

DOI: 10.15593/2224-9400/2018.1.01

УДК 579.64

О.В. Вельможина, О.И. Бахирева, М.М. СоколоваПермский национальный исследовательский
политехнический университет, Пермь, Россия**ПРИМЕНЕНИЕ ФИТОТЕСТИРОВАНИЯ ДЛЯ ОЦЕНКИ
ВОЗМОЖНОСТИ БИОРЕМЕДАЦИИ ПОЧВЫ,
ЗАГРЯЗНЕННОЙ ИОНАМИ СВИНЦА И РТУТИ**

Одним из сильнейших по действию и наиболее распространенным химическим загрязнением окружающей среды является загрязнение тяжелыми металлами. Данная работа посвящена проблеме очистки почвы от наиболее токсичных ионов тяжелых металлов – ионов свинца и ртути. Главной задачей исследований являлось определение возможности проведения биоремедиации загрязненной почвы с помощью культур микроорганизмов.

*С этой целью были выделены и всесторонне изучены две культуры аэробных микроорганизмов, обозначенные как КI и КII. Исследованы особенности жизнедеятельности культур микроорганизмов в присутствии ионов свинца и ртути. Выяснено, что ионы свинца и ртути не оказывают негативного воздействия на рост и жизнедеятельность микроорганизмов. С помощью диско-диффузионного метода были определены границы устойчивости культур микроорганизмов к высоким концентрациям указанных ионов. Культуры микроорганизмов были в дальнейшем использованы для биоремедиации загрязненной почвы. Для оценки эффективности биоремедиации почвы был применен метод фитотестирования, согласно которому критерием вредного действия загрязнителя считается ингибирование роста корней семян. В данной работе в качестве тест-объекта были выбраны семена овса (*Avena sativa*). Согласно выбранной методике оценку степени опасности проводили по экспериментально установленной величине фитотоксического эффекта (эффекта торможения) E_T .*

В результате проведенных исследований было выяснено, что токсическое действие ионов ртути более выражено по сравнению с действием ионов свинца, что проявлялось в снижении всхожести семян и показателей их роста. Возможность биоремедиации почвы доказана тем, что почвенные растворы, содержащие ионы свинца и ртути, в присутствии культур микроорганизмов становятся гораздо менее токсичными. Это выражается снижением эффекта торможения до нормальных значений.

Ключевые слова: ионы свинца, ионы ртути, культуры микроорганизмов, биоремедиация почвы, фитотестирование, фитотоксический эффект.

O.V. Velmozhina, O.I. Bakhireva, M.M. Sokolova

Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

**APPLICATION OF PHYTOTESTING FOR ASSESSMENT
OF THE POSSIBILITY OF BIOREMEDIATION OF THE SOIL
POLLUTED BY IONS OF LEAD AND MERCURY**

One of the strongest on action and the most widespread chemical pollution of environmental is pollution by heavy metals. This work is devoted to problem of weeding from the most toxiferous ions of heavy metals – ions of lead and mercury. The main task of researches was definition of a possibility of carrying out bioremediation of the polluted soil by means of the cultures of microorganisms.

*Two cultures of aerobic microorganisms designated as KI and KII were for this purpose allocated and comprehensively studied. Features of activity of cultures of microorganisms in presence of ions of lead and mercury are investigated. It is found out that ions of lead and mercury do not make negative impact on body height and activity of microorganisms. Stability boundaries of cultures of microorganisms to high concentrations of the specified ions were defined by disco – diffusion method. The cultures of microorganisms were used further for bioremediation of the polluted soil. The method of phytotesting according to which the inhibition of body height of roots of seeds is considered criterion of harmful effect of pollutant was applied to assessment of effectiveness of bioremediation of the soil. In this work as a test-object seeds of oats (*Avena sativa*) were chosen. According to the chosen method the assessment of degree of danger was examined by experimentally established size of phytotoxic effect (effect of braking) of E_T .*

As a result of the conducted researches it was found out that toxic action of ions of mercury is more expressed in comparison with action of ions of lead that was shown in decrease in viability of seeds and indexes of their body height. The possibility of bioremediation of the soil is proved by the fact that the soil solutions containing ions of lead and mercury in the presence of the cultures of microorganisms, become much less toxiferous. It is expressed by decrease in effect of braking to normal values.

Keywords: *ions of lead, ions of mercury, culture of microorganisms, bioremediation of the soil, phytotesting, phytoeffect.*

В почвенном покрове Соликамска, Кизела, Горнозаводска, Чусового, Губахи, Кудымкара, Нытвы, Очера и других городов Пермского края выявлена высокая локальная концентрация тяжелых металлов, в том числе свинца и ртути [1–3].

Соединения свинца и ртути, как известно, обладают сильной токсичностью по отношению ко всем живым организмам. Так как эти металлы чаще всего встречаются в виде солей и комплексных соединений, первой от их воздействия страдает почва, из которой они могут попасть в системы вод и отравлять окружающий мир. Тяжелые металлы, накапливаясь в почве, особенно в верхних, гумусовых, слоях, мед-

ленно удаляются при выщелачивании, потреблении растениями, эрозии и выдувании [4–6].

Биоремедиация загрязненных почв и грунтов представляет собой набор техник, основанных на применении биологических агентов для очистки почв и грунтов от поллютантов. Чаще всего для биоремедиации почв используются микроорганизмы, обычно бактерии и грибы, реже – растения [7–9].

Целью данной работы являлось применение метода фитотестирования для оценки возможности использования культур микроорганизмов для биоремедиации почвы, загрязненной ионами свинца и ртути.

Из почвы были выделены микроорганизмы, которые культивировались по общепринятым методикам [10, 11] на жидкой питательной среде РУГ (пептон – дрожжевой экстракт – глюкоза). В результате были получены две культуры микроорганизмов, обозначенные далее как «культура I (КI)» и «культура II (КII)». При микроскопировании выяснили, что обе культуры оказались кокковидными бактериями (диплококками), причем КI – грамположительная, КII – грамотрицательная [12, 13]. Характеристики культур микроорганизмов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Признаки колоний специфических микроорганизмов

Признак	Культура I	Культура II
Форма	Округлая	Округлая
Размеры	2–3 мм	6–10 мм
Поверхность	Гладкая	Гладкая
Блеск	Присутствует	Присутствует
Цвет	Бежевая	Белая
Профиль	Выпуклый	Выпуклый
Край	Фестончатый	Волнистый
Структура	Однородная	Однородная
Консистенция	Пастообразная	Пастообразная

Влияние ионов свинца и ртути на рост микроорганизмов изучали путем получения кривых роста культур в присутствии ионов Pb^{2+} в концентрации 50 мг/дм^3 и ионов Hg^{2+} в концентрации 50 мг/дм^3 . Было выяснено, что обе культуры хорошо развиваются, отмечалось лишь незначительное замедление на начальной стадии роста. Так, лаг-фаза КI составляла менее 2 ч, в присутствии ионов свинца составляла 3 ч, в присутствии ртути – более 6 ч. Экспоненциальная фаза роста чистой культуры КI, а также в присутствии свинца достигала своего пика за

72 ч, далее еще сутки длилась стационарная фаза роста. В присутствии ионов ртути экспоненциальная фаза была замедлена и достигала своего пика (аналогичного показателям пика роста чистой культуры) лишь на пятые сутки. Подобный сдвиг пика экспоненциальной фазы роста вызван более длительной лаг-фазой, темп роста культур оставался одинаковым, количество биомассы в разных средах на пике роста также было одинаково. Лаг-фаза КII составляла 3 ч, в присутствии ионов свинца оставалась практически неизменной, в присутствии ионов ртути длилась более 8 ч. Однако в отличие от КI экспоненциальная фаза роста чистой КII и в присутствии свинца достигала пика за 72 ч, а в присутствии ионов ртути – за 96 ч, несмотря на более длительную лаг-фазу. Было показано, что КII быстрее достигает пика концентрации биомассы по сравнению с КI. В дальнейших экспериментах культуры выдерживали 4 сут: при этом значении чистые культуры КI и КII (также в присутствии свинца) находились в переходном состоянии между экспоненциальной и стационарной фазой роста и сохраняли свою активность, а в присутствии ионов ртути к этому времени как раз достигали своего пика роста.

Для определения пределов концентраций ионов металлов, при которых микроорганизмы способны выживать, измеряли зону подавления роста культур диско-диффузионным методом. Концентрации ионов металлов варьировали от 10 до 1000 мг/дм³. Было выяснено, что зона подавления роста культур появляется при концентрациях ионов Pb²⁺ и Hg²⁺ более 500 и 100 мг/дм³ соответственно. Результаты экспериментов приведены в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Чувствительность культур микроорганизмов к ионам свинца

Концентрации нитрата свинца, мг/дм ³	Зона подавления роста, мм	
	КI	КII
10	0	0
100	0	0
250	0	0
500	12	11
750	15	14,5
1000	17,5	16

Для оценки возможности биоремедиации почвы с помощью полученных культур микроорганизмов провели фитотестирование, используя методические рекомендации, разработанные ГУНИИ экологии

человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН [14]. Метод фитотестирования успешно используется в различных исследовательских работах, в том числе для оценки качества сорбционной очистки воды от различных ионов [15].

Таблица 3

Чувствительность культур микроорганизмов к ионам ртути

Концентрации нитрата ртути, мг/дм ³	Зона подавления роста, мм	
	К1	КП
10	0	0
75	0	0
100	11	12
250	13	14
500	16	17,5
750	18	19
1000	19,5	20

Фитотестирование основано на способности семян растений адекватно реагировать на экзогенное химическое воздействие путем изменения интенсивности прорастания корней, что позволяет принять длину корней за показатель тест-функции. Критерием вредного действия загрязнителя считается ингибирование роста корней семян.

В данной работе в качестве тест-объекта были выбраны семена овса (*Avena sativa*), поскольку они в сравнении с семенами других культур отличаются быстрым ростом, высоким процентом всхожести и имеют четко выраженную реакцию на присутствие загрязнителя.

Показателем тест-функции являлась средняя длина максимального корня (L_{cp}) контрольных и опытных семян, которая вычисляется как среднее арифметическое из совокупности данных о длине корней проростков, полученных в трех сериях эксперимента. Величину L_{cp} рассчитывали по формуле

$$L_{cp} = \frac{\sum L_i}{n},$$

где L_i – длина максимального корня каждого семени, мм; n – общее количество семян, взятых в опыт.

Согласно выбранной методике оценку степени опасности проводили по экспериментально установленной величине фитотоксического эффекта (эффекта торможения) E_T , который определяли по формуле

$$E_{\tau} = \frac{L_{\kappa} - L_{\text{оп}}}{L_{\kappa}} \cdot 100 \%,$$

где $L_{\text{оп}}$ – средняя длина корней в опыте, мм; L_{κ} – средняя длина корней в контроле, мм.

Фитотоксическое действие считается доказанным, если фитотоксический эффект (E_{τ}) составляет 20 % и более. Определение фитотоксического эффекта проводили путем сопоставления показателей тест-функции ($L_{\text{ср}}$) в отношении контрольных и опытных семян.

В нашей работе объектами для фитотестирования являлись растворы, полученные из образцов почв (водные почвенные вытяжки). Для фитотестирования подготовили 12 одинаковых образцов почвы, каждую навеску почвы обрабатывали раствором определенного состава (табл. 4). Концентрации солей $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ в растворах, вносимых в почву в качестве загрязнителей, рассчитывали таким образом, чтобы содержание ионов Pb^{2+} и Hg^{2+} в почве составляло 50 мг/кг воздушно-сухой почвы.

Колбы с образцами почв выдерживали в течение 4 сут до пика роста культур микроорганизмов. Затем заливали дистиллированной водой и после интенсивного перемешивания отстаивали при комнатной температуре в течение суток, затем пропускали через фильтр «синяя лента». Таким образом из образцов почвы получили водные вытяжки. Далее проводили фитотестирование.

В каждую чашку Петри помещали по 25 сухих семян, в опытные чашки вносили по 5 мл почвенных растворов, контрольные семена обрабатывали аналогичным количеством водного экстракта из образца незагрязненной почвы. Все приготовленные таким образом образцы выдерживали 5 сут, затем рассчитывали процент всхожести и измеряли длину корней проростков в контрольных и опытных пробах, причем объектом измерения у каждого из семян являлся корень максимальной длины. Последовательность выполнения фитотестирования показана на рисунке.

Результаты фитотестирования представлены в табл. 4. Они показывают, что ионы свинца и ртути проявляют сильное токсическое действие на почвенный раствор, которое проявляется в значительном снижении всхожести семян и замедлении роста корней. Культуральные жидкости, наоборот, оказывают положительный эффект на всхожесть и рост корней семян овса. Почвенные растворы, содержащие ионы свинца в присутствии культур КI и КII, становятся гораздо менее токсичными,

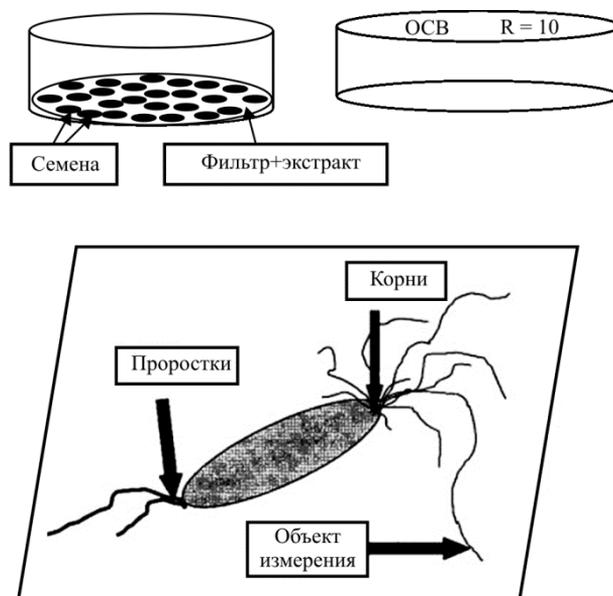


Рис. Последовательность выполнения фитотестирования

Таблица 4

Результаты фитотестирования

Образец	Всхо- жесть, %	$L_{ср}$, мм	$L_{оп}/L_{к}$, %	E_t , %	Тест-реакция
Незагрязненная почва (контроль)	92	54	100	0	Норма
Почва + среда РУГ	88	59	109	0	Норма
Почва + КІ	88	61	113	0	Норма
Почва + КІІ	92	61	113	0	Норма
Почва + раствор Pb^{2+}	32	22	41	59,3	Эффект торможения
Почва + раствор Pb^{2+} + КІ	72	44	81	18,5	Норма
Почва + раствор Pb^{2+} + КІІ	68	44	81	18,5	Норма
Почва + раствор Pb^{2+} + КІ + КІІ	72	45	83	16,7	Норма
Почва + раствор Hg^{2+}	20	10	19	81,5	Эффект торможения
Почва + раствор Hg^{2+} + КІ	48	27	50	50,0	Эффект торможения
Почва + раствор Hg^{2+} + КІІ	52	28	52	48,1	Эффект торможения
Почва + раствор Hg^{2+} + КІ + КІІ	60	32	59	40,7	Эффект торможения

эффект торможения снижается с 59,3 до 18,5, что соответствует нормальному значению (< 20 %). Токсическое действие ионов ртути более выражено по сравнению с действием ионов свинца, эффект торможения

равен 81,5. Присутствие культур микроорганизмов позволяет уменьшить его почти в 2 раза, однако нормального значения достигнуть не удастся. Возможно, это объясняется достаточно высоким содержанием ионов ртути в почве. Также отмечается более выраженное воздействие на снижение токсического эффекта сообщества обеих культур.

Таким образом, результаты исследований показывают, что культуры микроорганизмов можно использовать для биоремедиации почвы, загрязненной ионами свинца и ртути. Дополнительные исследования по изучению процесса аккумуляции ионов металлов в растениях и влияния культур микроорганизмов на их вынос из почвы в растения позволят более полно оценить возможность применения загрязненных почв после биоремедиации в сельском хозяйстве.

Список литературы

1. Ворончихина Е.А., Блинов С.М., Меньшикова Е.А. Технофильные металлы в естественных и урбанизированных экосистемах Пермского края // *Экология урбанизированных территорий*. – 2013. – № 1. – С. 103–108.
2. Водяницкий Ю.Н. Тяжелые и сверхтяжелые металлы и металлоиды в загрязненных почвах / Изд-во РАСХ, Почвенный ин-т им. В.В. Докучаева. – М., 2009. – 95 с.
3. Водяницкий Ю.Н., Васильев А.А., Лобанова Е.С. Загрязнение тяжелыми металлами и металлоидами почв г. Перми // *Агрохимия*. – 2009. – № 4. – С. 60–68.
4. Ильин В. Б. Тяжелые металлы в системе почва – растение. – Новосибирск: Наука, 1991. – 151 с.
5. Давыдова С.Л., Тагасов В.И. Тяжелые металлы как супертоксиканты XXI века. – М.: Знание, 1991. – 32 с.
6. Ртуть в окружающей среде юга Западной Сибири / Г.Н. Аношин, И.Н. Маликова, С.И. Ковалев [и др.] // *Химия в интересах устойчивого развития*. – 1995. – № 1-2. – С. 69–111.
7. Минеев В.Г. *Агрохимия*. – М.: Колос, 2004. – 720 с.
8. Маячкина Н.В., Чугунова М.В. Особенности биотестирования почв с целью их экотоксикологической оценки // *Вестник Нижегород. ун-та им. Н.И. Лобачевского*. – 2009. – № 1. – С. 84–93.
9. Терехова В.А. Биотестирование почв: подходы и проблемы // *Почвоведение*. – 2011. – № 2. – С. 190–198.
10. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук, Н.Н. Колотилова. – М.: Академия, 2005. – 603 с.
11. Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Корнеев Е.А. Руководство к практическим занятиям по микробиологии (малый практикум). – Ульяновск, 2003. – 82 с.
12. Махрова О.В., Бахирева О.И., Соколова М.М. Микробиологический метод очистки почв от ионов тяжелых металлов // *Химия. Экология. Биотех-*

нология – 2016: тез. докл. XVIII регион. науч.-практ. конф. студ. и молодых ученых. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2016. – С. 56–58.

13. Вельможина О.В., Бахирева О.И., Соколова М.М. Биотестирование как метод оценки эффективности биоремедиации почвы, загрязненной ионами тяжелых металлов // Химия. Экология. Урбанистика – 2017: материалы Всерос. науч.-практ. конф. молодых ученых, аспирантов, студентов и школьников (с междунар. участием). – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2017. – С. 335–341.

14. МР 2.1.7.2297–07. Обоснование класса опасности отходов производства и потребления по фитотоксичности / Федер. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – М., 2007. – 15 с.

15. Сорбционная очистка воды от примесей $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ и оценка ее качества биотестированием / М.М. Соколова, О.В. Нагорный, В.В. Вольхин, Л.В. Аникина // Химия и технология воды. – 2013. – Т. 35, № 2. – С. 132–139.

References

1. Voronchikhina E.A., Blinov S.M., Men'shikova E.A. Tekhnofil'nye metally v estestvennykh i urbanizirovannykh ekosistemakh Permskogo kraia [Technophilic metals in natural and urbanized ecosystems of the Perm region]. *Ekologiya urbanizirovannykh territorii*, 2013, no. 1, pp. 103-108.

2. Vodianitskii Iu.N. Tiazhelye i sverkhthiazhelye metally i metalloidy v zagriaznennykh pochvakh [Heavy and superheavy metals and metalloids in contaminated soils]. Moscow, Izdatel'stvo RASKh, Pochvennyi institut im. V.V. Dokuchaeva, 2009, 95 p.

3. Vodianitskii Iu.N., Vasil'ev A.A., Lobanova E.S. Zagriaznenie tiazhelymi metallami i metalloidami pochv g. Permi [Pollution by heavy metals and metalloids of soils in Perm]. *Agrokhiimiia*, 2009, no. 4, pp. 60-68.

4. Il'in V.B. Tiazhelye metally v sisteme pochva – rastenie [Heavy metals in the soil-plant system]. Novosibirsk, Izdatel'stvo Nauka, 1991, 151 p.

5. Davydova S.L., Tagasov V.I. Tiazhelye metally kak supertoksikanty XXI veka [Heavy metals as super-toxicants of the XXI century]. Moscow, Izdatel'stvo Znanie, 1991, 32 p.

6. Anoshin G.N., Malikova I.N., Kovalev S.I. Rtut' v okruzhaiushchei srede iuga Zapadnoi Sibiri [Mercury in the environment of the south of Western Siberia]. *Khiimiia v interesakh ustoichivogo razvitiia*, 1995, no. 1-2, pp. 69-111.

7. Mineev V.G. Agrokhiimiia [Agrochemistry]. Moscow, Izdatel'stvo MGU, Izdatel'stvo Kolos, 720 p.

8. Maiachkina N.V., Chugunova M.V. Osobennosti biotestirovaniia pochv s tsel'iu ikh ekotoksikologicheskoi otsenki [Features of soil biotesting for the purpose of their ecotoxicological assessment]. *Vestnik Nizhegorodzhskogo universiteta im. N.I. Lobachevskogo*, 2009, no. 1, pp. 84-93.

9. Terekhova V.A. Biotestirovanie pochv: podkhody i problem [Soil Biotesting: Approaches and Problems]. *Pochvovedenie*, 2011, no. 2, pp. 190-198.

10. Netrusov A.I., Egorova M.A., Zakharchuk L.M., Kolotilova N.N. Praktikum po mikrobiologii [Workshop on Microbiology]. Moscow, Izdatel'stvo Akademiia, 2005, 603 p.

11. Vasil'ev D.A., Zolotukhin S.N., Korneev E.A. Rukovodstvo k prakticheskim zaniatiiam po mikrobiologii (malyi praktikum) [A Guide to Practical Lessons in Microbiology (Small Workshop)]. Ul'ianovsk, 2003

12. Makhrova O.V., Bakhireva O.I., Sokolova M.M. Mikrobiologicheskii metod oshistki pochv ot ionov tiazhelykh metallov [Microbiological method of soil purification from ions of heavy metals]. *Khimiia. Ekologiya. Biotekhnologiya* – 2016, Perm', Izdatel'stvo PNIPU, 2016, pp. 56-58.

13. Vel'mozhina O.V., Bakhireva O.I., Sokolova M.M. Biotestirovanie kak metod otsenki effektivnosti bioremediatsii pochvy, zagriaznennoi ionami tiazhelykh metallov [Biotesting as a method for assessing the effectiveness of bioremediation of soil contaminated with ions of heavy metals]. *Khimiia. Ekologiya. Urbanistika* – 2017, Perm', Izdatel'stvo PNIPU, 2017, pp. 335-341.

14. MR 2.1.7.2297–07. Obosnovanie klassa opasnosti otkhodov proizvodstva i potrebleniia po fitotoksichnosti [MP 2.1.7.2297–07. Justification of hazard class of production and consumption wastes by phytotoxicity]. Federal'naia sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebitelei i blagopoluchiiia cheloveka, 2007, 15 p.

15. Sokolova M.M., Nagornyi O.V., Vol'khin V.V., Anikina L.V. Sorbtionnaia oshistka vody ot primesei $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ i otsenka ee kachestva biotestirovaniem [Sorption purification of water from impurities $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ and assessment of its quality by biotesting]. *Khimiia i tekhnologiya vody*, 2013, vol. 35, no. 2, pp. 132-139.

Получено 18.02.2018

Об авторах

Вельможина Ольга Вадимовна (Пермь, Россия) – магистрант кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: lelka.mv@ya.ru).

Бахирева Ольга Ивановна (Пермь, Россия) – кандидат химических наук, доцент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: bahirevy@mail.ru).

Соколова Мария Михайловна (Пермь, Россия) – кандидат химических наук, доцент кафедры химии и биотехнологии Пермского национального исследовательского политехнического университета (614990, г. Пермь, Комсомольский пр., 29, e-mail: mmsokolova@mail.ru).

About the authors

Ol'ga V. Vel'mozhina (Perm, Russian Federation) – Undergraduate Student, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, e-mail: lelka.mv@ya.ru).

Ol'ga I. Bakhireva (Perm, Russian Federation) – Ph.D. of Chemical Sciences, Associate Professor, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, e-mail: bahirevy@mail.ru).

Mariya M. Sokolova (Perm, Russian Federation) – Ph.D. of Chemical Sciences, Associate Professor, Department of Chemistry and Biotechnology, Perm National Research Polytechnic University (29, Komsomolsky av., Perm, 614990, e-mail: mmsokolova@mail.ru).