

УДК 504.5:581.5

DOI: 10.15372/KhUR20160105

Повышение устойчивости растений к нефтезагрязнению почв

С. Х. ЛИФШИЦ, О. Н. ЧАЛАЯ, Ю. С. ГЛАЗНЕЦОВА, И. Н. ЗУЕВА

Институт проблем нефти и газа Сибирского отделения РАН,
ул. Октябрьская, 1, Якутск 677980 (Россия)

E-mail: s.h.lifshits@ipng.ysn.ru

(Поступила 18.05.15; после доработки 20.07.15)

Аннотация

Проведены эксперименты по повышению устойчивости растений к нефтезагрязнению почвы на примере Вики посевной (*Vicia sativa*). Установлено, что положительный эффект по выживаемости растений и увеличению степени деструкции нефтезагрязнения может быть достигнут за счет предварительной обработки семян путем замачивания в растворах гумата калия или салициловой кислоты в разной концентрации. При 5 %-й добавке нефти в почву лучший результат по выживаемости проростков и степени деструкции нефтезагрязнения получен при замачивании семян в растворе салициловой кислоты с концентрацией 10^{-4} моль/л, а при 10 %-й добавке нефти – в растворе с концентрацией 10^{-3} моль/л. Несколько менее эффективна обработка семян раствором гумата. Препарат “Байкал ЭМ-1” оказывает незначительное положительное влияние лишь при 5 %-й добавке нефти в почву. Степень деструкции нефтезагрязнения во всех экспериментах хорошо коррелировала с выживаемостью Вики посевной ($K_{\text{корр}} = 0.9$). Положительный результат от замачивания семян в гумате калия связан, по-видимому, с его адаптивной активностью. Салициловая кислота в низких концентрациях (10^{-3} – 10^{-4} моль/л), по-видимому, способна индуцировать прооксидантные процессы с участием H_2O_2 . Благодаря этому, во-первых, устойчивость организма растений к стресс-факторам среды повышается еще на стадии замачивания семян; во-вторых, секретируемые в ризосферу H_2O_2 и пероксидаза усиливают процессы окислительной нефтедеструкции. Предварительное замачивание семян в растворах салициловой кислоты с разной концентрацией в зависимости от уровня нефтезагрязнения или гумата калия можно рекомендовать для увеличения эффективности работ по рекультивации нефтезагрязненных почв методом фиторемедиации.

Ключевые слова: фиторемедиация, нефтезагрязнение почв, предпосевная обработка семян, салициловая кислота, гумат калия, деструкция нефтезагрязнения

ВВЕДЕНИЕ

Растущий спрос на нефть и нефтепродукты неизбежно приводит к увеличению числа аварий, разливов и утечек. В настоящее время нефть и нефтепродукты стали одними из самых распространенных загрязнителей почв и почвогрунтов. Наиболее экологично восстановление почв способами биоремедиации, когда трансформация загрязнения преимущественно осуществляется за счет микроорганизмов-нефтедеструкторов. Во многих случаях на завершающем этапе биоремедиационных работ в почву высаживают толерантные к нефте-

загрязнению многолетние травянистые растения [1]. Следует отметить, что использование методов фиторемедиации для восстановления техногенно нарушенных земель получило широкое распространение в природоохранной сфере. Согласно данным [2–4], в случае загрязнения почв нефтью именно благодаря растениям процессы биodeградации охватывают более широкий спектр нефтяных углеводородов, в результате чего состав почвенных битумоидов наиболее полно приближается к природному фону. Известно, что корневая система растений способна выделять в почву (ризосферу) различные метаболиты,

окислительные и гидролитические ферменты [5], которые, по-видимому, способствуют окислительной деструкции нефтезагрязнения. В настоящее время перспективны способы фиторемедиации, основанные на использовании растений и ассоциативных с ними микроорганизмов. Растительно-микробные ассоциации и сообщества имеют большие преимущества при выживании в неблагоприятных условиях среды [6, 7]. Эффективность этих технологий серьезно ограничивается токсичностью поллютантов для растений.

В настоящее время для защиты растений от болезней (фитопатогенов) и неблагоприятных условий среды успешно развивается новое направление. Суть его заключается в усилении иммунного статуса растений благодаря воздействию на них различных биологически активных веществ и препаратов биологического и абиогенного происхождения [8–10]. Внешение с поливом таких препаратов, как “Байкал ЭМ-1”, и гуматов позволяет повысить не только урожайность сельскохозяйственных культур, но и активность микроорганизмов-нефтедеструкторов [11, 12]. Предпосевная обработка семян растворами салициловой кислоты в сочетании ее с биопрепаратами и микроудобрениями повышает устойчивость растений к фитопатогенам и неблагоприятным условиям среды [13, 14].

Цель данной работы – изучение возможности повышения устойчивости растений к произрастанию в токсичной среде (на нефтезагрязненной почве).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для проведения эксперимента отобрана типичная для Центральной Якутии супесчаная почва, которая имеет следующие характеристики: $pH_{\text{вод}}$ 8.21, содержание гумуса 6.41 %, содержание обменных оснований, моль/100 г: Са 27.5, Mg 8.2, Na 1.4, K 0.5.

Пробы почвы массой 400 г каждая помещали в вегетационные сосуды и загрязняли нефтью Талаканского месторождения в концентрациях 5 и 10 %. После перемешивания образцы загрязненной почвы высевали предварительно обработанные семена Вики посевой (*Vicia sativa*) в количестве 20 шт. Пред-

варительная обработка семян заключалась в замачивании семян в течение 3 ч в растворах гумата калия, препарата “Байкал ЭМ-1”, салициловой кислоты, а также в обычной водопроводной воде (для сравнения). Растворы гумата и препарата “Байкал ЭМ-1” готовили согласно инструкции. Использовали гумат в концентрации 0.025 %, “Байкал ЭМ-1” с разведением 1 : 2000. Растворы салициловой кислоты применяли в концентрациях 10^{-3} и 10^{-4} моль/л. Всхожесть семян считали на 7-е сут, выживаемость проростков на 60-е сут (окончание эксперимента). Эксперимент проводили в трех повторностях. По окончании эксперимента образцы почв высушивали и анализировали на нефтезагрязнение и процессы его биодegradации. Холодной хлороформенной экстракцией из образцов почв выделяли экстракт (битумоид), по выходу которого определяли уровень остаточного нефтезагрязнения. Интенсивность процессов биодegradации изучали следующими методами: ИК-Фурье-спектроскопия, жидкостно-адсорбционная хроматография и хромато-масс-спектрометрия. Подробно методики аналитических испытаний изложены в работах [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Физиологические характеристики растений приведены в табл. 1. Видно, что с увеличением добавки нефти в почву всхожесть и выживаемость проростков Вики посевой резко падает. Однако предварительная обработка семян в растворах салициловой кислоты, гумата и препарата “Байкал ЭМ-1” позволила улучшить эти характеристики по сравнению с замачиванием в обычной воде. Так, при 5 %-й добавке нефти в почву лучший результат по всхожести и выживаемости растений получен при предварительной обработке семян растворами салициловой кислоты в концентрации 10^{-4} моль/л или гумата: по сравнению с замачиванием семян в воде выживаемость проростков возросла в 1.24 и 1.23 раза соответственно. Несколько меньший эффект отмечается при обработке семян препаратом “Байкал ЭМ-1” (в 1.13 раза). При 10 %-й добавке нефти в почву стимулирующее воздействие предварительной обработки семян

на всхожесть и выживаемость Вики посевной проявилось еще сильнее. В данном случае лучший эффект по выживаемости проростков достигнут при замачивании семян в растворе салициловой кислоты с концентрацией 10^{-3} моль/л или в растворе гумата: в 1.87 и 1.74 раза соответственно по сравнению с замачиванием в обычной воде. Использование препарата “Байкал ЭМ-1” не дало заметных результатов.

Таким образом, несмотря на значительные добавки нефти (5 и 10 %), предварительная обработка семян улучшила выживаемость Вики посевной на нефтезагрязненной почве. Положительный эффект достигнут благодаря замачиванию семян в растворах салициловой кислоты с разной концентрацией или в растворе гумата. При этом максимальный стимулирующий эффект отмечен при более высокой добавке нефти в почву (10 %).

За начальный уровень нефтезагрязнения принято загрязнение образцов почв на 4-е сут после начала эксперимента (на этих образцах почв растения не высевались). Как показало взвешивание образцов почв, за это время успевают испариться основная часть легколетучих компонентов нефти, а процессами биодegradации нефтезагрязнения под влияни-

ем собственной почвенной микрофлоры за столь короткое время можно пренебречь.

В табл. 1 приведены результаты аналитических исследований по выходу битумоидов, экстрагированных из почвенных образцов, на которых произрастала Вика посевная. Рассчитана степень деструкции нефтезагрязнения $K_{\text{дест}}$, равная отношению уменьшения нефтезагрязнения за время эксперимента к исходному загрязнению. Видно, что во всех случаях произрастание растений стимулировало процессы биодegradации нефтезагрязнения. Так, при 5 %-й добавке нефти в почву степень деструкции выросла в 2.4–3.0 раза по сравнению с образцом без высевания растений. Предварительная обработка семян в растворах препарата “Байкал ЭМ-1”, гумата и салициловой кислоты еще более способствовала увеличению степени деструкции нефтезагрязнения – до 1.3 раза по сравнению с замачиванием семян в воде. По влиянию на степень деструкции нефтезагрязнения предпосевную обработку семян можно представить следующим рядом: замачивание семян в растворах препарата “Байкал ЭМ-1” < раствор салициловой кислоты в концентрации 10^{-3} моль/л < раствор гумата < раствор салициловой кислоты в концентрации 10^{-4} моль/л. При

ТАБЛИЦА 1

Результаты экспериментов по повышению устойчивости Вики посевной к нефтезагрязнению почв

Условия эксперимента	Длительность эксперимента, сут	Количество добавленной нефти в почву, %	Всхожесть семян, %	Выживаемость проростков, %	Выход битумоидов, %	$K_{\text{дест}}$, %
Без растений	4	5.0±0.1			3.735±0.001	
« «	60	5.0±0.1			3.452±0.001	7.6±0.1
Вода	60	5.0±0.1	58±3	53±3	3.062±0.001	18.0±0.1
Р-р салициловой к-ты, 10^{-3} моль/л	60	5.0±0.1	66±3	63±3	3.009±0.001	19.4±0.1
То же, 10^{-4} моль/л	60	5.0±0.1	68±3	66±3	2.874±0.001	23.0±0.1
Р-р гумата	60	5.0±0.1	66±3	65±3	2.997±0.001	19.7±0.1
Р-р “Байкал ЭМ-1”	60	5.0±0.1	65±3	60±3	3.047±0.001	18.4±0.1
Без растений	4	10.0±0.1			7.013±0.001	
« «	60	10.0±0.1			6.714±0.001	4.3±0.1
Вода	60	10.0±0.1	25±1	23±1	6.354±0.001	9.4±0.1
Р-р салициловой к-ты, 10^{-3} моль/л	60	10.0±0.1	50±2	43±2	6.157±0.001	12.2±0.1
То же, 10^{-4} моль/л	60	10.0±0.1	40±2	39±2	6.249±0.001	10.9±0.1
Р-р гумата	60	10.0±0.1	56±3	40±2	6.238±0.001	11.1±0.1
Р-р “Байкал ЭМ-1”	60	10.0±0.1	26±1	25±1	6.312±0.001	10.0±0.1

10 %-й добавке нефти в почву степень деструкции выросла в 2.2–2.8 раза в случае произрастания Вики посевной по сравнению с образцом почвы, где растения не высевались, и до 1.3 раза по сравнению с замачиванием семян в воде. При 10 %-й добавке положительный эффект от замачивания семян в различных растворах можно представить следующим образом: растворы препарата “Байкал ЭМ-1” < раствор салициловой кислоты в концентрации 10^{-4} моль/л < раствор гумата < раствор салициловой кислоты в концентрации 10^{-3} моль/л.

По окончании эксперимента определен групповой компонентный состав битумоидов, который, несмотря на процессы биодegradации нефтезагрязнения, все еще сохранял нефтяной характер. На это указывает высокое содержание в составе битумоидов углеводородных фракций (74.3–79.0 %) и довольно низкое – смолистых компонентов (20.3–24.6 %). Для сравнения, битумоид контрольного образца незагрязненной почвы содержит 25.2 % углеводородов и 51.3 % смол. Хромато-масс-спектрометрические исследования также показали, что характер распределения индивидуальных углеводородов в битумоидах загрязненных проб почв все еще близок к нефтяному.

При этом характер ИК-спектров битумоидов уже свидетельствует о протекании процессов окислительной деструкции нефтезагрязнения (рис. 1).

Кривые 3 и 5 на рис. 1 соответствуют спектрам битумоидов загрязненных почв с 5 и 10 %-й добавками нефти (анализ через 4 сут после начала эксперимента); 2 и 4 – битумоидам почв с 5 и 10 %-й добавками нефти по окончании эксперимента (60 сут) с произрастанием растений соответственно; 1 – исходный образец почвы без загрязнения (фон). Видно, что под влиянием роста Вики посевной на кривых 2 и 4 уменьшилось поглощение в области 1600 см^{-1} , характерное для нефтяных ароматических углеводородов, а также увеличилось поглощение в области $1700\text{--}1730\text{ см}^{-1}$, характерное для карбонильных групп карбоновых кислот, сложных эфиров, кетонов. Эти структурные группы характерны для состава битумоидов современных осадков, к которым относится отобранная для эксперимента почва (см. рис. 1, кривая 1).

В табл. 2 приведены относительные коэффициенты поглощения карбонильных групп к поглощению ароматических структур (K_1), а также коэффициенты поглощения карбонильных групп к суммарному поглощению метильных и метиленовых групп (K_2). Повыше-

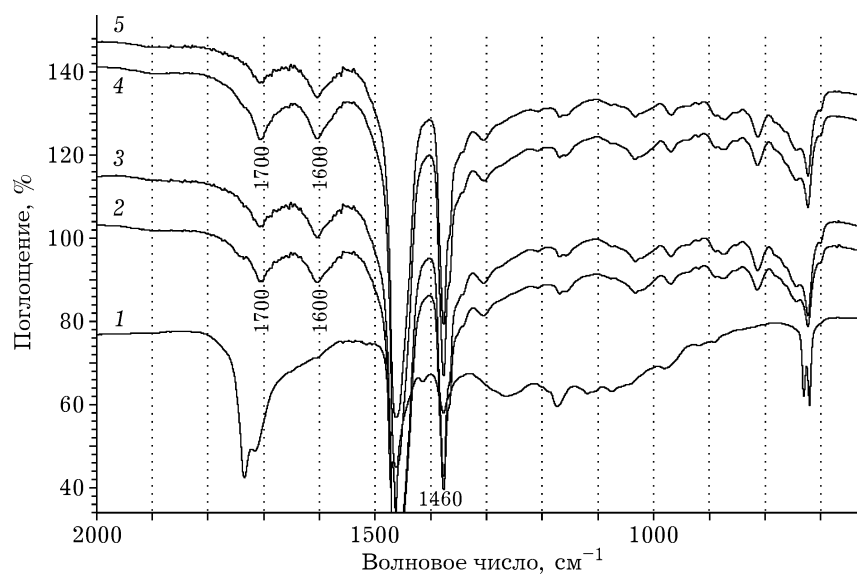


Рис. 1. ИК-спектры битумоидов почвенных образцов А–Е: 1 – исходная почва (образец А); 2, 3 – с 5 %-й добавкой нефти, высеванием Вики посевной, анализом через 60 сут (2) и анализом через 4 сут без высевания растения (3) (образцы В, С соответственно); 4, 5 – с 10 %-й добавкой нефти, высеванием Вики посевной и с анализом через 60 сут (4), без высевания растения и с анализом через 4 сут (5) (образцы Д, Е соответственно).

ТАБЛИЦА 2

Относительные коэффициенты поглощения карбонильных групп в ИК-спектрах почвенных образцов

Образцы	Условия эксперимента			$K_1 = D_{1700}/D_{1600}$	$K_2 = D_{1700}/D_{1460}$
	Продолжительность, сут	Рост растений	Добавка нефти, %		
А (фон)				5.30±0.01	0.72±0.01
В	60	+	5	1.00±0.01	0.08±0.01
С	4	-	5	0.84±0.01	0.05±0.01
Д	60	+	10	1.00±0.01	0.07±0.01
Е	4	-	10	0.73±0.01	0.05±0.01

ние этих коэффициентов для образцов В и Д по сравнению с образцами С и Е, где растения не высеивались, указывает на протекание процессов окислительной деструкции под влиянием роста Вики посевной.

Как видно из данных табл. 1, увеличение степени деструкции нефтезагрязнения хорошо коррелирует с выживаемостью проростков ($K_{\text{корр}} = 0.9$), что также свидетельствует о большой роли растений в биодеградации нефтяных углеводородов. Экскретируемые корневой системой в ризосферу метаболиты и ферменты, по-видимому, ускоряют процессы деструкции нефтезагрязнения.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что максимальную устойчивость Вики посевной к нефтезагрязнению по выживаемости проростков и степени деструкции нефтезагрязнения обеспечивает замачивание семян в растворах салициловой кислоты с концентрацией 10^{-4} моль/л при 5 %-й добавке нефти и 10^{-3} моль/л – при 10 %-й добавке. При обработке семян раствором гумата калия эффект несколько слабее. Наиболее заметное влияние предварительной обработки семян в растворах указанных препаратов проявляется при 10 %-й добавке нефти в почву. Внесение “Байкала ЭМ-1” оказывает небольшой положительный эффект лишь при 5 %-й добавке нефти.

Препарат “Байкал ЭМ-1” и гуматы в основном используются для увеличения сельскохозяйственной продуктивности растений и повышения их устойчивости к неблагоприятным условиям среды. Препарат “Байкал ЭМ-1” является микробиологическим удобрением и содержит большое количество микроорганизмов, включая углеводородокисляющие. По-

видимому, лучший результат от использования этого препарата в условиях нефтезагрязнения может быть достигнут при внесении его с поливом непосредственно в почву. О его положительном влиянии на деструкцию нефтезагрязнения и состоянии микробного сообщества упоминается в работе [12].

Протекторное действие гуминовых веществ объясняют не только образованием с экотоксикантами нетоксичных комплексов, малоподвижных в почве и недоступных для живых организмов, но и адаптогенной активностью, которая заключается в возрастании резистентности живых организмов к стрессовым нагрузкам, в частности к химическому стрессу. Предполагается, что благодаря редокс-медиаторным свойствам гуминовые вещества способны ускорять процессы анаэробного разложения органических загрязняющих веществ [11, 15].

Салициловая кислота в высоких концентрациях токсична для растений. Вместе с тем небольшое ее содержание в жидкой фазе физиологической субстанции растений указывает на проявление иммунных реакций растений. Например, установлено наличие прямой корреляционной связи между концентрацией салициловой кислоты в растении и уровнем его устойчивости к болезням [16]. Механизм действия салициловой кислоты состоит в ингибировании каталазы, что приводит к накоплению H_2O_2 . Увеличение содержания пероксида водорода служит сигналом активации пероксидазы и “генов системной приобретенной устойчивости” [10, 16]. Таким образом, можно предположить, что она оказывает заметное влияние на активацию процессов окислительной деструкции нефтезагрязнения. В случае воздействия сильного стресс-

фактора (в нашем случае – нефтезагрязнения) растения для выживания вынуждены прибегать к различным стратегиям адаптации. Наиболее подготовленными, по-видимому, оказываются те растения, чей адаптивный потенциал активирован еще на стадии обработки семян. Небольшие концентрации салициловой кислоты, способны, вероятно, активировать адаптивные функции организма растений без причинения вреда самому организму. Следовательно, можно предположить, что раствор салициловой кислоты в данном случае выполняет функцию иммуностимулятора растений, повышая их устойчивость к стресс-факторам среды, а экскретируемые корневой системой в ризосферу метаболиты и ферменты оказывают нефтеструктурирующее действие.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты экспериментов по изучению возможности повышения устойчивости растений к нефтезагрязнению почвы на примере Вики посевной (*Vicia sativa*) показали, что положительный эффект может быть достигнут при предварительном замачивании семян в растворах ряда биоактивных веществ. Лучший результат получен в случае замачивания семян в растворах салициловой кислоты разной концентрации или гумата. При 5 %-й добавке нефти оптимальная концентрация раствора салициловой кислоты составляет 10^{-4} моль/л, а при 10 %-й добавке – 10^{-3} моль/л. Замачивание семян в растворе гумата калия не столь эффективно. Препарат “Байкал ЭМ-1” оказывает незначительное положительное влияние лишь при 5 %-й добавке нефти в почву. Во всех экспериментах степень деструкции нефтезагрязнения хорошо коррелировала ($K_{\text{корр}} = 0.9$) с выживаемостью Вики посевной. Положительный результат от замачивания семян в гумате калия связан, по-видимому, с его адаптогенной активностью. Салициловая кислота в малых концентрациях (10^{-3} – 10^{-4} моль/л), по-видимому, способна индуцировать прооксидантные процессы с участием H_2O_2 , в результате которых, во-первых, повышается устойчивость организма растений к стресс-факторам среды еще на стадии замачивания семян, а во-вторых, секретируемые в ризосферу H_2O_2 и пероксидаза

усиливают процессы окислительной деструкции нефтезагрязнения.

Вика посевная относится к толерантным к нефтезагрязнению травянистым растениям и часто используется для фиторекультивации нарушенных земель [1]. На примере Вики посевной для увеличения эффективности мероприятий по очистке территорий от нефтезагрязнений можно рекомендовать посев семян, которые прошли предварительную обработку путем замачивания в растворах салициловой кислоты или гумата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Технологии восстановления почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами: Справочник. М.: РЭФИА, НИА-Природа, 2003. 258 с.
- 2 Кузнецов Ф. М., Иларионов С. А., Середин В. В., Иларионова С. Ю. Рекультивация нефтезагрязненных почв. Пермь: изд. Перм. гос. техн. ун-та, 2000. 105 с.
- 3 Лифшиц С. Х., Кершенгольц Б. М., Чалая О. Н., Зуева И. Н., Шашурин М. М., Глязнецова Ю. С. // Химия уст. разв. 2008. Т. 16, № 5. С. 537–545.
- 4 Лифшиц С. Х., Чалая О. Н., Шашурин М. М., Глязнецова Ю. С., Зуева И. Н., Кершенгольц Б. М. // Химия уст. разв. 2011. Т. 19, № 2. С. 169–178.
- 5 Хомяков Ю. В. Роль корневых выделений растений в формировании биохимических свойств корнеобитаемой среды: дис. ... канд. биол. наук. С.-Петербург, 2009. 144 с.
- 6 Фатина П. Н., Лапаева И. В., Давыдова Е. А. // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. 2008. № 5. С. 75–78.
- 7 Пат. 2013104437 РФ, 2014.
- 8 Рубин Б. А., Арциховская Е. В., Аксенова В. А. Физиология и биохимия иммунитета растений: Учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1975. 306 с.
- 9 Рябчинская Т. А., Харченко Г. Л., Саранцева Н. А., Бобрешова И. Ю., Злотников А. К. // Вестн. защиты растений. 2008. № 2. С. 34–41.
- 10 Метлицкий Л. В., Озерецковская О. Л., Кораблева Н. П., Салькова Е. Г. Биохимия иммунитета, покой и старение растений / Под ред. И. В. Березина. М.: Наука, 1984. 264 с.
- 11 Салем К. М., Перминова И. В., Гречищева Н. Ю., Мурьгина В. П., Мещеряков С. В. // Экология и промышленность России. 2003. № 4. С. 19–21.
- 12 Баландина А. В., Еремченко О. З., Одегова Т. Ф., Кузнецов Д. Б. // Фундаментальные исследования. Биол. науки. 2013. № 10. С. 328–333.
- 13 Ястреб Т. О., Мирошниченко Н. Н., Колупаев Ю. Е., Коц Г. П. // Агробиохимия. 2012. № 4. С. 60–67.
- 14 Пат. 2406286 РФ, 2010.
- 15 Куликова Н. А., Якименко О. С., Степанова А. А. // Биотехнология: состояние и перспективы развития: материалы VIII Московского междунар. конгресса. 17–20 марта 2015. М.: ЗАО “Экспо-биохим-технологии”, 2015. С. 329.
- 16 Тютюрев С. Л. Научные основы индуцированной болезнестойкости растений: монография. СПб.: РАСХН ВНИИЗР, 2002. 328 с.