нормальному распределению. Непараметрическое сравнение между собой выборок с верхним "чистым" слоем почвы и без него показало близкую к 1 вероятность того, что эти варианты различаются между собой. Исключение составили варианты при влажности почвы 8–17%, где соответствующая вероятность составила 0,67.

Сравнение основных характеристик нормального распределения — математического ожидания и дисперсии по критериям Стьюдента и Фишера соответственно показало, что большинство вариантов "0/ТД" отличалось от вариантов "ТД/ТД" по обеим характеристикам (табл. 1). Без учета влажности почвы вероятность отличия выборочных средних в вариантах "ТД/ТД" и "0/ТД" была равна 1, вероятность отличия выборочных дисперсий была 0,72 в почве с растениями и 0,42 — без растений. Наиболее похожими оказались дисперсии в вариантах опыта с растениями при влажности почвы 8–17%, наименее похожими — при той же влажности, но без растений. Если дисперсии не похожи, то это значит, что в сравниваемых вариантах

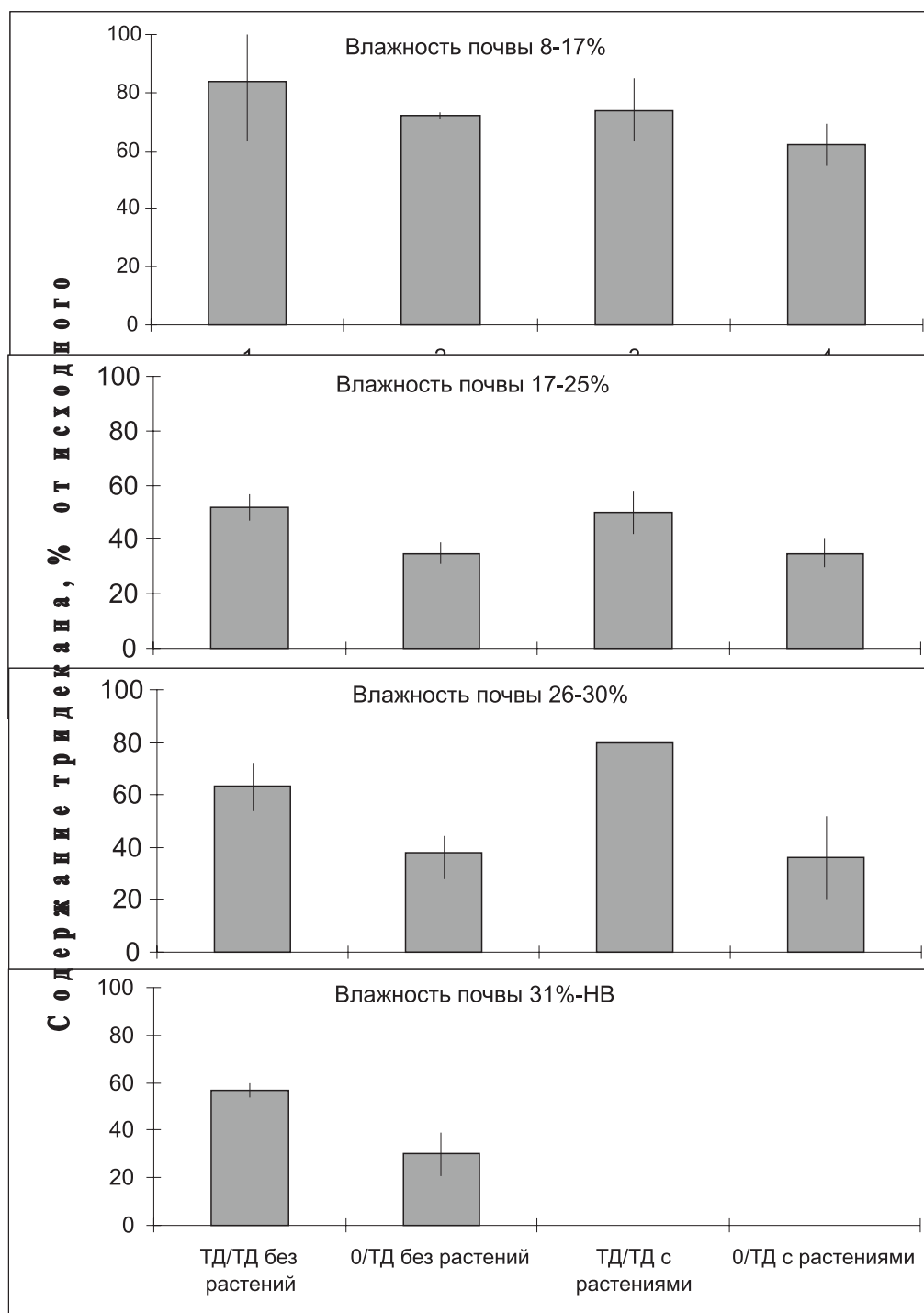


Рис. 4. Влияние влажности почвы и варианта набивки колонок на среднее содержание тридекана в почве после 14 дней опыта

опыта содержание тридекана падает под действием разных процессов. Если средние не похожи, то это значит, что процессы деградации тридекана в сравниваемых вариантах опыта идут с разной интенсивностью.

Суммируя сказанное о статистических величинах, получим следующее. Эффект верхнего "чистого" слоя в деградации тридекана практически не зависит от влажности почвы. При этом в диапазоне влажности 26–30% в почве без растений и 17–25% в почве с растениями биодеградация тридекана не просто стимулировалась верхним "чистым" слоем почвы, а, скорее всего, менялась группа микроорганизмов, осуществлявших биодеградацию. Это справедливо и для диапазона влажности 8–17% в почве без растений. Однако в почве с растениями дисперсии выборок с "чистым" слоем почвы и без него одинаковы, что говорит об однородности процесса биодеградации тридекана в обоих вариантах.

В почве без растений при любой ее влажности эффект верхнего "чистого" слоя почвы оставался почти одинаковым (табл. 2). В диапазоне влажности почвы 17–25% он был ниже, а рост растений не сказался на нем. При влажности почвы 8–17% растения снизили влияние "чистого" слоя почвы на биодеградацию тридекана. Усиление эффекта "чистого" слоя почвы в биодеградации тридекана в присутствии растений при повышении влажности почвы и стимулировании процесса деятельностью корней растений возможно, но вызывает некоторые сомнения, поскольку у нас не хватает данных по диапазону влажности 26–30%.

Таблица 2

Влияние верхнего "чистого" слоя почвы на биодеградацию тридекана в почве при экспозиции опыта 14 дней, % от исходного содержания тридекана

Влажность почвы, %	Вариант	
	Без растений	С растениями
8–17	27 ± 1	12 ± 5
17–25	19 ± 2	19 ± 34
26–30	28 ± 4	44 ± 16
31–НВ	27 ± 7	–

Относительная ошибка повторений эксперимента (табл. 3) в варианте "ТД/ТД" без растений уменьшалась с ростом влажности почвы, а в аналогичном варианте "0/ТД" росла. Эта ошибка может быть связана со случайными вариациями биодеградации тридекана, например, в зависимости от различий в набивке колонок почвой. Кроме биодеградации могли бы сказываться случайные отклонения в связывании тридекана гумусовыми веществами почвы. Однако вероятно, что последний процесс вносит очень небольшой вклад в деструкцию углеводов [23]. Таким образом, связывая ошибки эксперимента только с неоднородностью биодеградации тридекана, мы приходим к выводу, что роль этой неоднородности уменьшалась с увеличением влажности в варианте "ТД/ТД" и усиливалась в вариан-

те "0/ТД". Вероятно, это можно объяснить тем, что сукцессии микробиокомплексов в этих вариантах шли по-разному. В варианте "ТД/ТД" с ростом влажности микробиокомплекс все полнее выходил из состояния анабиоза, ликвидируя тем самым пространственную неоднородность потребления тридекана. В варианте "0/ТД" рост влажности почвы мог привести к потреблению тридекана теми группами микроорганизмов, которые в варианте "ТД/ТД" не вышли из анабиоза. Эти новые группы вступали в межвидовые взаимодействия, результат которых зависел от локальных условий (на одной почвенной грануле), внося в биodeградацию тридекана дополнительную неопределенность. Иными словами, большее биоразнообразие варианта "0/ТД" повышало устойчивость почвенного сообщества за счет понижения устойчивости потребления отдельно взятого субстрата (в нашем случае — тридекана).

Таблица 3

Относительные ошибки повторений эксперимента на 14-й день, %

Влажность почвы, %	Вариант			
	Без растений		С растениями	
	ТД/ТД	0/ТД	ТД/ТД	0/ТД
8–17	25	1	15	12
17–25	10	12	16	14
26–30	15	157	–	44
31–НВ	6	30	–	–

30–91-й дни опыта

Выявлен общий ход биodeградации тридекана во времени (рис. 5) в зависимости от разных почвенных условий. Быстрее всего она протекала в первые 14 дней. В варианте без растений "ТД/ТД" содержание тридекана падало в среднем на 40%, а в вариантах "0/ТД" — более, чем вдвое. В последующие дни биodeградация тридекана замедлялась, и ее скорость достигала 0 в варианте "0/ТД" при остаточном содержании тридекана 4% от исходной концентрации, а в варианте "ТД/ТД" — при остаточном содержании тридекана 6–8%. Разница остаточных содержаний тридекана между вариантами недостоверна. Вероятно, дальнейшему извлечению тридекана препятствовало снижение его позиционной доступности. Последнее означает, что тридекан стал недоступным для потребления микроорганизмами, заняв поры, меньшие, чем размер последних. В равной степени может быть вероятным и то, что вследствие малого количества тридекана произошел переход через пороговую ценность данного субстрата (теорема Чернова), и микроорганизмы от него отказались.

На 30-й день опыта скорость биodeградации тридекана повсеместно резко снизилась. Наибольшее падение произошло в тех случаях, когда на 14-й день достигались самые высокие темпы окисления тридекана. В вари-

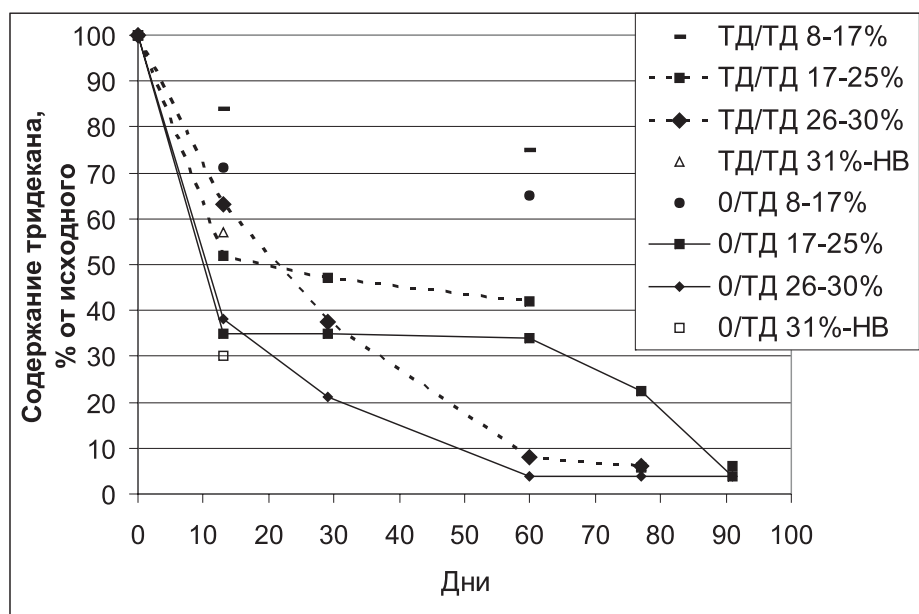


Рис. 5. Динамика биодegradации тридекана в почве при различных уровнях влажности почвы и вариантах набивки колонок

анте "ТД/ТД" скорость биодegradации тридекана была максимальна при влажности почвы более 26%. При влажности почвы менее 25% в варианте "0/ТД" скорость биодegradации тридекана упала до нуля (табл. 4). Наибольшее количество тридекана на 30-й день разложилось в варианте "0/ТД" при влажности почвы более 26%.

Таблица 4

Скорость биодegradации тридекана в почве в зависимости от продолжительности опыта, ‰ за сутки

Продолжительность опыта, дни	Вариант и влажность почвы, %							
	ТД/ТД, 8-17	ТД/ТД, 17-25	ТД/ТД, 26-30	ТД/ТД, 31-НВ	0/ТД, 8-17	0/ТД, 17-25	0/ТД, 26-30	0/ТД, 31-НВ
14	0,114	0,343	0,264	0,307	0,207	0,464	0,443	0,5
30	—	0,031	0,156	—	—	0	0,106	—
60	0,02	0,017	0,1	—	0,013	0,003	0,057	—
77	—	—	0,012	0,081	—	0,065	0	0,038
91	—	0,116	—	—	—	0,136	0	—

На 60-й день опыта самая маленькая скорость биодegradации тридекана была в варианте "0/ТД" при влажности почвы 17-25%, поскольку для развития микроорганизмов, окисляющих тридекан, осталось слишком мало доступного субстрата. Наименьшее количество тридекана к этому времени осталось, как и на 30-й день опыта, в варианте "0/ТД" при влажности почвы более 26%, а наибольшее — при влажности почвы 8-17% в варианте

”ТД/ТД”. 60-й день опыта показал, что влажность почвы влияла на биодegradацию тридекана сильнее, чем верхний ”чистый” слой почвы. При влажности почвы менее 25% скорость биодegradации тридекана была в 5–10 раз меньше, чем при влажности почвы более 26%.

На 77-й день опыта при влажности почвы более 26% биодegradация тридекана остановилась на несколько разных уровнях в разных вариантах опыта. При влажности 17–25% ее скорость выросла в варианте ”0/ТД” так, словно активизировалась еще одна группа микроорганизмов, окисляющих тридекан (”ТД/ТД” — нет данных). Возможно также, что при данной влажности к 14-му дню накопились продукты метаболизма, токсичные для микроорганизмов-окислителей, которые ингибировали их развитие. В этом случае к 60-му дню могли развиваться микроорганизмы, питающиеся данными продуктами метаболизма, которые сняли эффект автоингибирования, что и проявилось на 77-й день опыта.

К 91-му дню опыта при влажности почвы 17–25% биодegradация тридекана продолжалась в обоих вариантах приблизительно с одинаковыми скоростями.

Эффект верхнего ”чистого” слоя почвы снижался в зависимости от продолжительности опыта (табл. 5). До 60 дня опыта эта тенденция была слабо выражена при влажности почвы 17–25%. При иной влажности падение влияния верхнего ”чистого” слоя почвы на дegradацию тридекана с самого начала опыта было значительным.

Таблица 5

Влияние верхнего ”чистого” слоя почвы на биодegradацию тридекана (% от исходного содержания)

Дни	Влажность почвы, %			
	8–17	17–25	26–30	31–НВ
14	27	19	28	27
30	—	12	17	—
60	10	12	4	—
77	—	—	2	—
91	—	2	—	—

Итак, мы подтвердили экспериментально, что при влажности почвы выше 26% тридекан более доступен для микроорганизмов, чем при меньших влажностях. При стимулировании биодegradации тридекана верхним ”чистым” слоем почвы потребление тридекана микроорганизмами шло быстро и приводило к неустраняемой концентрации загрязнителя. В результате при меньших влажностях эффект верхнего ”чистого” слоя почвы на 60-й день опыта получился выше и практически одинаков в диапазоне влажности почвы 8–25%.

Заключение

1. Эффект верхнего техногенно незагрязненного слоя почвы достоверен и выражается в положительном влиянии на биodeградацию тридекана в почве.

2. Вышеуказанный эффект связан с притоком активных микроорганизмов в загрязненную почву, где аборигенное микробное сообщество находится в состоянии анабиоза, и почти не изменяется в зависимости от диапазона влажности почвы.

3. Под действием верхнего незагрязненного слоя почвы при ее влажности без растений 8–17 и 26–30%, а с растениями — 17–25% биodeградация тридекана, вероятно, происходит под действием иной группы микроорганизмов-деструкторов, чем в вариантах, где такой слой отсутствует. По-видимому, микробиокомплексы вариантов "0/ТД" отличаются большим биоразнообразием по сравнению с вариантами "ТД/ТД".

4. Действие 10-дневных проростков овса на биodeградацию тридекана не доказано.

5. Влажность почвы оказывает на биodeградацию тридекана большее влияние, чем верхний незагрязненный слой почвы, поскольку степень биodeградации коррелирует в вариантах с одинаковой влажностью сильнее ($r_{17-25\%} = 0,96$; $r_{26-30\%} = 0,98$), чем в вариантах с одинаковой комбинацией слоев почвы ($r_{\text{ТД/ТД}} = 0,92$; $r_{0/\text{ТД}} = 0,94$). Наблюдается неоднородность изменения скорости биodeградации тридекана при влажности почвы 17–25%. При этой влажности возможны как сукцессия микроорганизмов-деструкторов, так и активизация микроорганизмов, питающихся токсичными продуктами метаболизма. При влажности почвы 26–30% смена состава микробиокомплексов не происходит.

6. Правомерна гипотеза: интенсивность биodeградации тридекана в большей степени зависит от динамики почвенного микробиокомплекса, чем от его исходного состава.

7. Обнаружена концентрация тридекана, при которой он становится позиционно недоступным для биodeградации. Она составляет 4–8% от исходного содержания загрязнителя (0,04–0,08% весовых) независимо от варианта опыта.

8. Увеличение влажности почвы повышает позиционную доступность тридекана для биodeградации. При влажности почвы более 26% создаются наиболее благоприятные условия для биodeградации тридекана.

9. С приближением содержания тридекана в почве к тому, при котором он становится позиционно недоступным для биodeградации, влияние незагрязненного верхнего слоя почвы на деградацию тридекана маскируется ошибкой эксперимента.

Авторы выражают глубокую благодарность канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры микробиологии Казанского ГУ С.К.Зариповой за ценные консультации в области биологии почв.

Работа выполнена при финансовой поддержке МНТЦ (№ проекта 2419).

Литература

- [1] Осипов А.И., Пономарева Л.В., Иванова Т.А. Биологическая очистка нефтезагрязненных почв // Доклады РАСХН. №6. 1998. С. 20–22.
- [2] Guenter T., Dornberger U., Fritsche W. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil // Chemosphere. 1996. No. 2. V. 33. P. 203–215.
- [3] Билай В.И., Коваль Э.З. Рост грибов на углеводородах нефти. Киев: Наукова думка, 1980. 340 с.
- [4] Исмаилов Н.М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязненных почв // Восстановление нефтезагрязненных экосистем. М.: Наука, 1988. С. 42–56.
- [5] Зайченко А.М. Изучение окисления алканов некоторыми микромицетами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Киев, 1967. 21 с.
- [6] Wang Z., Fingas M., Blenkinsopp S. et al. Comparison of oil composition changes due to biodegradation and physical weathering in different oils // J. Chromatography A. 1998. Issue 809. P. 89–107.
- [7] Reynolds C.M., Koenen B.A., Perry L.B. et al. Phytoremediation in Korea: evidence for rhizosphere-enhanced PAH degradation // The 6-th International in situ and on-site bioremediation symposium. Part 5. San-Diego (USA): Battelle Press, 2001. P. 9–16.
- [8] Liste H.H., Alexander M. Accumulation of phenantrene and pyrene in rhizosphere soil // Chemosphere. 2000. Issue 40. P. 11–14.
- [9] Salanitro J.P. Bioremediation of PHCs in soil. New-York: Academic Press, 2001. P. 54–97.
- [10] Eriksson M., Swartling A., Dalhammar G. Biological degradation of diesel fuel in water and soil monitored with solid-phase micro-extraction and GC-MS // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1998. No. 50. P. 129–134.
- [11] Алехина Л.К., Головченко А.В., Початкова Т.Н. и др. Влияние гидрофизических свойств почв на структуру микробных комплексов // Почвоведение. 2002. №8. С. 1002–1009.
- [12] Шеин Е.В., Полянская Л.М., Девин Б.А. Перенос микроорганизмов в почве: физико-химический подход и математическое описание // Почвоведение. 2002. №5. С. 564–573.
- [13] Phanikumar M.S., Hyndman D.W. Interactions between sorption and biodegradation: Exploring bioavailability and pulsed nutrient injection efficiency // Water Res. Res. 2003. V. 39. No. 5. P. 1–13.
- [14] Звягинцев Д.Г. Влияние степени увлажнения на количество микроорганизмов, развивающихся в почве // Вестник Московского ун-та. Сер. 6. 1966. №4. С. 119–126.

- [15] Христенко С.И., Шатохина С.Ф. Влияние гидротермических факторов на микробный комплекс оподзоленного чернозема // Почвоведение. 2002. №3. С. 335–339.
- [16] Смирнова Е.В. Транспорт и распределение жидких углеводородов в выщелоченном черноземе: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Казань, 2003. 24 с.
- [17] Киреева Н.А., Мифтахова А.М., Кузяхметов Г.Г. Влияние загрязнения нефтью на фитотоксичность серой лесной почвы // Агрохимия. 2001. №5. С. 64–69.
- [18] Elektorowicz M., Ju L., Oleszkiewicz J.A. Bioavailability of xenobiotic organic compounds to remediate soil containing clay fractions // The 6-th International in situ and on-site bioremediation symposium. Part 5. San-Diego (USA): Battelle Press, 2001. P. 249-275.
- [19] Johnson C.R., Scow K.M. Effects of nitrogen and phosphorous addition on phenantren biodegradation in four soils // Biodegradation. 1999. No. 10. P. 43–50.
- [20] Оразова М.Х., Бурканова О.А., Полянская Л.М. и др. Влияние фосфора на колонизацию микроорганизмами прикорневой зоны ячменя // Микробиология. 2000. Вып. 69. №3. С. 420–425.
- [21] Красильников Н.А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М.: Изд-во АН СССР, 1958. 463 с.
- [22] ISO 11269 РТ*L 93 – 4851903 0547792 283. Международные стандарты. Качество почв. Определение воздействия загрязнителей на почвенную флору. Ч. 1. 1998.
- [23] Мищенко А.А., Бреус И.П., Бреус В.А. Сорбционные свойства почв в отношении экзогенных углеводородов // Фундаментальные физические исследования в почвоведении и мелиорации: Тр. Всерос. конф. М.: Изд-во МГУ, 2003. С. 83–86.

Поступила в редакцию 18/X/2004;
в окончательном варианте — 18/X/2004.

EFFECT OF SOIL MOISTURE AND UPPER ARTIFICIALLY UNCONTAMINATED SOIL LAYER ON BIODEGRADATION OF TRIDECANE

© 2004 A.V. Kosterin,³ O.A. Sofinskaya⁴

A possibility of tridecane to degrade under conditions of different quantities of soil moisture and inflow of microorganisms maladapted to hydrocarbons into microbial community brought in anabiosis is experimentally studied. In order to make the inflow of maladapted microorganisms two soil layers one above another are prepared: a "clean" layer and a layer contaminated by tridecane. Reliable positive effect of the upper uncontaminated layer and soil moisture on the tridecane biodegradation is observed. Positionally unavailable for tridecane biodegradation concentration is obtained.

Paper received 18/X/2004.

Paper accepted 18/X/2004.

³Kosterin Alexander Vasiljevich (Alexander.Kosterin@ksu.ru), Scientific Research Institute of Mathematics and Mechanics of N.G. Chebotarjov, Kazan State University, Kazan, 420008, Russia.

⁴Sofinskaya Oksana Alexandrovna (ushik2001@mail.ru), Dept. of Modeling of Ecosystems, Kazan State University, Kazan, 420008, Russia.