

УДК 556.31+57:012.4+017.7+052+086.3+577.121+581.144.2

ВПЛИВ РОСЛИН *CAREX HIRTA* НА МІКРОФЛОРУ НАФТОЗАБРУДНЕНИХ ҐРУНТІВ

О. М. Мороз, Н. М. Джура, Г. Я. Безноско, Т. Б. Перетятко, І. Б. Русин,
О. М. Цвілінюк, О. Р. Кулачковський, О. І. Терек, С. П. Гудзь

Вплив рослин Carex hirta на мікрофлору нафтозабруднених ґрунтів. — О. М. Мороз¹, Н. М. Джура¹, Г. Я. Безноско¹, Т. Б. Перетятко¹, І. Б. Русин², О. М. Цвілінюк¹, О. Р. Кулачковський¹, О. І. Терек¹, С. П. Гудзь¹. — Встановлено, що нафта у різних концентраціях (5, 50, 75 г/кг сухого ґрунту) і рослини Carex hirta L. впливають на чисельність різних фізіологічних груп мікроорганізмів ґрунту. У нафтозабрудненому ґрунті чисельність сапрофітів, мікроорганізмів, що використовують органічні форми азоту, нітрифікаторів знижувалася, мікроскопічних грибів і дріжджів, пропіоновокислих бактерій, целюлозоруйнуючих бактерій, мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми азоту, в тому числі актиноміцетів, олігонітрофілів, в тому числі азотфіксаторів і клостридій, майже не змінилася, денітрифікаторів, фотосинтезуючих сіркобактерій та сіркоокиснюючих бактерій зроста, порівняно з пробами ґрунту без нафти. Сульфатвідновлювальних бактерій не виявлено у ґрунті як без нафти, так і з нафтою. В присутності рослин у ґрунті підвищувалася кількість сапрофітів, мікроскопічних грибів і дріжджів, пропіоновокислих, целюлозоруйнуючих бактерій, олігонітрофілів та нітрифікаторів, порівняно з ґрунтом без рослин.

Ключові слова: мікроорганізми, Carex hirta L., нафтове забруднення ґрунту

Адреси: ¹Львівський національний університет імені Івана Франка, біологічний факультет, вул. Грушевського, 4, м. Львів, 79005, Україна; e-mail: Gjurana@ukr.net; ²Національний університет "Львівська політехніка", Інститут хімії та хімічних технологій, вул. С. Бандери, 12, м. Львів, 79013, Україна

Influence of the Carex hirta plants on the microflora of oil polluted soils. — O. M. Moroz¹, N. M. Dzjura¹, G. Y. Beznosko¹, T. B. Peretiatko¹, I. B. Rusyn², O. M. Tsvilynyuk¹, A. R. Kulachkovsky¹, O. I. Terek¹, S. P. Gudz¹. — Oil in different concentrations (5, 50, 75 g/kg of dry soil) and Carex hirta L. plants influenced on quantity of different physiological groups of soil microorganisms was established. In oil polluted soil the amount of saprophytes, utilizing organic forms of nitrogen microorganisms, nitrifying microorganisms decreased, microscopical fungi and yeasts, propionic bacteria, cellulose degrading bacteria, utilizing mineral forms of nitrogen microorganisms, including actinomycetes, oligonitrophyles, including nitrogen fixators and clostridia, not changed, denitrifying microorganisms, photosynthetic sulfur bacteria and sulfur oxidizing bacteria increased when compare with soil probes without oil. In soil with and without oil sulfate reducing bacteria were not revealed. In soil with plants the quantity of saprophytes, microscopical fungi and yeasts, propionic bacteria, cellulose degrading bacteria, oligonitrophyles, nitrifying microorganisms increased when compare with soil without plants.

Key words: microorganisms, Carex hirta L., oil pollution of soil

Address: ¹Ivan Franko National University of Lviv, Faculty of Biology, Hrushevsky Str. 4, Lviv 79005, Ukraine; e-mail: Gjurana@ukr.net; ²National University "Lviv Polytechnica", Institute of Chemistry and Chemical Technologies, Bandera Str. 12, Lviv 79013, Ukraine

Вступ

При забрудненні ґрунту нафтою її дія певним чином поширюється на всю ґрунтову екосистему: мікроорганізми, рослини, тварини. В умовах практично повного пригнічення функціональної активності флори і фауни основна роль в деградації нафтопродуктів у ґрунті належить мікроорганізмам. Мікробіологічне окиснення нафти є природним шляхом руйнування нафтопродуктів і втягнення їх в кругообіг речовин в природі. Нафта – складна суміш алканів (парафінів або ациклічних насичених вуглеводнів), цикланів (нафтенів), аренів (ароматичних вуглеводнів) різної молекулярної маси, а також кисневих (монокарбонічних кислот і оксикислот), сірчанних (сірководню, меркаптанів, сульфідів, дисульфідів, поліциклічних сірчанних сполук різної структури), і азотних (азотистих ос-

нов, гомологів піридину, гідропіридину, гідрокіноліну) сполук та похідних вуглеводнів. В склад нафти входять високомолекулярні смолисті сполуки, що містять кисень і сірку: нейтральні смоли, асфальтени, асфальтогенові кислоти і їх ангідриди [9]. Нафтове забруднення обумовлює флуктуацію середовища, веде до утворення значної кількості анаеробних мікрозон у ґрунті, підвищує валову чисельність, але знижує видову різноманітність майже всіх груп мікроорганізмів за рахунок відбору небагаточисельних видів з підвищеною метаболічною активністю [7, 11]. Чітку тенденцію до збільшення кількості і зростання активності ґрунтових мікроорганізмів можна прослідкувати лише після досить тривалого часу, щонайменше 15-22 місяців [6, 7].

Мікроорганізми, що утилізують вуглеводні нафти, є звичайними співчленами біоценозів ґрунтів, у яких широко розповсюджені бактерії родів *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Flavobacterium* та ін., дріжджі родів *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, *Trichosporon*, *Cryptococcus* [5, 7, 9, 10, 11, 13, 15]. Бактерії, зокрема роди *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, характеризуються широким спектром утилізації вуглеводнів нафти: н-алканів, нафтенів, асфальтенів [5, 10, 13]. Бактерії родів *Mycobacterium* і *Arthrobacter* в основному здійснюють монотермінальне окиснення н-алканів з утворенням первинних спиртів (дією оксигеназ), альдегідів, монокарбонових кислот, що далі підлягають в-окисненню [1, 9, 11].

В ґрунті, забрудненому нафтою, виявляються майже всі групи мікроорганізмів, що беруть участь в окисно-відновній трансформації азоту, хоча співвідношення їх за чисельністю змінюється у порівнянні з ґрунтом без нафти [6, 7]. У нафтозабруднених ґрунтах збільшується кількість азотфіксаторів (*Clostridium*, *Azotobacter*, *Azotomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*), аеробних та анаеробних амоніфікаторів (*Sporosarcina*, *Bacillus*, *Proteus*), а також денітрифікаторів (*Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Thiobacillus*). Азотфіксатори можуть використовувати продукти метаболізму нафтоокиснюючих мікроорганізмів, збільшувати у ґрунті вміст легкодоступних органічних сполук: спиртів, органічних кислот, амінокислот. В результаті унікального в природі мікробіологічного процесу денітрифікації відбувається відновлення нітратів до молекулярного азоту з одночасним окисненням органічних сполук до CO₂ і води. Продукти неповного окиснення парафінів, які утворюються в результаті діяльності мікроорганізмів, здатних окиснювати вуглеводні нафти, служать органічним субстратом для розвитку денітрифікаторів. У нафтозабрудненому ґрунті знижується чисельність нітрифікаторів (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira*, *Nitrobacter*, *Nitrospira*, *Nitrococcus*), що є чутливими до низької концентрації кисню і великої кількості легкозасвоюваних органічних сполук, які інгібують їх розвиток. В забруднених нафтою ґрунтах відбувається майже повна репресія активності целюлозоруйнуючих мікроорганізмів через низький вміст нітратного азоту, свіжих рослинних решток, а також несприятливий кисневий режим [7]. Присутність нафти у ґрунті сприяє розвитку аеробних і анаеробних сіркометаболізуючих бактерій [9, 12].

Раніше запропоновано використання довгокореневих видів рослин у фіторекультивациі територій, забруднених нафтою і нафтопродуктами, у зв'язку з їх можливою участю у біодеградації компонентів нафти [4, 7]. Так, кореневища та корені осоки шершавої (*Carex hirta* L.), стійкої до

нафтозабруднень, покращують структуру ґрунту, його фізико-хімічні, водно-повітряні і сорбційні властивості, збагачують ґрунт деякими мінеральними речовинами [4]. Вивчення особливостей формування та функціонування мікробіоценозу нафтозабрудненого ґрунту важливе для розробки нових комплексних біотехнологічних методів очистки довкілля на основі застосування як рослинних, так і мікробних об'єктів. Метою даної роботи було вивчити вплив рослин *C. hirta* на зміну співвідношення чисельності комплексу основних фізіологічних груп мікроорганізмів, що беруть участь у деградації нафти у ґрунті, для подальшого наукового обґрунтування комплексу рекультивацийних заходів у складних екологічних ситуаціях.

Матеріал та методики

Чисельність основних груп мікроорганізмів визначали у зразках ґрунту, забрудненого нафтою (5, 50 і 75 г нафти у кг сухого ґрунту), і без нафти, у якому вирощували вегетативні особини *C. hirta*. Зразки ґрунту без рослин з вищенаведеними концентраціями нафти і без нафти, а також з рослинами без нафти були контрольними. Густина нафти - 0,85 г/мл. Період деградації нафти у ґрунті тривав 92 доби, з них 69 діб – рекультивацийний період за участю рослин. Забір середньої проби ґрунту, підготовку зразка, виготовлення ґрунтової суспензії, висів на відповідні середовища, підрахунок колоній і виготовлення фіксованих, забарвлених фуксином, препаратів проводили як описано [2, 8, 14]. Перегляд зразків проводили за допомогою світлового мікроскопа *Ergaval* при збільшенні у 1440 разів. Фотографування бактерій здійснювали з використанням *High performance color CCD camera "VISION"* і комп'ютерної програми *WinFast*. Вміст абсолютно сухого ґрунту визначали у 1 г аналізованого сирого ґрунту сушкою бюксів з наважками при 105°C до постійної маси [14]. Сапрофіти, у тому числі мікроорганізми, що використовують органічні форми азоту (амоніфікатори) виявляли на м'ясо-пептонному агарі (МПА); мікроскопічні гриби і дріжджі – на сусло-агарі (СА); мікроорганізми, в тому числі актиноміцети, здатні використовувати мінеральні форми азоту, виявляли на крохмало-аміачному агарі (КАА), а також на середовищі Чапека; азотфіксатори і олігонітрофільні мікроорганізми виявляли на середовищі Ешбі (для *Azotobacter*); нітрифікатори – на середовищі Гільтая і Баалсруда (для *Thiobacillus denitrificans*); пропіоново-кислі бактерії – на глюкозо-пептонному середовищі; целюлозоруйнуючі аеробні бактерії – на середовищі Гетченсона [14]; сульфатвідновлювальні бактерії – на середовищі Кравцова-Сорокіна; тіонові (сіркоокиснюючі) бактерії на середовищах Бейеринка (для *Thiobacillus thioparus*) і Баалсруда [8]; аноксигенні фотосинтезуючі сіркобактерії – на середовищі Ван Ніля [2].

Таблиця 1. Вплив нафтового забруднення та *C. hirta* на чисельність гетеротрофної мікрофлори у пробах досліджуваного ґрунту

Table 1. Oil pollution and *C. hirta* influence on heterotrophic microflora quantity in investigated soil probes

Проба	Сапрофіти, КУО/г сухого ґрунту	Мікроскопічні гриби і дріжджі, КУО/г сухого ґрунту	Пропіоново-кислі бактерії, КУО/г сухого ґрунту	Целюлозоруй-нуючі бактерії, % обростання
Ґрунт без рослин без нафти	$(5,84 \pm 0,72) \times 10^5$	$(2,96 \pm 0,56) \times 10^3$	$(1,28 \pm 0,04) \times 10^4$	29±2
Ґрунт з рослинами без нафти	$(7,61 \pm 0,95) \times 10^5$	$(1,24 \pm 0,13) \times 10^4$	$(6,27 \pm 0,97) \times 10^4$	34±2
Ґрунт без рослин з нафтою (5 г/кг сухого ґрунту)	$(9,40 \pm 0,30) \times 10^4*$	$(1,78 \pm 0,01) \times 10^3$	$(3,62 \pm 0,05) \times 10^3*$	20±2
Ґрунт з рослинами з нафтою (5 г/кг сухого ґрунту)	$(1,33 \pm 0,23) \times 10^5*$	$(1,44 \pm 0,06) \times 10^4$	$(1,16 \pm 0,14) \times 10^5$	22±2
Ґрунт без рослин з нафтою (50 г/кг сухого ґрунту)	$(1,18 \pm 0,51) \times 10^5*$	$(5,95 \pm 0,56) \times 10^3$	$(8,50 \pm 0,10) \times 10^3$	17±1
Ґрунт з рослинами з нафтою (50 г/кг сухого ґрунту)	$(2,48 \pm 0,16) \times 10^5*$	$(7,23 \pm 0,96) \times 10^4*$	$(1,37 \pm 0,29) \times 10^4*$	19±2
Ґрунт без рослин з нафтою (75 г/кг сухого ґрунту)	$(1,72 \pm 0,60) \times 10^5*$	$(5,30 \pm 0,19) \times 10^3$	$(1,46 \pm 0,29) \times 10^4$	15±1
Ґрунт з рослинами з нафтою (75 г/кг сухого ґрунту)	$(6,82 \pm 0,48) \times 10^5$	$(9,58 \pm 0,54) \times 10^3$	$(2,50 \pm 0,08) \times 10^4*$	18±2

Примітка. * - $p \leq 0,05$

Таблиця 2. Вплив нафтового забруднення та *C. hirta* на чисельність мікроорганізмів кругообігу азоту у пробах досліджуваного ґрунту

Table 2. Oil pollution and *C. hirta* influence on nitrogen cycle microorganisms quantity in investigated soil probes

Проба	Мікроорганізми, що використовують органічні форми азоту, в тому числі амоніфікатори, КУО/г сухого ґрунту	Мікроорганізми, що використовують мінеральні форми азоту, в тому числі актиноміцети, КУО/г сухого ґрунту	Олігонітрофіли, в тому числі азотфіксатори (<i>Azotobacter</i>) і клостридій, КУО/г сухого ґрунту	Нітрифікатори, клітин/г сухого ґрунту	Денітрифікатори, в тому числі <i>T. denitrificans</i> , КУО/г сухого ґрунту
Ґрунт без рослин без нафти	$(5,48 \pm 0,51) \times 10^5$	$(1,08 \pm 0,22) \times 10^5$	$(5,44 \pm 0,38) \times 10^5$	$(1,16 \pm 0,05) \times 10^6$	$(9,51 \pm 0,47) \times 10^4$
Ґрунт з рослинами без нафти	$(6,70 \pm 0,55) \times 10^5$	$(9,35 \pm 0,57) \times 10^5$	$(6,57 \pm 0,37) \times 10^5$	$(1,27 \pm 0,09) \times 10^6$	$(1,13 \pm 0,30) \times 10^5$
Ґрунт без рослин з нафтою (5 г/кг сухого ґрунту)	$(3,73 \pm 0,56) \times 10^4*$	$(2,25 \pm 0,24) \times 10^5$	$(6,46 \pm 0,34) \times 10^5$	$(2,78 \pm 0,19) \times 10^4*$	$(2,24 \pm 0,52) \times 10^5$
Ґрунт з рослинами з нафтою (5 г/кг сухого ґрунту)	$(5,44 \pm 0,16) \times 10^4*$	$(3,55 \pm 0,43) \times 10^5*$	$(9,80 \pm 0,60) \times 10^5$	$(8,31 \pm 0,46) \times 10^4*$	$(5,85 \pm 0,34) \times 10^5*$
Ґрунт без рослин з нафтою (50 г/кг сухого ґрунту)	$(5,13 \pm 0,12) \times 10^4*$	$(1,08 \pm 0,49) \times 10^5$	$(2,33 \pm 0,20) \times 10^5$	$(6,80 \pm 0,15) \times 10^2*$	$(6,83 \pm 0,12) \times 10^5*$
Ґрунт з рослинами з нафтою (50 г/кг сухого ґрунту)	$(1,12 \pm 0,28) \times 10^5*$	$(3,14 \pm 0,25) \times 10^5*$	$(8,44 \pm 0,23) \times 10^5$	$(1,57 \pm 0,04) \times 10^3*$	$(3,85 \pm 0,19) \times 10^5*$
Ґрунт без рослин з нафтою (75 г/кг сухого ґрунту)	$(7,57 \pm 0,36) \times 10^4*$	$(8,42 \pm 0,41) \times 10^5*$	$(2,99 \pm 0,37) \times 10^5$	$(2,91 \pm 0,45) \times 10^2*$	$(7,11 \pm 0,68) \times 10^5*$
Ґрунт з рослинами з нафтою (75 г/кг сухого ґрунту)	$(6,02 \pm 0,78) \times 10^4*$	$(5,32 \pm 0,45) \times 10^5$	$(6,66 \pm 0,45) \times 10^5$	$(7,23 \pm 0,64) \times 10^2*$	$(6,72 \pm 0,66) \times 10^5*$

Примітка. * - $p \leq 0,05$

Таблиця 3. Вплив нафтового забруднення та *C. hirta* на чисельність мікроорганізмів кругообігу сірки у пробах досліджуваного ґрунту

Table 3. Oil pollution and *C. hirta* influence on sulfur cycle microorganisms quantity in investigated soil probes

Проба	Сульфатвідновлювальні бактерії, КУО/г сухого ґрунту	Аноксигенні фотосинтезуючі сіркобактерії, КУО/г сухого ґрунту	Сірководокиснючі бактерії, КУО/г сухого ґрунту
Ґрунт без рослин без нафти	0,00	$(1,15 \pm 0,09) \times 10^4$	$(9,68 \pm 0,53) \times 10^4$
Ґрунт з рослинами без нафти	0,00	$(6,55 \pm 0,52) \times 10^3$	$(2,32 \pm 0,31) \times 10^5$
Ґрунт без рослин з нафтою (5 г/кг сухого ґрунту)	0,00	$(1,25 \pm 0,08) \times 10^5$ *	$(2,35 \pm 0,17) \times 10^5$ *
Ґрунт з рослинами з нафтою (5 г/кг сухого ґрунту)	0,00	$(1,07 \pm 0,05) \times 10^4$	$(2,92 \pm 0,33) \times 10^5$
Ґрунт без рослин з нафтою (50 г/кг сухого ґрунту)	0,00	$(7,03 \pm 0,58) \times 10^4$ *	$(1,03 \pm 0,59) \times 10^6$ *
Ґрунт з рослинами з нафтою (50 г/кг сухого ґрунту)	0,00	$(3,74 \pm 0,21) \times 10^4$ *	$(4,67 \pm 1,00) \times 10^5$
Ґрунт без рослин з нафтою (75 г/кг сухого ґрунту)	0,00	$(1,75 \pm 0,11) \times 10^4$	$(1,08 \pm 0,98) \times 10^6$ *
Ґрунт з рослинами з нафтою (75 г/кг сухого ґрунту)	0,00	$(7,47 \pm 0,64) \times 10^4$ *	$(7,86 \pm 0,54) \times 10^5$ *

Примітка. * - $p \leq 0,05$

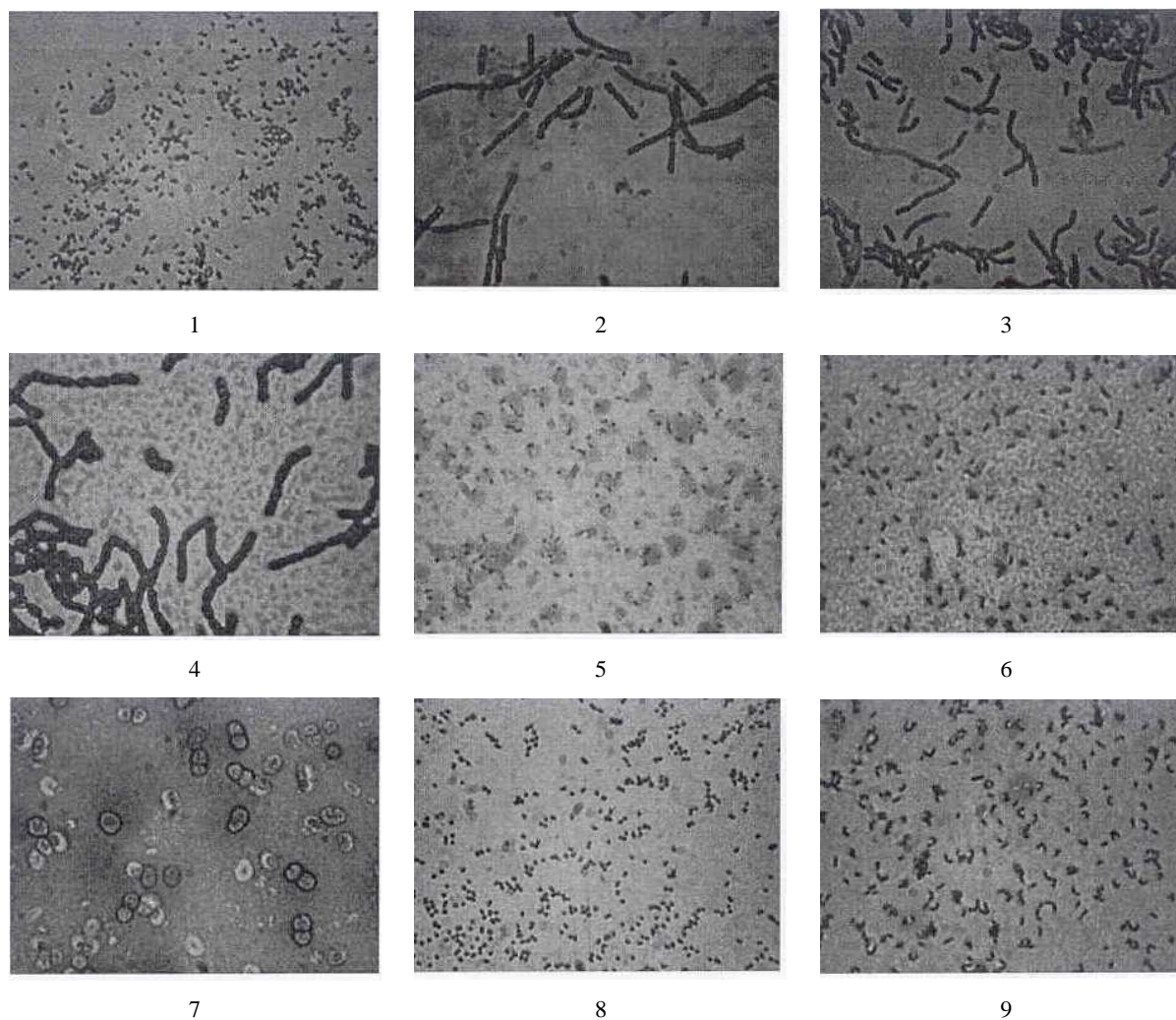


Рис. 1. Морфологія клітин бактерій, вирощених на середовищах МПА (1, 2, 3), СА (4), КАА (5), Чапека (6), Ешбі (7), Гільтая (8, 9) (x 1440).

Fig. 1. Morphology of bacteria cells, grown on meat-peptonic-agar (1, 2, 3), wort-agar (4), starch-ammoniac-agar (5), Chapeck (6), Ashbey (7), Hiltay (8, 9) media (x 1440).

Підрахунок клітин мікроорганізмів (КУО-колонієутворюючих одиниць) у 1 г сухого ґрунту на твердих середовищах на поверхні і у товщі агару здійснювали безпосередньо на чашках, враховуючи розведення і відносну вологість ґрунту. Кількість клітин нітрифікаторів визначали за ростом у рідкому середовищі Виноградського методом граничних розведень, враховуючи розведення, відносну вологість ґрунту, за таблицею Мак-Креді. Кількість целюлозоруйнуючих мікроорганізмів визначали методом обростання часточок ґрунту [14].

Отримані результати опрацьовували статистично [3].

Результати досліджень та їх обговорення

Вивчено зміну чисельності різних фізіологічних груп ґрунтових мікроорганізмів в присутності нафти під час розвитку *C. hirta* на протязі 92 діб (тобто приблизно 3-х місяців). Чисельність мікроорганізмів, які беруть участь у сладних біохімічних процесах в ґрунті (гетеротрофної мікрофлори), в тому числі окиснюючих вуглеводні нафти, у нафтозабрудненому ґрунті за такий короткий строк в основному не змінилася з незначною тенденцією до зниження як в присутності осоки шершавої, так і у відсутності (табл. 1), крім сапрофітів, чисельність яких знизилася. Зменшення кількості представників цієї фізіологічної групи, а також у меншій мірі пропіоновокислих бактерій, очевидно, є адаптивною відповіддю мікробного угруповання на токсикогенний вплив нафти пригніченням життєздатності чутливих до нафтопродуктів видів, тобто нездатних до їх утилізації, і виживанням видів, метаболічно активних у даних стресових умовах, що дозволяє зробити припущення про звуження видової різноманітності мікробіоценозу ґрунту. У нафтозабрудненому ґрунті дещо зменшилася чисельність целюлозоруйнуючих бактерій, можливо, у зв'язку з низьким вмістом нітратного азоту, несприятливими умовами аерації та зволоження і низьким вмістом свіжих рослинних решток. У ґрунті з рослинами підвищувалася кількість сапрофітів, мікроскопічних грибів, дріжджів, пропіоновокислих та целюлозоруйнуючих бактерій, порівняно з ґрунтом без рослин. Це може пояснюватися покращенням кореневищами рослин структури та водно-повітряних характеристик ґрунту.

В ґрунті, забрудненому нафтою, виявлено майже всі групи мікроорганізмів, що беруть участь в окисно-відновній трансформації азоту (табл. 2). Чисельність мікроорганізмів, що використовують органічні форми азоту, в тому числі амоніфікаторів, у нафтозабрудненому ґрунті знизилася. Кількість мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми азоту, в тому числі актиноміцетів, олігонітрофілів, в тому числі азотфіксаторів і кластридій, суттєво не змінилася, порівняно з ґрунтом без нафти, як у присутності рослин, так і у відсутності. Фіксація азоту такими представниками олі-

гонітрофілів як роди *Azotobacter* або *Clostridium* – строго анаеробний процес [1, 6], стабільний рівень азотфіксації можна пояснити низьким парціальним тиском кисню, а також наявністю в ґрунті, можливо, під впливом кореневищ *C. hirta* легкодоступних органічних сполук – спиртів, органічних кислот, амінокислот, продуктів життєдіяльності нафтоокиснюючих бактерій. Цікаво відзначити зростання чисельності (у 2,2-3,6 рази) олігонітрофілів у пробах ґрунту з *C. hirta* з нафтою у високих концентраціях: 50 і 75 г/кг, порівняно з пробами ґрунту без рослин з нафтою в тих самих концентраціях. Чисельність нітрифікаторів у забрудненому нафтою ґрунті різко знижувалася і виявилася на 2-4 порядки нижчою, ніж у ґрунті без нафти як без, так і з рослинами осоки шершавої. Цікаво, що кількість нітрифікуючих мікроорганізмів у ґрунті з рослинами і нафтою виявилася вищою у 2,3-3,0 рази, порівняно з нафтозабрудненим ґрунтом без рослин. Зниження чисельності нітрифікаторів можна пояснити не лише низькою концентрацією розчиненого кисню в нафтозабрудненому ґрунті (яка, можливо, дещо підвищується в присутності кореневищ рослин), але і чутливістю бактерій до наявності в середовищі легкозасвоюваних органічних речовин (н-парафінів і продуктів їх розщеплення), які у великій кількості пригнічують їх розвиток. Мінімальні потреби мікроорганізмів в нітратній формі азоту можуть забезпечувати деякі гетеротрофні мікроорганізми (бактерії родів *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, гриби роду *Fusarium*), здатні до нітрифікації [6, 7]. Зниження кількості нітрифікуючих мікроорганізмів в нафтозабрудненому ґрунті сприяє вкороченню циклу кругообігу азоту. Аміак, що утворюється в процесі амоніфікації, обминаючи стадію нітрифікації, надходить безпосередньо в ґрунтовий поглинаючий комплекс і використовується мікроорганізмами в якості основного джерела азотного живлення. Чисельність денітрифікаторів, в тому числі *Th. denitrificans*, у ґрунті з нафтою зроста порівняно з ґрунтом без нафти, як у присутності осоки шершавої, так і у відсутності.

У зв'язку з наявністю в складі нафти ряду сполук сірки різної структури вивчали чисельність мікроорганізмів кругообігу сірки у пробах ґрунту без і з рослинами *C. hirta* (табл. 3). Несподіваною виявилася відсутність у досліджуваних пробах з нафтою сульфатвідновлювальних бактерій, не дивлячись на переважну наявність у складі будь-якої нафти сульфатів [12]. Можливо, це пов'язано з повною відсутністю представників даної фізіологічної групи у контрольному ґрунті, у самій нафті, а також коротким часом (близько 3-х місяців) деградації нафти у ґрунті. Формування стійкої мікробної спільноти, яка залежить від фізико-хімічних умов у ґрунті, включаючи наявність води і розчиненого кисню, відбувається приблизно на протязі року після контакту ґрунту з нафтою [12]. Чисельність анаеробних аноксигенних фотосинтезуючих

сіркобактерій та аеробних сіркоокиснюючих (тіонових) бактерій у пробах ґрунту з нафтою зростає незалежно від концентрації нафти чи наявності рослин. Життєдіяльність цих бактерій у досліджуваних пробах з нафтою, очевидно, більше залежить від наявності у ґрунті легкозасвоюваних органічних сполук та відновлених сполук сірки, ніж від повітряно-кисневого режиму.

Вивчали морфологію клітин бактерій, які виростили на різних середовищах (рис. 1), що є початковим етапом дослідження видового складу мікробного угруповання, яке починає формуватися в ґрунті в умовах нафтового забруднення.

Таким чином, зміна чисельності різних фізіологічних груп мікроорганізмів у ґрунті, забрудненому нафтою, порівняно з ґрунтом без нафти як в присутності осоки шершавої, так і у відсутності, є адаптивною відповіддю мікробного угруповання на несприятливий фактор довкілля. Кореневища *C. hirta* покращують структуру та властивості ґрунту, завдяки чому здійснюються взаємовигідні біотичні зв'язки між мікрофлорою і рослинами, що відображається на зростанні чисельності окремих груп мікроорганізмів.

Висновки

1. У ґрунті, забрудненому нафтою у концентраціях від 5 до 75 г/кг сухого ґрунту напротязі 92 діб, знижувалася чисельність сапрофітів, мікроорганізмів, що використовують органічні форми азоту і нітрифікаторів.
2. Чисельність мікроскопічних грибів і дріжджів, пропіоновокислих бактерій, целюлозоруйнуючих бактерій, мікроорганізмів, що використовують мінеральні форми азоту, в тому числі актиноміцетів, олігонітрофілів, в тому числі азотфіксаторів і кластридій майже не змінилася.
3. Чисельність денітрифікаторів, фотосинтезуючих сіркобактерій та сіркоокиснюючих бактерій зростає, порівняно з пробами ґрунту без нафти. Сульфатвідновлювальних бактерій не виявлено у ґрунті як без нафти, так і з нафтою.
4. Виявлено позитивний вплив кореневищ *C. hirta* на чисельність окремих груп мікроорганізмів як при низькому (5 г/кг), так і при високому (50 і 75 г/кг) рівнях нафтозабруднення: у ґрунті з рослинами підвищувалася кількість сапрофітів, мікроскопічних грибів і дріжджів, пропіоновокислих, целюлозоруйнуючих бактерій, олігонітрофілів та нітрифікаторів, порівняно з ґрунтом без рослин.

1. Готтшалк Г. Метаболизм бактерий. Под ред. Е.Н. Кондратьевой. – М.: Мир, 1982. – 310 с.
2. Гудзь С., Гнатюш С., Білінська І. Практикум з мікробіології. Ч. 1. Навчальний посібник. – Львів: Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2003. – 80 с.
3. Деркач М. П., Гумецький Р. Я., Чабан М. Є. Курс варіаційної статистики. – К.: Вища школа, 1977. – 208 с.
4. Джура Н., Цвілінюк О., Терек О. Вплив нафтового забруднення ґрунту на морфо-фізіологічні особливості рослин // Вісник Львівського ун-ту. Серія біологічна. – 2005. – Вип. 40. – С. 51–58.
5. Думанська Т. У. Деструкція моно- і поліциклічних ароматичних вуглеводнів культурами *Pseudomonas fluorescens* 1-D біовар II та *Basillus subtilis* 2-D // Мікробіол. журн. – 1995. – Т. 57, №1. – С. 95–101.
6. Исмаилов Н. М. Влияние нефтяного загрязнения на круговорот азота в почве // Микробиология. – 1983. – Т. 52, Вып. 6. – С. 1003 – 1007.
7. Исмаилов Н. М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязнённых почв. // Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем. Серия: Современные проблемы биосферы. Сб. научн. трудов. – М.: Наука, 1988. – 254 с.
8. Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голомзик А. И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. – М.: Наука, 1972. – С. 190 – 221.
9. Квасников Е. И., Ключникова Т. М. Микроорганизмы – деструкторы нефти в водных бассейнах. – Киев: Наукова думка, 1981. – 132 с.
10. Копытов Ю. П., Дивавин И. А. Рост нефтеокисляющих микроорганизмов рода *Mycobacterium* на многокомпонентных субстратах // Микробиол. журн. – 1986. – Т. 48, №2. – С. 21–26.
11. Коронелли Т. В., Голубет В. Е., Ушакова Н. А., Розынов Б. В. Водные нефтеокисляющие артробактерии // Микробиология. – 1978. – Т. 47, Вып. 3. – С. 501.
12. Назина Т. Н., Розанова Е. П., Беляев С. С., Иванов М. В. Химические и микробиологические методы исследования пластовых жидкостей и кернов нефтяных месторождений. – Пушино: Научный центр биологических исследований АН СССР. Институт микробиологии, 1988. – С. 1–25.
13. Стабникова Е. В., Селезнёва М. В., Рева О. Н., Иванов В. Н. Выбор активного микроорганизма-деструктора углеводов для очистки нефтезагрязнённых почв // Прикл. биохим. и микр. – 1995. – Т. 31, №5. – С. 534–539.
14. Теплер Е. З., Шильникова В. К., Переверзева Г. И. Практикум по микробиологии. 3-е изд. – М.: Агропромиздат, 1987. – 239 с.
15. Ivanov V. N., Kachur T. L., Dulgerov A. N., Saljuk A. I. Degradation of the oil hydrocarbons by thermophilic denitrifying bacteria // Mikrobiol. Zhurn. – 1995. – V. 57, N2. – P. 85–93.

Отримано: 15 грудня 2005 р.

Прийнято до друку: 19 січня 2006 р.