

УДК 632.122.2: 504.53.062.4

ВЛИЯНИЕ МИКРОБНОГО И ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТОВ НА ОЧИСТКУ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

©2013 Т.Н. Щемелинина¹, М.Ю. Маркарова¹, Е.М. Анчугова¹, С.М. Надежкин²,
Л.Г. Емельянова³

¹ Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, г. Сыктывкар

² ВНИИ селекции и семеноводства овощных культур, Московская область

³ Республиканский центр обеспечения функционирования особо охраняемых
природных территорий и природопользования, г. Сыктывкар

Поступила в редакцию 26.09.2013

Проведено исследование по оценке влияния нефтяного загрязнения на свойства различных типов почв и их очищение при помощи микробного и ферментного препаратов. Показано влияние биопрепаратов на изменение ферментативной активности нефтезагрязненных почв после длительного мерзлотного состояния.

Ключевые слова: *нефтяное загрязнение, микробный препарат, ферментный препарат, ферментативная активность, очищение почв*

Проблема восстановления нефтезагрязненных земель особенно актуальна в северных районах. Известно, что почвы севера характеризуются низким потенциалом самовосстановления и уязвимы даже при незначительных техногенных воздействиях. Это связано с тем, что в экстремальных климатических условиях формируется маломощный органогенный почвенный горизонт, содержание основных биогенных элементов в котором крайне низкое, а микробиологические процессы замедлены. Существует два основных направления в биорекультивации нефтезагрязненных земель. Первый направлен на стимулирование биодеструкции нефти агротехническими и агрохимическими приемами, второй – на использование микробиологических препаратов на основе нефтеокисляющих бактерий [1-7]. Основой микробиологических препаратов является микробная масса. Отработанная культуральная жидкость, образующаяся после отделения микробной массы, остается невостребованной и

считается отходом производства. В то же время она представляет собой обогащенную биологически активными веществами культуральную жидкость, содержащую продукты метаболизма бактерий, в том числе экзоферменты, выделенные в среду в процессе выращивания микробной массы. Как известно [8], в случае, когда окружающие условия неблагоприятны для деятельности микроорганизмов, метаболизм почвы может остаться неизменным благодаря действию внеклеточных ферментов. Исходя из этого, мы предположили, что в условиях Севера использование культуральной жидкости, иммобилизованной на носителе (ферментного препарата) для рекультивации нефтезагрязненных почв (НЗП) является более целесообразным, чем микробного. Использование культуральной жидкости также решает проблему утилизации отходов производства микробных препаратов. Для удобства транспортировки и применения культуральной жидкости возможна ее иммобилизация на разных носителях. Кроме того, иммобилизация ферментов, как правило, влечет за собой рост их устойчивости к тепловой денатурации [9]. Для изучения возможности применения культуральной жидкости в качестве рекультиванта был поставлен микрополевой опыт в условиях, приближенных к естественным.

Цель исследования: оценка влияния микробного и ферментного препаратов на очистку почв, загрязненных нефтью в условиях низких температур.

Условия эксперимента. Опыт был поставлен на открытом воздухе в вегетационных сосудах в четырехкратной повторности. В

Щемелинина Татьяна Николаевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник. E-mail: shemelinina@ib.komisc.ru

Маркарова Мария Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник. E-mail: markarova@ib.komisc.ru

Анчугова Елена Михайловна, ведущий инженер. E-mail: anchugova@ib.komisc.ru

Надежкин Сергей Михайлович, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией агрохимических методов селекции. E-mail: nadegs@yandex.ru

Емельянова Лариса Георгиевна, заведующая отделом экологической экспертизы. E-mail: lora1104@rambler.ru

качестве объектов исследования использовали карьерные песок и глину, и верховой торф, отобранные на территории Усинского района Республики Коми, условно названные нами как

песчаная, глинистая и торфяная почва (характеристика почв приведена в табл. 1). Опытные почвы (каждый вариант – 2 кг почвы) загрязняли нефтью в количестве 50 и 150 мг/г.

Таблица 1. Агрохимические показатели почв

Почва	pH	P ₂ O ₅ , мг/100 г	K ₂ O, мг/100 г	Ca, мг/экв 100 г	Mg, мг/экв 100 г	N, %	C, %
глинистая	6,0	27,0±5,4	16,6±2,5	20,7±1,5	10,9±0,8	0,069±0,021	1,28±0,19
		27,0±5,4	16,8±2,5	21,0±1,6	10,3±0,7	0,073±0,022	1,24±0,19
песчаная	5,2	3,9±0,3	3,6±0,5	0,60±0,1	0,39±0,03	0,025±0,006	0,210±0,05
		3,9±0,8	3,9±0,6	0,63±0,1	0,42±0,04	0,013±0,001	0,113±0,02
торфяная	2,8	22,4±4,5	29,5±4,4	51,3±3,8	6,61±0,5	0,9±0,14	15,8±1,6
		22,7±4,5	29,3±4,3	50,8±3,8	6,61±0,5	0,7±0,11	12,6±1,3

Примечания: над чертой – начало опыта, под чертой – окончание опыта, через 180 суток

На основе депонированных культур нефтеокисляющих микроорганизмов М.Ю. Маркаровой (НИИ «Коллекция культур микроорганизмов» ФГУН ГНЦ ВБ Вектор), полученные из нефтезагрязнённых почв Усинского района Республики Коми, *Rhodotorula glutinis* рег. номер: У-1113, *Rhodococcus equi* рег. номер: В-1116, были созданы микробный и ферментный препараты: комплекс 2-х культур нарабатывали в колбах на среде Чапека с добавлением нефти в течение 3 суток, отделяли микробную массу от культуральной жидкости. В качестве носителя для иммобилизации ферментов культуральной жидкости использовали верховой торф. В загрязнённые почвы вносили культуральную жидкость (ферментный препарат), иммобилизованный на торфе из расчета 15 г/кг или микробную массу (микробный препарат) с титром клеток в рабочем растворе 1.2×10^9 . Также было внесено минеральное удобрение – карбамид из расчета 1 мг/см². Почвы находились в естественных условиях (температура +35-37°C). Пробы почв для определения ферментативной активности отбирали сразу после закладки опыта и через 180, 210 и 360 суток. Содержание нефтепродуктов определяли в начале и конце опыта. Зимний период закладки опыта был выбран не случайно. Исследования включали в себя изучение биологических процессов после длительного мерзлого состояния (6 месяцев) в образцах почвенных проб, как загрязнённых и необработанных, так и тех вариантов, в которые были внесены микробный и ферментный препарат. В биопрепаратах проверялась устойчивость микроорганизмов и внеклеточных ферментов к влиянию низких температур. Морозная погода, со среднесуточными температурами ниже –5°C, устанавливается в третьей декаде октября и длится 180 дней (до второй декады апреля) [10, 11]. Микрополевым опытом был поставлен в конце октября. При первом отборе проб температура

воздуха составляла –1°C. В конце апреля, когда сошел снежный покров, был проведен второй отбор почвенных образцов. Температура воздуха при отборе +6°C. Массовое возобновление вегетации начинается в первой декаде июня ($t=+13^\circ\text{C}$). Именно в этот период были взяты очередные пробы на исследование ферментативной активности. Последние образцы были взяты через год после постановки опыта ($t=+12^\circ\text{C}$).

Определение ферментативной активности в почве проводили по методам, описанным Хазиевым [12]: активность каталазы определяли перманганатометрическим титрованием, активность дегидрогеназы – калориметрическим методом, липазы – путем щелочного титрования. Содержание нефти в почве анализировали методом флуориметрии на анализаторе жидкости «Флюорат – 02» в соответствии с ПНД Ф 16.1.21-98 [13]. Определение среднего геометрического G_{Mea} проводили по формуле:

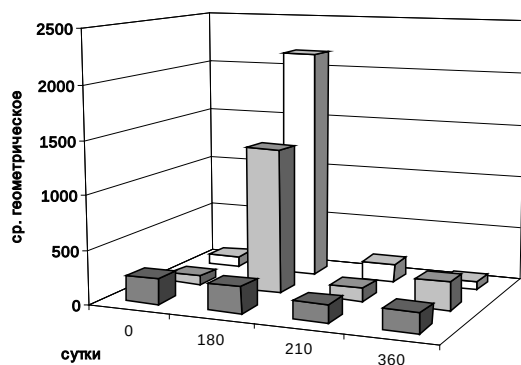
$$G_{Mea} = \sqrt[3]{Cat \times Deh \times Lip}$$

где Cat – каталаза, %; Deh – дегидрогеназа, %; Lip – липаза, %.

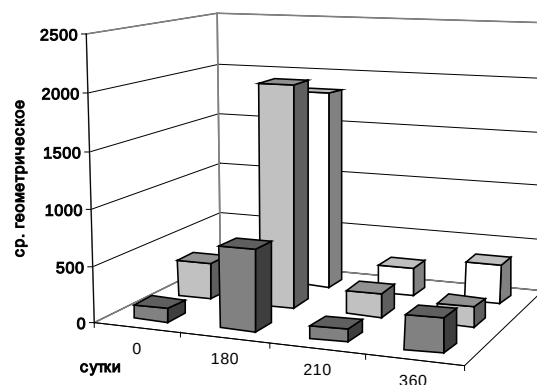
Обсуждение результатов. Среди различных биологических критериев оценки антропогенного влияния на почвы наиболее оперативными и перспективными являются показатели ферментативной активности, дающие сведения о динамике важнейших биохимических процессов в почве: синтезе и разложении органического вещества, нитрификации и других процессах. Преимуществом использования этих показателей является не только возможность быстрого определения изменений в экосистеме на ранних стадиях, но и прогнозирование степени и направления изменений, проходящих в них [15]. Выбранные нами для анализа почв каталазная, дегидрогеназная и липазная активности не

случайны, т.к. именно эти биохимические показатели наиболее быстро реагируют на изменения свойств почвы под влиянием нефтепродуктов, более информативны для целей биодиагностики и биомониторинга. Анализировать огромный комплекс полученных данных довольно сложно и не показательно, поэтому мы свели все полученные результаты ферментативной активности к среднему геометрическому (GMea) [14, 16]. Расчет среднего геометрического основан только на ферментативной активности и не учитывает влияния специфических химических и физических свойств. Таким образом, GMea объясняет тенденции изменения качества почвы без измерения физических параметров [14]. По значениям среднего геометрического можно судить об изменениях, произошедших в почвах за период проведения микрополевого опыта при уровне загрязнения нефтью в 5% и 15%. Почвы, (глинистая, песчаная, торфяная) загрязнённые без обработки (НЗП) и обработанные биодобавками и минеральными удобрениями, отличаются интенсивностью метаболических процессов.

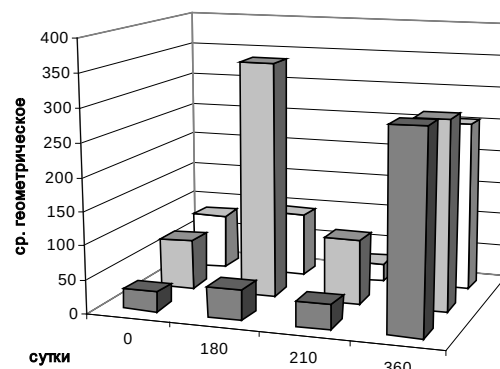
В нефтезагрязненных вариантах без обработки ферментативная активность повышается в послеморозный период (180 суток), что мы наблюдаем по изменению геометрического показателя GMea. Далее происходит снижение и спустя год постепенное увеличение биологической активности приводит к повышению GMea (рис. 1). В торфяной (органогенной) почве, являющейся самой по себе биологически активной из-за преобладания органического вещества, насыщенного ферментным пулом, и способной за счет этого пула очищаться, биологические процессы в необработанном варианте лишь ненамного отличается от биологических процессов вариантов, обработанных биодобавками. Это видно по изменению GMea (рис. 1). Следовательно, 5% и 15% нефтяная нагрузка для данной почвы незначительна и не требует внесения препаратов.



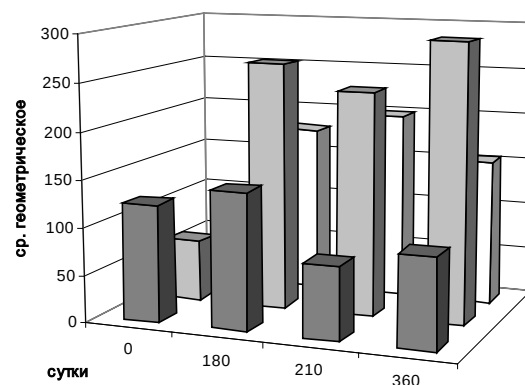
а)



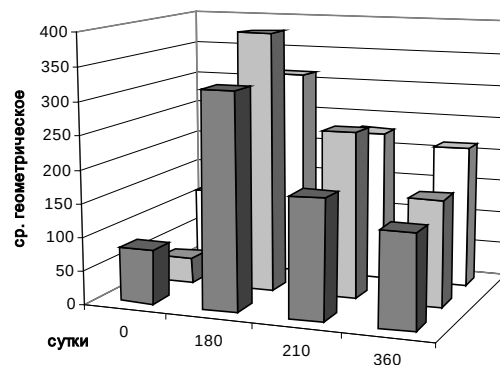
б)



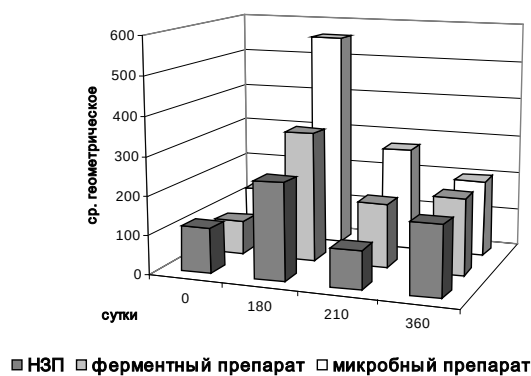
в)



г)



д)



е)

Рис. 1. Среднее геометрическое ферментативной активности: глинистая почва а) нефти 50 мг/г, б) нефти 150 мг/г; песчаная почва в) нефти 50 мг/г, г) нефти 150 мг/г; торфяная почва д) нефти 50 мг/г, е) нефти 150 мг/г

Внесение биодобавок увеличивает GMea для глинистой и песчаной почвы. При 5% и 15% нефтяном загрязнении в глинистой почве биологические процессы наиболее активно протекают

в почве варианта с внесением как ферментного, так и микробного препаратов (рис. 1). Всплеск биологической активности приходится на после-морозный период. В песчаной почве в течение всего опыта показатель GMea выше в почве, обработанной ферментным препаратом. Об активизации процессов биоразложения нефти свидетельствуют данные по содержанию остаточных нефтепродуктов в почве, представленные в табл. 2. В почвенных вариантах необработанных и обработанных биодобавками к концу исследований происходит снижение концентрации нефтепродуктов. При обработке почвы ферментным и микробным препаратами степень снижения в глинистой и торфяной почве примерно одинаковая и составляет 82-91% (начальное загрязнение 50 мг/г) и 81-86% (начальное загрязнение 150 мг/г). Обработка песчаной почвы (начальное загрязнение 150 мг/г) дает различные результаты: при внесении ферментного препарата степень очистки составляет 87%, микробного – 54%.

Таблица 2. Содержание нефтепродуктов в почве

Почва	Содержание нефтепродуктов в почве, мг/г						
	1	2		3		4	
		50 мг/г	150 мг/г	50 мг/г	150 мг/г	50 мг/г	150 мг/г
глинистая	0,09±0,03	27,0±8,1	66,4±19,9	4,5±1,3	22,0±6,6	8,8±2,6	26,0±7,8
песчаная	0,81±0,24	44,1±13,2	78,0±23,4	14,1±4,2	20,0±6,0	14,9±4,5	69,0±20,7
торфяная	0,40±0,12	23,0±6,9	49,0±14,7	5,0±1,5	28,0±8,4	7,0±2,1	21,0±6,3

Примечание: 1 – контроль, 2 – НЗП, 3 – внесен ферментный препарат, 4 – внесен микробный препарат

Выводы: в результате проведенных исследований обнаружено, что внесенные в нефтезагрязненные почвенные образцы до начала зимнего периода микробный и ферментный препараты переносят длительное промерзание, с наступлением весеннего периода жизнеспособны и проявляют высокую активность в отношении трансформации углеводов нефти. Процессы очищения в нефтезагрязненных образцах почв без биопрепаратов отличаются большей длительностью в сравнении с процессами, проходящими в нефтезагрязненных и обработанных биодобавками почвенных образцах. Это можно проследить по изменению среднего геометрического показателя. При использовании микробного и ферментного препаратов возврат биохимических показателей к аналогичным показателям незагрязненной почвы происходит быстрее, чем в самоочищающейся почве. Средний геометрический показатель ферментативной активности показывает, что в условиях торфяной почвы нефтяная нагрузка до 15% незначительна и внесение биодобавок не требуется. В глинистой почве использование как ферментного, так и микробного препарата оценивается по среднему

геометрическому равнозначно. В условиях песчаной почвы ферментный препарат оказывается наиболее эффективным, чем микробный с учетом температурного фактора. Это подтверждается и снижением содержания нефтепродуктов в почве.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-4-4-014 Арктика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Габбасова, И.М. Использование биогенных добавок совместно с биопрепаратом «Деворойл» для рекультивации нефтезагрязненных почв / И.М. Габбасова, Р.Р. Сулейманов, Т.Ф. Бойко, Н.Ф. Галимзянова // Биотехнология. 2002. № 2. С. 57-65.
2. Murygina, V.P. Application of biopreparation «Rhoder» for remediation of oil polluted polar marshy wetlands in Komi Republic / V.P. Murygina, M.Y. Markarova, S.V. Kalyuzhnyi // Environment International. 2005. Vol. 31. P. 163-166.
3. Tang, J. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms / J. Tang, R. Wang, X. Niu, Q. Zhou // Soil and Tillage Research. 2010. Vol. 110, No. 1. P. 8-93.

4. Gong, X.B. Remediation of weathered petroleum oil-contaminated soil using a combination of biostimulation and modified Fenton oxidation // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012. Vol. 70. P. 89-95.
5. Dias, R.L. Bioremediation of an aged diesel oil-contaminated Antarctic soil: Evaluation of the "on site" biostimulation strategy using different nutrient sources / R.L. Dias, L. Ruberto, E. Hernández et al. // *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2012. Vol. 75. P. 96-103.
6. Chikere, C.B. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil / C.B. Chikere, G.C. Okpokwasili, B.O. Chikere // *3 Biotech*. 2011. Vol. 1. P. 117-138.
7. Габбасова, И.М. Оценка состояния почв с давними сроками загрязнения сырой нефтью после биологической рекультивации / И.М. Габбасова, Ф.Х. Хазиев, Р.Р. Сулейманов // *Почвоведение*. 2002. № 10. С. 1259-1273.
8. Казеев, К.Ш. Биология почв Юга России / К.Ш. Казеев, С.И. Колесников, В.Ф. Вальков. – Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 2003. 204 с.
9. Варфоломеев, С.Д. Химическая энзимология – М.: Академия, 2005. 480 с.
10. Научно-прикладной справочник по климату СССР. Сер. 3. Многолетние данные. Вып. 1. – Л., 1989. 484 с.
11. Атлас по климату гидрологии республики Коми. – М.: Дрофа, 1997. 116 с.
12. Хазиев, Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. 252 с.
13. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в пробах почв на анализаторе жидкости «Флюорат-02» ПНД Ф 16.1.21–98. – М., 1998. 15 с.
14. Gao, Y.C. Assessing the quality of oil-contaminated saline soil using two composite indices / Y.C. Gao, J. Wang, J. Xu et al. // *Ecological Indicators*. 2013. Vol. 24. P. 105-112.
15. Девятова, Т.А. Ферментативная активность как диагностический показатель экологического состояния почв / Т.А. Девятова, Т.Н. Крамарева // *Экология и биология почв. Матер. междунар. конф.* – Ростов-на-Дону: изд-во ООО «ЦБВР», 2004. С. 95-99.
16. Wang, Q. Land use effects on soil quality along a native wetland to cropland chronosequence / Q. Wang, J. Liu, Y. Wang et al. // *European Journal of Soil Biology*. 2012. Vol. 53. P. 114-120.

INFLUENCE OF MICROBIAL AND FERMENT PREPARATIONS ON PURIFICATION OF PETROPOLLUTED SOILS

©2013 T.N. Shchemelinina¹, M.Yu. Markarova¹, E.M. Anchugova¹, S.M. Nadezhkin²,
L.G. Emelyanova³

¹ Institute of Biology of Komi Scientific Center URO RAS, Syktyvkar

² All-Russia Scientific Research Institute of Selection and Seed Farming
of Vegetable Cultures, Moscow region

³ Republican Center of Ensuring the Functioning of Especially Protected
Natural Territories and Nature Management, Syktyvkar

Research on assessment the influence of oil pollution on properties of various types of soils and their purification by means of microbial and ferment preparations is conducted. Influence of biological preparations on change the enzymatic activity of the petropolluted soils after the long-lived congelation period is shown.

Key words: oil pollution, microbial preparation, ferment preparation, enzymatic activity, soils purification

Tatiana Shchemelinina, Candidate of Biology, Research Fellow. E-mail: shchemelinina@ib.komisc.ru

Mariya Markarova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: markarova@ib.komisc.ru

Elena Anchugova, Leading Engineer. E-mail: anchugova@ib.komisc.ru

Sergey Nadezhkin, Doctor of Biology, Professor, Head of the Laboratory of Agrochemical Methods of Selection. E-mail: nadezs@yandex.ru

Larisa Emelyanova, Head of the Ecological Examination Department. E-mail: lora1104@rambler.ru