

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВЕННЫХ СУБСТРАТОВ ПРИ ОЧИСТКЕ С ПРИМЕНЕНИЕМ КОМПЛЕКСНЫХ БИОСОРБЕНТОВ

© 2010 И.Э. Шарапова¹, А.В. Гарабаджиу², М.Ю. Маркарова¹, Т.Н. Щемелинина¹

¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

² Санкт-Петербургский Технологический институт (Технический университет)

Поступила в редакцию 05.05.2010

Изучены биологическая (микробиологическая) активность в различных почвенных субстратах, загрязненных нефтью в процессе самоочищения и с применением сорбента и биосорбентов в микрополевым опыте. Показано, что корреляция биологической активности (ферментативной и дыхательной) с численностью гетеротрофов и углеводородокисляющей микробиотой в большей степени прослеживается в минеральных субстратах, чем в органических почвенных субстратах. Показано, что эффективность очистки почвенных субстратов напрямую зависит от микробиологической активности и физических характеристик нефтезагрязненных почв.

Ключевые слова: *нефтяное загрязнение, микробиологическая, ферментативная, дыхательная активности, биосорбенты*

Перспективным направлением очистки почв и воды от нефтезагрязнений является применение препаратов на основе специализированных микроорганизмов и их ассоциаций. Одним из способов очистки загрязненных почвенных субстратов является применение иммобилизованных на носителях форм биопрепаратов. Иммобилизованные клетки более устойчивы к неблагоприятному воздействию факторов окружающей среды, а также к конкурентному вытеснению местной микробиотой [1].

Цель исследования – определить биологическую (микробиологическую) активность в различных загрязненных нефтью почвенных субстратах при их обработке комплексными биосорбентами.

В течение 3 летних месяцев в микрополевым эксперименте испытывали комплексные биосорбенты, составленные в разных сочетаниях. Для исследования использовали загрязненные нефтью до концентрации 150 мг/г глинистый, песчаный и торфяной почвенный субстраты, отличающиеся физическими и агрохимическими характеристиками (табл. 1). Индивидуальные биосорбенты были получены иммобилизацией адсорбционным способом на носителе-сорбенте «Сорбо-нафт» 3 штаммов микроорганизмов: *Rhodococcus*

egvi B-1117 ККМ (биосорбент бактериальный), *Rhodotorula Glutinis* Y-1112 ККМ (биосорбент дрожжевой); *Trichoderma lignorum* F-98 ВКПМ (биосорбент грибной) с титром 1×10^7 КОЕ/1г сорбента. В композиции индивидуальные биосорбенты брали в соотношении 1:1 и вносили в загрязненный почвенный субстрат в соответствующие варианты исходя из расчета нормы внесения сорбентов по 5т/га. По схеме опыта в почву также внесли минеральное удобрение – азофоску ($N_{16}P_{16}K_{16}$) из расчета 350 кг/га. В течение опыта в динамике, на 1, 3, 15, 30, 60, 90 сутки оценивали скорость снижения массовой доли нефти, ферментативную и дыхательную активность почвы, численность отдельных трофических групп почвенной микробиоты.

Определение ферментативной активности проводили по методам, описанным Хазиевым [2]. Содержание нефти в почве анализировали методом флуориметрии на анализаторе жидкости «Флюорат-02» [3]. Дыхательную активность исследуемых субстратов определяли по интенсивности выделения CO_2 на газовом хроматографе «Цвет-800» [4]. Учет численности физиологических групп микроорганизмов почвенных субстратов проводили методом Коха: гетеротрофы – на среде МПА; углеводородо-кисляющие (УОМ) – на среде Придхем-Готлиба [5]. Измерение содержания углерода и азота в образцах почвы проводили методом газовой хроматографии на элементном анализаторе EA 1110 (CHNS-O) [6].

Результаты и обсуждение. Исходные характеристики опытных субстратов приведены в табл. 1, из которой видно, что они отличались содержанием общего азота и углерода, величиной рН. Песчаный и глинистый субстрат после загрязнения нефтью подкислялись, а в исходно кислом торфяном субстрате величина рН увеличилась. Содержание азота во всех опытных субстратах низкое.

Шарапова Ирина Эдмундовна, ведущий инженер лаборатории биологии почв и проблем природовосстановления. E-mail: scharapova@ib.komisc.ru
Гарабаджиу Александр Васильевич, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой «Технологии микробиологического синтеза». E-mail: gar-54@mail.ru
Маркарова Мария Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии. E-mail: myriam@mail.ru
Щемелинина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биохимии и биотехнологии

Таблица 1. Агрохимические показатели почвенных субстратов

| Почвенный субстрат | Азот общий, % | Углерод общий, % | pH субстрата исходный | pH при внесении 150 мг/г нефти |
|--------------------|---------------|------------------|-----------------------|--------------------------------|
| глинистый субстрат | 0,069±0,021 | 1,28±0,19 | 6,03 | 5,81 |
| песчаный субстрат | 0,0252±0,008 | 0,21±0,05 | 5,20 | 4,89 |
| торфяной субстрат | 0,9±0,14 | 15,8±1,6 | 2,83 | 3,47 |

Параметры биологической активности почв, такие как численность отдельных групп почвенной микробиоты, ферментативная и дыхательная активность почвы являются важными показателями интенсивности процессов очищения загрязненных субстратов. Микробиологическая активность – один из экологически значимых параметров почвы [7]. Характер реакции комплекса почвенной микробиоты на нефтяное загрязнение будет зависеть от концентрации загрязнения. Так, в небольших дозах нефть может пополнять запасы питательных веществ, доступных почвенным микроорганизмам (м/о). В почвах любой территории присутствуют углеводороды как природного, так и антропогенного происхождения, поэтому в ней всегда содержится некоторое фоновое количество УОМ. В нашем опыте уровень загрязнения почвенных субстратов исходно был высоким, и нефть оказывала ингибирующее на м/о, значительно снижая их численность. Степень угнетения гетеротрофной группы микроорганизмов в почвенных субстратах в начале опыта (первый месяц) была в хорошо отслеживаемой зависимости от концентрации нефти (рис. 1). В загрязненных нефтью глинистым и песчаном субстратах произошло значительное снижение численности гетеротрофов. В вариантах с внесением биосорбентов с иммобилизованными на сорбентах м/о наблюдали незначительное увеличение численности этой физиологической группы. Показатели численности УОМ были на несколько порядков ниже исходных значений биосорбентов в песчаной и глинистой почвах, возможно, это связано с необходимостью адаптации иммобилизованных микроорганизмов в загрязненных средах с изначально неблагоприятными условиями питания и существования. В торфяном субстрате в загрязненных вариантах (особенно в варианте с сорбентом без м/о) наблюдали снижение численности гетеротрофов относительно контрольного варианта. Через месяц показатели численности м/о в почвенных субстратах начали изменяться в сторону увеличения, что может быть связано как с адаптацией микробиоты к загрязнению, так и с уменьшением концентрации легких токсичных фракций.

В результате попадания нефти в почву увеличивается содержание органического вещества. Начавшиеся процессы естественной деградации делают эти вещества доступными для м/о, которые могут их использовать в качестве дополнительных источников питания, что наряду с постепенно снижающимся токсическим действием нефтяных углеводородов (НУГВ) способствует нарастанию численности гетеротрофных м/о и обуславливает дальнейшее доминирование данной группы микроорганизмов в почве. После внесения с биосорбентами УОМ в опытной почве

показатели численности гетеротрофной группы м/о и УОМ были значительно выше во второй (после адаптационной) фазе опыта, чем в вариантах без биообработки (контрольных, нефтезагрязненных, и в вариантах с сорбентом без м/о). В массе жизнеспособных нефтеокисляющих микроорганизмов, определенной чашечным методом Коха, доминировала бактериальная культура *Rhodococcus egvi* в микробных ассоциациях вариантов с внесенными комплексными бактериально-дрожжевым и бактериально-грибным биосорбентами в нефтезагрязненных почвенных пробах (рис. 1).

Одним из важных показателей биодеструкции углеводородов в почве является ферментативная, и, в частности, дегидрогеназная активность (АД) микробиоты, которая коррелирует с метаболическими параметрами, такими как число микробных клеток, почвенное дыхание, концентрация АТФ, оборот углерода и азота, и содержание органического вещества [7, 8].

Дегидрогеназная активность в значительной степени отражает уровень деструкции нефтяных углеводородов в почвенных субстратах опыта. Во всех почвенных субстратах наибольшие показатели АД наблюдались в вариантах с внесением комплексных биосорбентов. На глинистом и песчаном субстратах показатели дегидрогеназной активности были выше относительно контрольного варианта (рис. 2). Внесение комплексных биосорбентов в песчаный и глинистый почвенные субстраты значительно увеличило процессы дегидрирования, особенно к концу эксперимента в песчаном субстрате. В вариантах нефтезагрязненном и с внесением сорбента без м/о незначительное повышение АД наблюдалось лишь к концу опыта.

В торфяном субстрате самые низкие показатели АД были в варианте с внесением сорбента без м/о. Наибольшими показателями АД в торфяном субстрате выделялись на протяжении всего опыта варианты с внесением биосорбентов и вариант нефтезагрязненной почвы без обработки. К концу опыта дегидрогеназная активность увеличилась во всех субстратах относительно контрольного варианта. Особенности почвенных субстратов обусловили динамику ферментативной активности при биодеструкции нефти. Данные АД согласуются с динамикой изменения численности гетеротрофных м/о и УОМ в проведенном опыте (рис.1, 2; табл. 2).

Повышение липазной активности связано с накоплением малоактивных и неразлагающихся биологических веществ, образующихся в процессе биодegradации нефти [9], а также с тем, что в деградации липидов участвуют ферментные системы очень схожие с системами биодegradации нефтепродуктов [10]. Если в начале опыта высокое

содержание углеводов в почве ингибировало липолитическую активность почти во всех вариантах, то уже на 3 сутки мы наблюдали ее повышение. В вариантах с внесением биосорбентов высокие показатели липазной активности наблюдались в глинистом и песчаном почвенных субстратах (рис. 3).

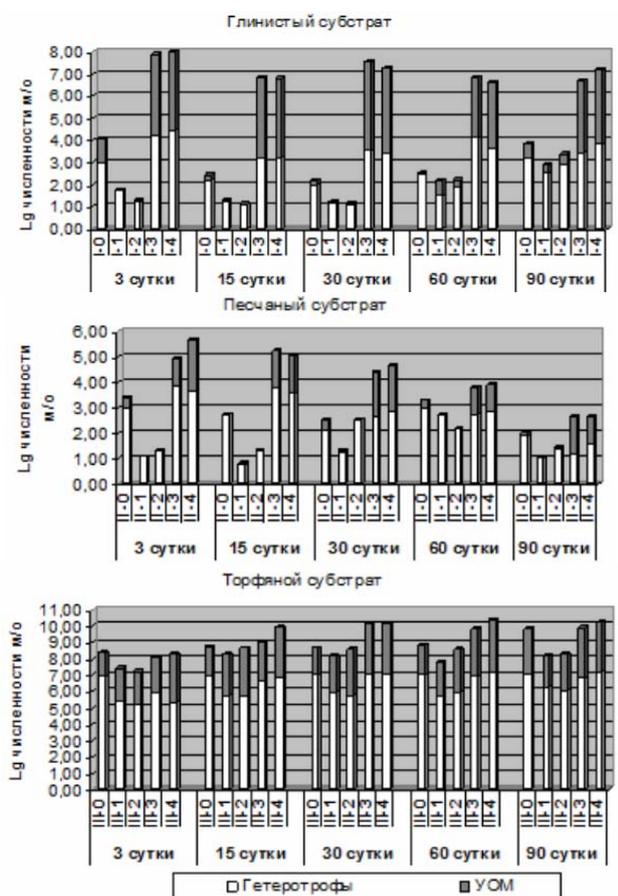


Рис. 1. Численность жизнеспособных

микроорганизмов в глинистом, песчаном и торфяном почвенных субстратах, Lg численности. Условные обозначения: 0 – контроль, незагрязненный почвенный субстрат; 1 – нефтязагрязненный почвенный субстрат; 2 – почвенный субстрат с сорбентом без микроорганизмов; 3 – почвенный субстрат с бактериально-дрожжевым биосорбентом; 4 – почвенный субстрат с бактериально-грибным биосорбентом

В торфяном субстрате усиление процессов липолиза наблюдалось лишь в начале эксперимента в варианте с внесением бактериально-грибного сорбента. К концу исследований происходила стабилизация липолитических процессов в песчаном и торфяном субстратах. В глинистом субстрате липазная активность в вариантах с внесением биосорбентов была еще достаточно высокой по сравнению с контрольным вариантом.

Дыхательная активность почвы, отражающая метаболические процессы в почве и связанная с биохимической активностью, а также с количеством жизнеспособных микроорганизмов в почве, была определена нами по скорости выделения CO_2 . Дыхание (эмиссия CO_2) является интегральным показателем функционирования почвенного микробиоценоза. По интенсивности

эмиссии углекислого газа из почвы можно судить о скорости процессов разложения органического вещества.

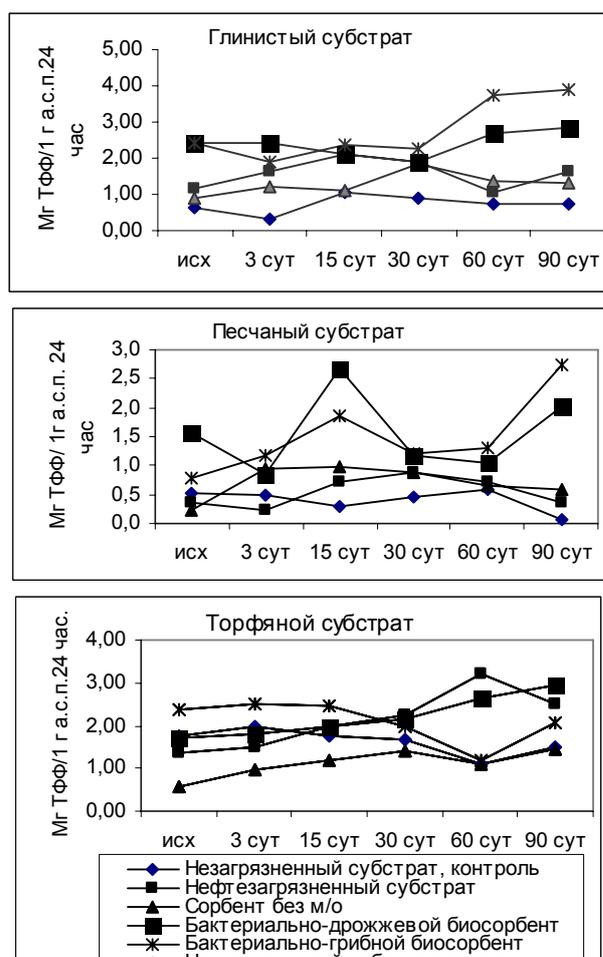


Рис. 2. Дегидрогеназная активность в глинистом, песчаном и торфяном почвенных субстратах, мг ТФФ/ 1г а.с.п. 24 час.

Результаты исследований свидетельствовали о разной реакции почвенной микробиоты на условия снабжения кислородом. Показатели дыхательной активности в контрольных вариантах глинистого и песчаного субстратов были существенно ниже всех вариантов опыта, и на протяжении всего эксперимента изменялись незначительно (рис. 4.). Внесенные в почвенные субстраты сорбент и биосорбенты с минеральными удобрениями улучшили структуру глинистого и песчаного субстратов, положительно влияли на развитие и дыхательную активность почвенных микроорганизмов, о чем свидетельствовали и высокие показатели скорости выделения CO_2 в этих субстратах. На торфяном субстрате в вариантах с сорбентом без м/о и биосорбентами в начале опыта были высокие показатели интенсивности дыхательной активности, но к концу опыта наблюдалось снижение дыхательной активности во всех загрязненных вариантах. Эти данные коррелируют с показателями ферментативной активности в глинистом, песчаном и торфяном почвенных субстратах (табл. 2).

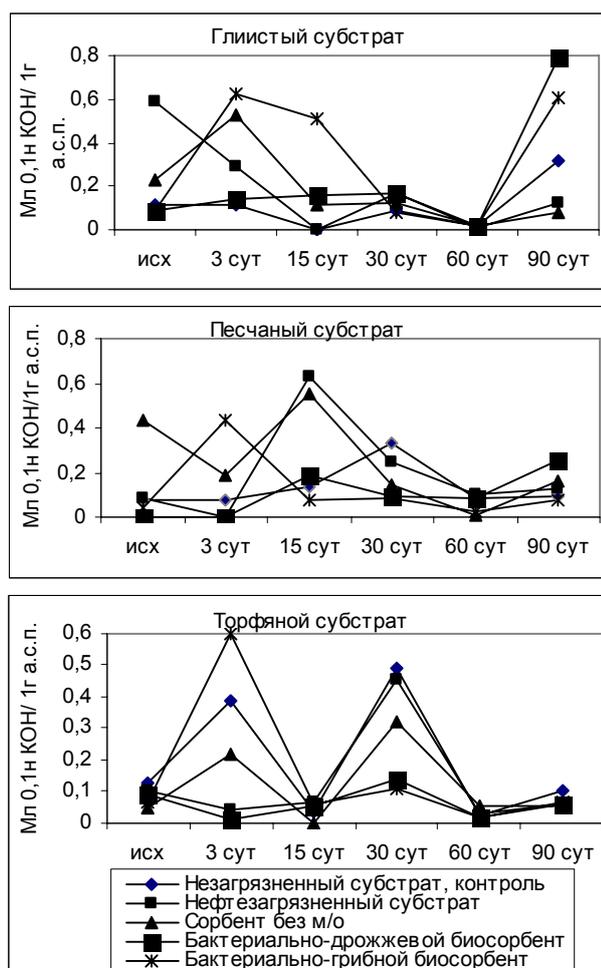


Рис. 3. Липазная активность в глинистом, песчаном и торфяном почвенных субстратах, мл 0,1н КОН/ 1 г а.с.п.час

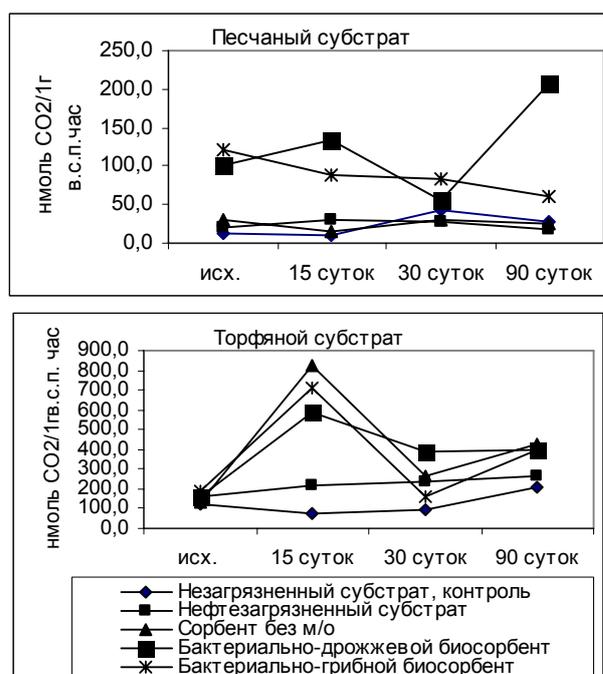
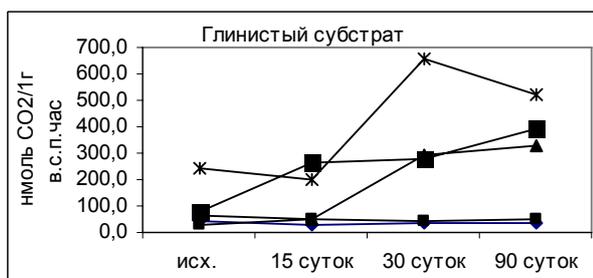


Рис. 4. Дыхательная активность в глинистом, песчаном и торфяном почвенных субстратах, нмоль CO₂/ 1г в.с.п.час.

Обнаружены различные корреляции численности микробиоты с метаболическими параметрами, такими как дегидрогеназная, липазная и дыхательная активности в почвенных субстратах (табл. 2). Отсутствовали корреляции дыхательной активности (эмиссии CO₂) с липазной активностью, а также дегидрогеназной с липазной активностями во всех почвенных субстратах. В торфяном субстрате корреляция отсутствовала практически по всем показателям.

Об эффективности биоразложения нефтепродуктов нефтезагрязненных почв говорят результаты анализа нефти в почве к концу опыта. Снижение содержания нефти произошло во всех вариантах, но с разной интенсивностью. На глинистом субстрате самые высокие показатели очистки наблюдалась в вариантах с внесением бактериально-дрожжевого сорбента.

Таблица 2. Коэффициенты корреляции в почвенных субстратах

| Почвенные субстраты | Коррелирующие показатели | | | | | | |
|---------------------|--------------------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|--------|--------|-----------------------------|
| | гетеротрофы/АД | гетеротрофы/АЛ | гетеротрофы/CO ₂ | эмиссия CO ₂ /АД | УОМ/АД | УОМ/АЛ | УОМ/эмиссия CO ₂ |
| глинистый | r=0,5 | r=0,5 | r=0,3 | r=0,7 | r=0,7 | r=0,4 | r=0,6 |
| песчаный | r=0,4 | r=0,2 | r=0,3 | r=0,7 | r=0,6 | r=0,1 | r=0,8 |
| торфяной | r=0,1 | r=0,2 | r=0,1 | r=0,1 | r=0,2 | r=0,2 | r=0,6 |

Незначительное самоочищение произошло в вариантах нефтезагрязненном и с сорбентом без м/о за счет собственной микробиоты глинистого субстрата. В торфяном субстрате в нефтезагрязненном варианте показатели снижения содержания нефти незначительно отличались от вариантов с

внесением биосорбентов, что говорит о высоком природном потенциале самоочищения органических (торфяной) почв. Наихудшие результаты по деградации нефти были получены для песчаного субстрата (рис. 5).

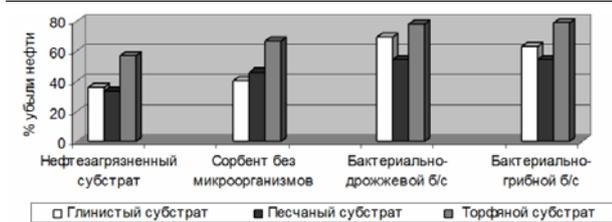


Рис. 5. Снижение содержания нефтепродуктов в почвенных субстратах по окончании опыта, % убыли нефти

Выводы: результаты микрополевого опыта показывают, что эффективность очистки почвенных субстратов напрямую зависит от микробиологической активности исходных субстратов, которая возрастает в ряду песчаный – глинистый – торфяной субстраты. Изменение показателей биологической активности (ферментативной и дыхательной) коррелирует с численностью гетеротрофов и УОМ в большей степени в минеральных почвенных субстратах. Комплексный бактериально-дрожжевой биосорбент отличается более высокими показателями биологической активности и степенью очистки во всех почвенных субстратах от бактериально-грибного биосорбента. Усиление микробной активности загрязненной нефтью почвы при применении комплексных биосорбентов зависит от нефтедеструктивной эффективности иммобилизованных на сорбентах микроорганизмов. Применение сорбента без микроорганизмов и биосорбентов более эффективно на минеральных (глинистый, песчаный) субстратах, но не перспективно для очистки органических (торфяных) почвенных субстратов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Экологические основы оптимизированной технологии восстановления нефтезагрязненных

- природных объектов на Севере. – Сыктывкар, 2007. – 140 с.
2. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 252 с.
3. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости «Флюорат-02». ПНД Ф16.1.21–98. – М., 1998. – 15 с.
4. Назаров, С.К. Методы измерения и расчета баланса углерода в естественных фитоценозах / С.К. Назаров, М.Д. Сивков // Сер.препринтов «Новые научные методики». КНЦ УрО РАН. – 1992. – Вып. 43. – С. 16.
5. Непрусов, А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Непрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук и др.; Под ред. А.И. Непрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с.
6. Методика выполнения измерений содержания углерода и азота в образцах почвы, растений, животных, природных материалов, органических соединений методом газовой хроматографии на элементном анализаторе EA 1110(CHNS-O). – Введ. 2005.04-30. – Сыктывкар: Институт биологии КНЦ УрО РАН. – 2006. – 12 с.
7. Звягинцев, Д.Г. Биология почв / Д.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. – М., 2005. – С. 445.
8. Исмаилов, Н.М. Современное состояние методов рекультивации нефтезагрязненных земель / Н.М. Исмаилов, Ю.И. Пиковский // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 222-230.
9. Allard, A.S. Bioremediation of organic waste sites: a critical review of microbiological aspects / A.S. Allard, A.N. Neilson // Int. Biodeterioration Biodegradation. – 1997. – V. 39. – P. 253-285.
10. Margesin, R. Soil lipase – a useful indicator of oil bioremediation / R. Margesin, A. Zimmerbauer, F. Schinner // Biotechnology Techniques. – 1999. – V. 13. – P. 859-863.

MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF PETROPOLLUTED EDAPHIC SUBSTRATES AT WEEDING WITH THE APPLICATION OF COMPLEX BIOSORBENTS

© 2010 I.E. Sharapova¹, A.V.Garabadzhiu², M.Yu.Markarova¹, T.N. Shchemelinina¹

¹Institute of Biology Komi SC UB RAS, Syktyvkar
²St.-Petersburg Technological Institute (Technical University)

Are studied biological (microbiological) activity in various edaphic substrates, polluted by oil during autopurification and with application of sorbent and biosorbents in microfield experience. It is shown, that correlation of biological activity (enzymatic and respiratory) with numerosity of heterotrophs and carbon oxidizing microbiota in a greater degree tracing in mineral substrates, than in organic edaphic substrates. It is shown, that efficiency of weeding the edaphic substrates directly depends on microbiological activity and physical characteristics of the petropolluted soils.

Key words: oil contamination, microbiological, enzymatic, respiratory activity, biosorbents

Irina Sharapova, Leading Engineer at the Laboratory of Soil Biology and Nature Restoration Problems. E-mail: scharapova@ib.komisc.ru
 Alexander Garabadzhiu, Doctor of Chemistry, Professor, Head of the Department "Technologies of Microbiological Syntesis". E-mail: gar-54@mail.ru

MariyaMarkarova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology. E-mail: myriam@mail.ru
 Tatyana Shchemelinina, Candidate of Biology, Research Fellow at the Laboratory of Biochemistry and Biotechnology