

УДК 631.45

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОГО ГРУНТА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ КРИОГЕЛЯ

© 2014 О.В. Гарайзуева, А.И. Фахрутдинов, Т.Д. Ямпольская

Сургутский государственный университет ХМАО-Югры

Поступила в редакцию 12.05.2014

В лабораторном эксперименте определена биологическая реакция естественной и нарушенной почвенной системы при применении криогеля в качестве криопротектора. Выяснено отсутствие значимой количественной и качественной физиологической реакции тест-культуры вне зависимости от концентрации криогеля на фоне различного нефтяного загрязнения. Изменение объемов микробной биомассы зафиксировано при сходных концентрациях криогеля и нефти 20%. Во всех остальных вариантах динамика микробной массы неоднозначна.

Ключевые слова: *криогель, криопротектор, нефтяное загрязнение, тест-культура, микробная масса*

Усиление техногенного давления на окружающую среду требует создания новых подходов и технологий восстановления нарушенных биологических систем. Ведущее место занимает загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами. Существующие биологические технологии обеспечивают высокие результаты снижения содержания остаточной нефти лишь в благоприятных биоклиматических условиях. В условия Крайнего Севера вегетационный период составляет 500-600 часов и длится в период июня-августа. Помимо этого существуют аномально холодные или жаркие летние сезоны. Применение новых синтетических, полусинтетических и природных материалов позволит увеличить время активного действия биологических технологий восстановления нарушенных экосистем, расширяя возможность их применения в период с май по октябрь. Одними из возможных способов является использование криопротекторных гелей на основе органических кислот. Криогель формирует структуру при замораживании с образованием кристаллов растворителя, что приводит к вытеснению твердых частиц в пространство между ними и концентрированию суспензии. При замораживании коллоидных растворов концентрирование приводит к образованию геля. [1-3]. Институтом химии нефти СО РАН созданы промышленные технологии на основе криогелей для увеличения нефтеотдачи пластов [4-6].

Гарайзуева Ольга Викторовна, младший научный сотрудник. E-mail: olga-garajzueva@yandex.ru

Фахрутдинов Айвар Инталович, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии. E-mail: fachrutdinov_a_i@mail.ru

Ямпольская Татьяна Даниловна, кандидат биологических наук, доцент. E-mail: yampolska0105@mail.ru

Разработаны методы получения новых форм криогелей для создания противотракторных завес в гидротехнических сооружениях, расположенных в районах Севера и вечной мерзлоты [7-9]. Криогели находят применение в медицинской биотехнологии, стоматологии, косметологии [10-16].

Предложен новый химико-биологический метод предотвращения эрозии почв с применением криогеля в комплексе с многолетними травами. Показано, что криогель не оказывает негативного влияния на аборигенную почвенную микрофауну, не препятствует росту растений, с образованием устойчивого зеленого покрова [17]. Перспективными носителями для иммобилизованных ферментов являются криогели поливинилового спирта (КГПВС) – макропористые вязкоупругие полимерные гелевые материалы, получаемые в результате криогенной обработки. Образующиеся криогели обычно имеют макропористую (от 0,1 до 10 мкм) и сверхмакропористую структуры (от 10 до 1000 мкм) с взаимосвязанными порами, что придает таким материалам уникальный набор физико-химических свойств, а также позволяет использовать их для решения ряда биомедицинских и биотехнологических задач [18, 19]. КГПВС были использованы в качестве носителей для ковалентного присоединения белков ферментов при получении макропористых сорбентов ряда иммобилизованных биокатализаторов, предназначенных для ферментолиза очень высокомолекулярных субстратов или для работы в маловодных средах [20-24].

Цель исследования: формирование биологической активной среды почвенной системы с использованием криопротекторного геля в условиях нефтяного загрязнения.

Для выяснения протекающих процессов заложен лабораторный эксперимент с различными уровнями нефтяного загрязнения и внесения криогеля (табл. 1). В заложенном эксперименте использовался образец дерно-подзолистой почвы, отобранной в Сургутском районе, имеющий следующие характеристики: рН 5,2, гидролитическая кислотность (Нг) – 1,9 мг экв/100 г почвы, емкость обменных оснований (S) – 12,6 мг экв/100 г почвы, общий азот (N_{общ}) 2,9 мг, подвижный фосфор (P₂O₅) – 17,2 мг. Вносилась нефть товарная Западно-Сургутского месторождения. В исследовании использовался криогель

Р, ТУ 2454-011-03534067-2013, производитель: ИХН СО РАН, г. Томск. В качестве углеводородоокисляющих микроорганизмов применены штаммы бактерий *Pseudomonas monteilli* ВКМ В2681D и *Kocoria sp.* ВКМ Ас-2606D, с титром $2,9 \times 10^8$ клеток на мл. Отбор образцов для исследования производился до и после замораживания образцов. Биомасса микроорганизмов в почве определялась регидратационным методом [25, 26]. Биотестирование определялось методом проращивания овса посевного (*Аvéна satíva*) в качестве тест-культуры. Учитывался процент всхожести и длина надземной и подземной частей [27]. Статистическая обработка данных выполнена в Microsoft Excel 2010.

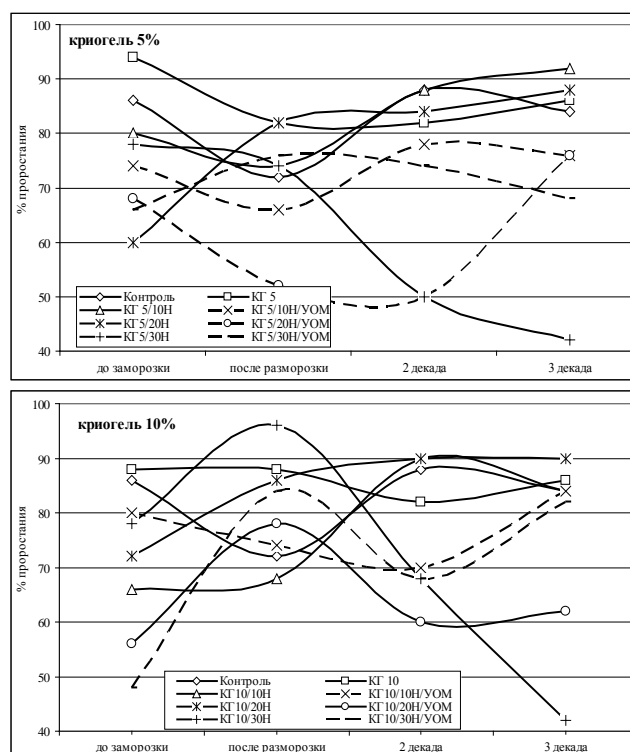
Таблица 1. Уровни нефтяного загрязнения и внесения криогеля

Варианты	5% криогель	10% криогель	20% криогель
1	контроль	контроль	контроль
2	10% Н	10% Н	10% Н
3	10% Н +УОМ	10% Н +УОМ	10% Н +УОМ
4	20% Н	20% Н	20% Н
5	20% Н +УОМ	20% Н +УОМ	20% Н +УОМ
6	30% Н	30% Н	30% Н
7	30% Н +УОМ	30% Н +УОМ	30% Н +УОМ

Оценка количества проросших семян тест-культуры позволяет говорить о целостном влиянии токсических веществ, как положительном, и так отрицательном, на физиологические процессы формирования плодородия (рис. 1) Увеличение концентрации криогеля приводит к снижению энергии прорастания в вариантах использования УОМ, что вызвано антагонизмом внесенной микрофлоры с прорастающей тест-культурой. При высоком уровне нефтяного загрязнения (30%), отмечается различная динамика физиологической активности при 10% и 20% внесении криогеля, что объясняется действием криогеля на границе загрязненная почва – биологический объект. При оценке изменения процента прорастания с увеличением углеводородного загрязнения также отмечается антагонистическое действие в вариантах с УОМ. Во всех вариантах лабораторного эксперимента, четкого и однозначного криопротекторного действия по отношению к контрольному варианту не выявлено.

Формирование подземной и надземной частей тест-культуры происходит при влиянии различных компонентов и элементов грунта (рис. 2). Воздействие криогеля в различных концентрациях и сочетаниях с УОМ в разной степени отражает физиологическую реакцию семян. Увеличение концентрации криогеля не оказывает

влияние на развитие надземной части, и в динамике реакция схожа с контрольными вариантами. В вариантах с УОМ выявлены наиболее низкие значения.



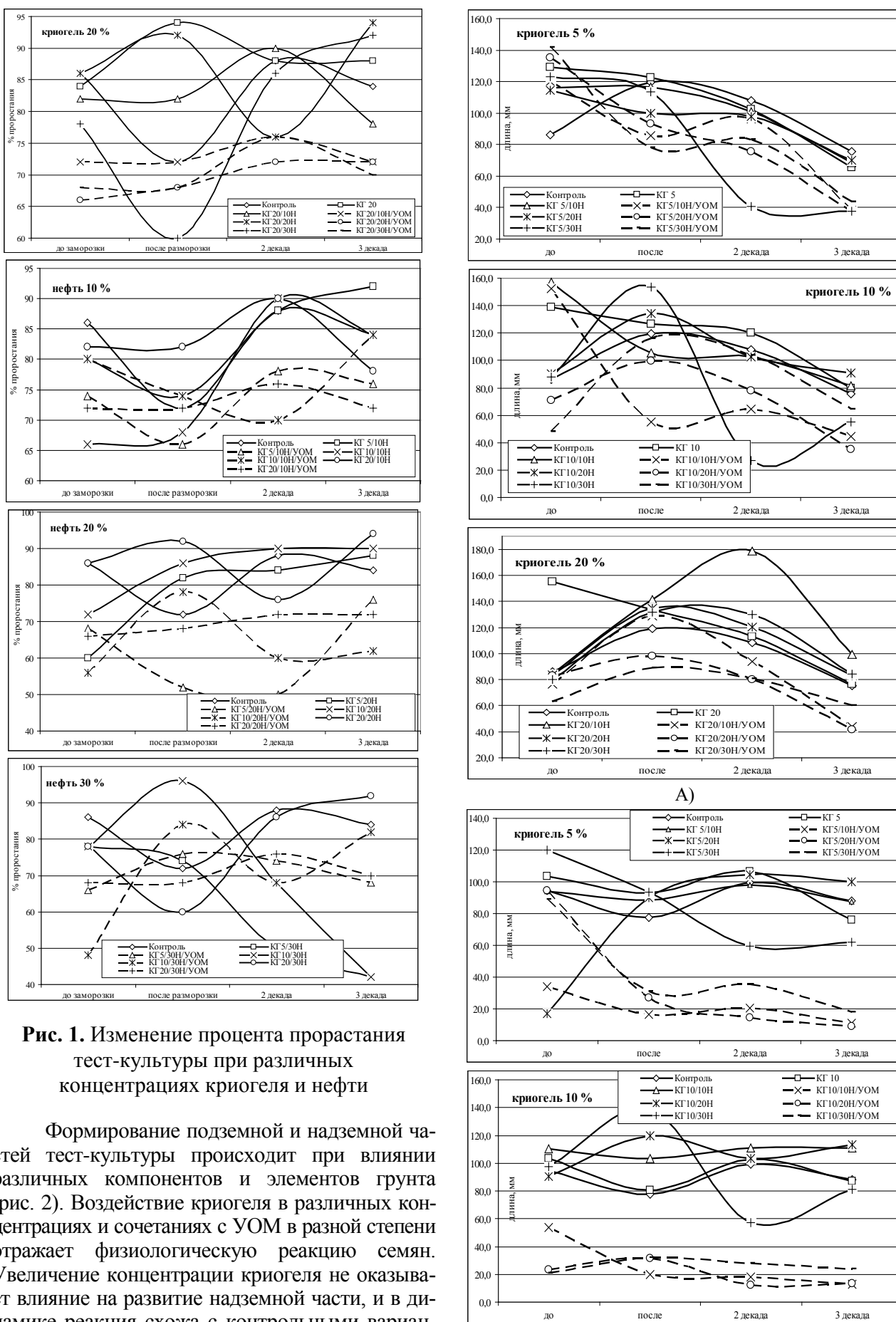
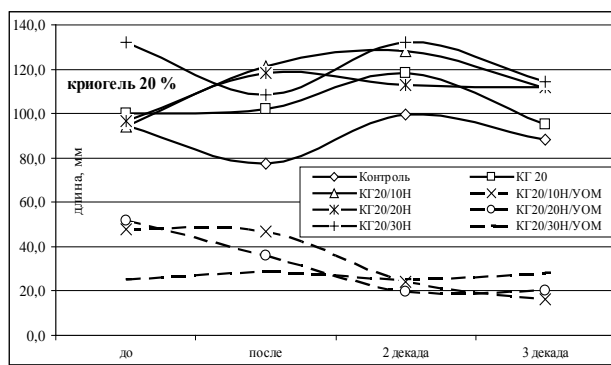


Рис. 1. Изменение процента прорастания тест-культуры при различных концентрациях криогеля и нефти

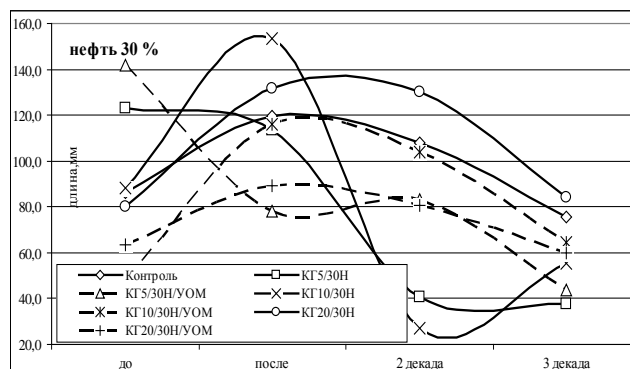
Формирование подземной и надземной частей тест-культуры происходит при влиянии различных компонентов и элементов грунта (рис. 2). Воздействие криогеля в различных концентрациях и сочетаниях с УОМ в разной степени отражает физиологическую реакцию семян. Увеличение концентрации криогеля не оказывает влияние на развитие надземной части, и в динамике реакция схожа с контрольными вариантами. В вариантах с УОМ выявлены наиболее низкие значения.



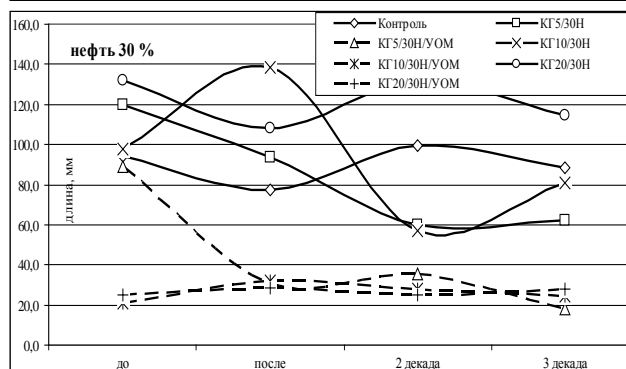
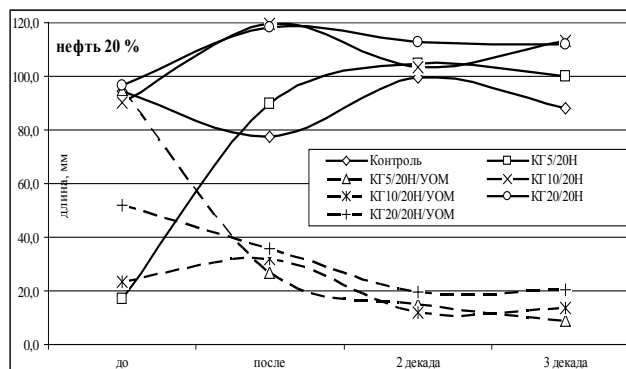
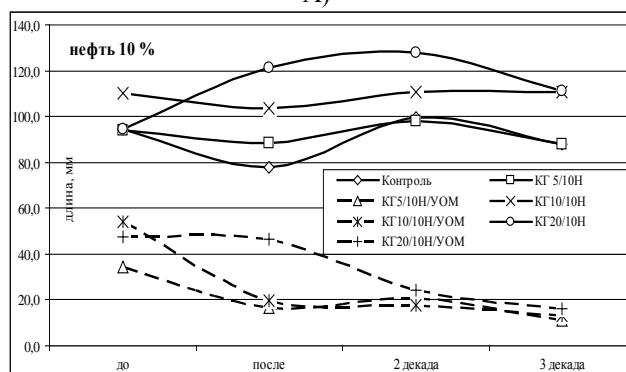
Б)

Рис. 2. Изменение длины тест-культуры при различных дозах внесенного криогеля: А) надземная часть, Б) подземная часть

Развитие подземной части семян тест-культуры в значительной степени повторяет вышеописанную тенденцию: наблюдается глубокий антагонизм почвенной системы по отношению к внесённым культурам УОМ. Анализ реакции надземной и подземной частей текст-культур при различных концентрациях нефти показывает значимый криопротекторный эффект в различных вариантах использования криогеля (рис. 3). Наилучшая динамика выявлена при сочетании внесения 20% криогеля и 20% углеводородного загрязнения.

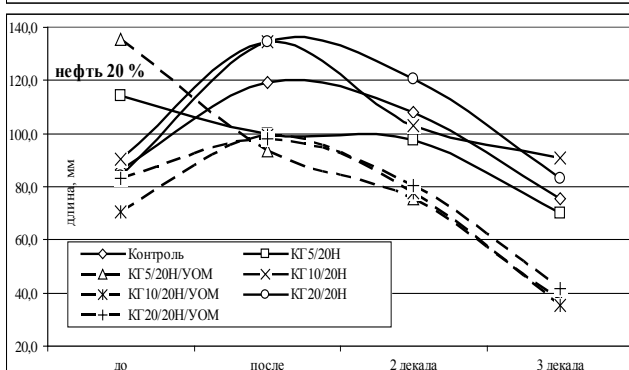
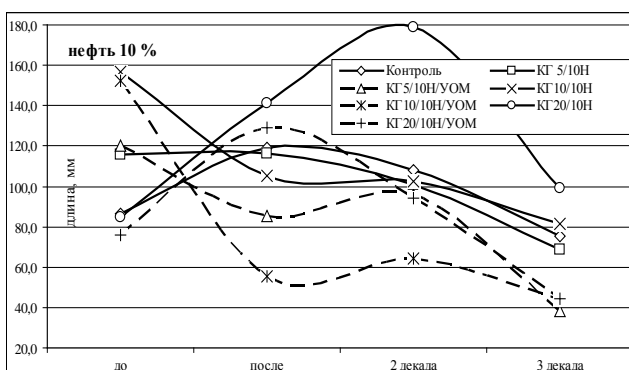


А)



Б)

Рис. 3. Изменение длины тест-культуры при различных дозах внесения нефти: А) надземная часть, Б) подземная часть

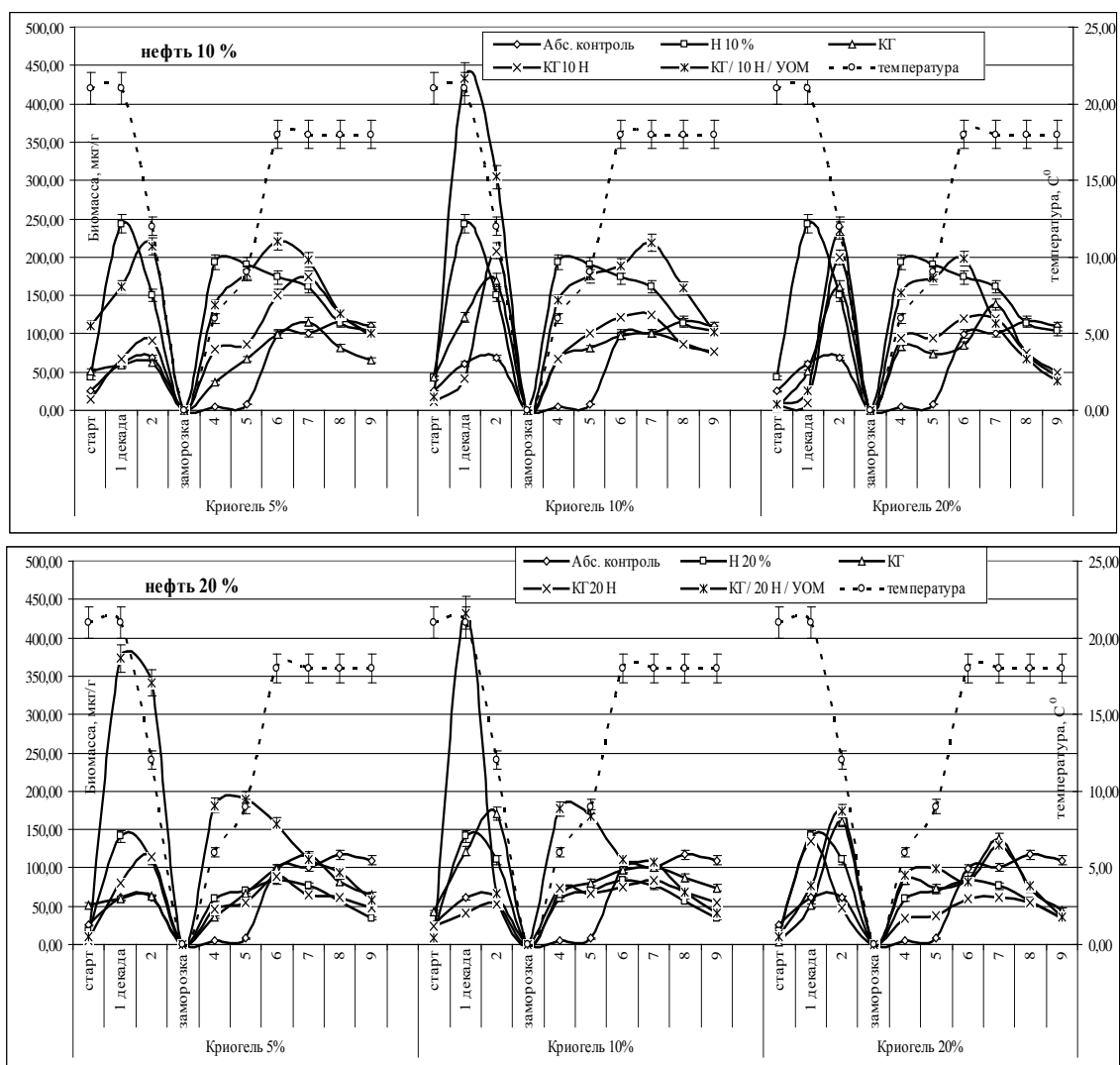


Реакция почвенной системы на различные внесённые компоненты вызвали разнообразную и разнонаправленную динамику биологической активности, что позволяет говорить о стремлении сформированной экосистемы к стабильности независимо от температуры среды. Наибольшие значения при 10% нефтяном загрязнении

определено при 10% внесении криогеля в варианте с углеводородокисляющими микроорганизмами, но при снижении температуры среды происходит снижение этого показателя. В данном варианте криогель выступает как основа для развития микроорганизмов и сохранности ферментов, деструктурирующих углеводороды (рис. 4). Нефтяное загрязнение (10%) выступает как активный стимулятор биологических и биохимических процессов, но снижение температуры среды угнетает эти процессы в почвенной системе. В других вариантах криогель поддерживает развитие биологической активности при различных температурах среды жизнедеятельности почвенной системы. Нефтяное загрязнение (20%) также выступает как стимулятор биологических и биохимических процессов, но в 10 раз ниже, чем при 10% дозе нефти. Снижение температуры среды также угнетает эти процессы в почвенной системе. Увеличение дозы нефтяного загрязнителя (20%) выявляло резкий рост биологической активности при 5 и 10 % использования криогеля в вариантах с УОМ. Снижение температуры среды с 25 до 12 C⁰ определило

снижение данного показателя, в особенности в варианте с 10% дозой криогеля. Это вызвано физико-химическим антагонизмом углеводородов нефти и криогеля, что не обеспечивает сохранения жизнедеятельности микроорганизмов и активности ферментов. В оставшихся вариантах криогель поддерживает развитие биологической активности при различных температурах среды жизнедеятельности почвенной системы, но на порядок ниже, чем при 20% нефтяном загрязнении.

Увеличение дозы внесенного криогеля по направлению 5% → 10% → 20%, в вариантах без нефтяных углеводородов увеличивает биологическую активность при снижении температуры среды жизнедеятельности. Высокий уровень углеводородного загрязнения (30%) снижает значения уровня биологической активности во всех вариантах эксперимента. На момент 3 декады эксперимента, в варианте только с нефтью, значения приближались к нулевым, что вызвано токсическим действием и ухудшением водного и воздушного режимов почвы.



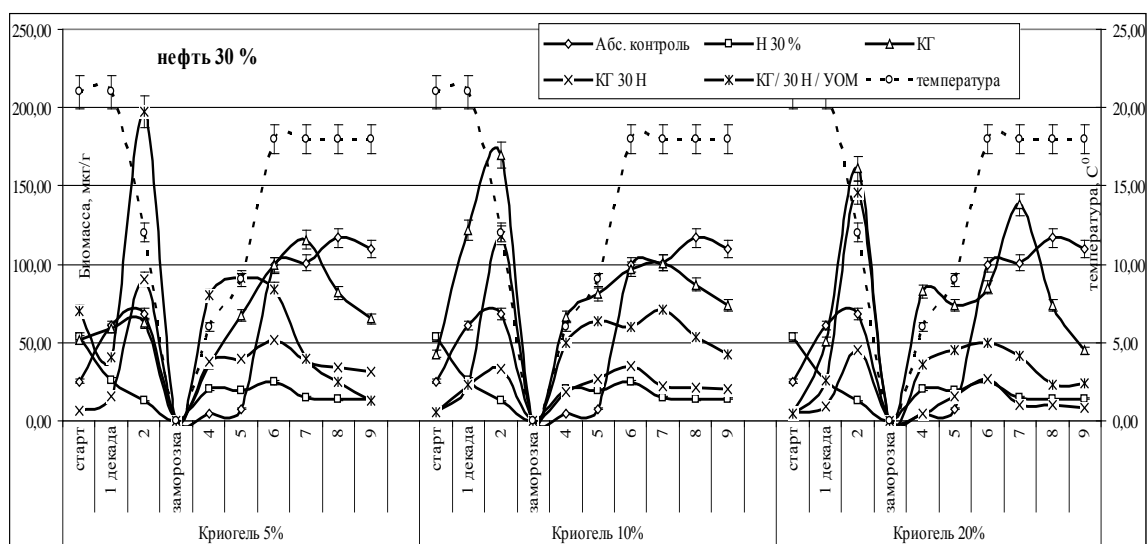


Рис. 4. Динамика микробной биомассы в вариантах с различным содержанием криогеля и нефти

Совместно действие криогеля и нефти, независимо от концентрации и внесенных углеводородокисляющих микроорганизмов вызвало увеличение биологической активности почвенной системы даже при понижении температуры среды. Этому способствует действие криогеля как криопротектора, способного создавать благоприятные зоны жизнедеятельности микроорганизмов на границе взаимодействия углеводородов нефти и криогеля. Подобное протекание биологических процессов позволяет говорить о формировании искусственного почвенного агрегата, с присущими естественному почвенному агрегату свойствами и функциями, а именно: формирование условий протекания различных анаэробных и аэробных окислительно-восстановительных реакций, биологического и минерального характера.

Выводы: применение различных доз криогеля повышает уровень биологической активности в естественных и загрязненных нефтью почвах, выступая в качестве носителя микроорганизмов и ферментов или криопротектора. Увеличение уровня нефтяного загрязнения вызывает изменение биологической активности почвы, от стимулирующего, при 10% нефти, до угнетающего при 30%, вне зависимости от температуры среды. Использование метода определения биологической активности почв регидратационным методом позволяет объективно оценить весь объем протекающих процессов как в естественной, так и в нарушенной почвенной системе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Шляхтин, О.А. Криогель / Словарь нанотехнологических и связанных с нанотехнологиями терминов – Режим доступа: <http://thesaurus.rusnano.com/wiki/article2153> – Заглавие с экрана (дата обращения 23.04.2014)

2. Лозинский, В.И. Криогели на основе природных и синтетических полимеров: получение, свойства и области применения // Успехи химии. 2002. Т. 71. С. 559.
3. Савин, И.Н. Наполненные криогели поливинилового спирта: получение, влияние свойств дисперсной фазы, применение Савина, И. Н. Автореф. диссерт. – М., 2003. 156 с.
4. Алтунина, Л.К. Криогели для тампонажных работ в гидротехнических сооружениях районов севера и вечной мерзлоты / Л. К. Алтунина, В. А. Кувшинов – Режим доступа: <http://www.ipc.tsc.ru/proekts/1/8/>. – Заглавие с экрана (дата обращения 21.04.2014)
5. Криотропные полимерные материалы (криогели) Патент Вьетнама № 3045, Заявл.24.02.98, ИХН СО РАН, «Состав для повышения нефтеотдачи пластов». Заявка № S19990621 2. Патент Китая № ZI 98 8 01954.x, № CN 1088141C., Заявл. 24.02.98, ИХН СО РАН, «Состав для повышения нефтеотдачи пластов», Заявка № 98801954x. – Режим доступа: <http://inotomsk.ru/products/kriotropnye-polimernye-materialy-kriogeli/>. – Заглавие с экрана (дата обращения 22.04.2014)
6. Алтунина, Л.К. Спасти вечную мерзлоту / Л.К. Алтунина, В.А. Кувшинов – Режим доступа: http://www.evenkya.ru/infoeg/life/spasti_vechnuyu_merzlotu.html – Заглавие с экрана (дата обращения 21.04.2014)
7. Лабунский, А. Криогели помогают строить в вечной мерзлоте – Режим доступа: <http://www.nkj.ru/news/22634/> – Заглавие с экрана (дата обращения 23.04.2014)
8. Гибкий изоляционный материал для применения при низких и криогенных температурах – Режим доступа: http://www.cryogel_10201_DS_12_11x85.ru – Заглавие с экрана (дата обращения 25.04.2014)
9. Криогель заживляет раны и дозирует лекарства – Режим доступа: <http://www.2045.ru/news/30863.html> – Заглавие с экрана (дата обращения 23.04.2014)

10. Орехова, Л.Ю. Использование пролонгированных медикаментозных форм при лечении заболеваний пародонта / Л.Ю. Орехова, В.И. Калинин, Т.В. Кудрявцева – Режим доступа: <http://www.fesmu.ru/elib/Article.aspx?id=17019> – Заглавие с экрана (дата обращения 23.04.2014)
11. Криогель-антицеллюлит «Faberlic» – Режим доступа: <http://faberlic-natali.okis.ru/sell.17874.html> – Заглавие с экрана (дата обращения 23.04.2014)
12. Алтунина, Л.К. Метод защиты почв от эрозии с применением криогелей и многолетних трав / Л.К. Алтунина, М.С. Фуфаева, Д.А. Филатов и др. // Вестник Томского государственного педагогического университета. 2012. №7. С. 177-182.
13. Спиричева, О.В. Биокаталитические системы на основе иммобилизованных клеток *Rhizopus oryzae*. Автореф кандидат. диссерт. – М., 2006. 160 с.
14. Шаскольский, Б.Л. Композитные иммобилизованные биокатализаторы с частицами ферментных препаратов, включенных в матрицу криогеля поливинилового спирта : диссертация ... канд. хим. наук. – М., 2009. 136 с.
15. Мартыненко, Н.Н. Разработка технологии получения хитиновых олигосахаридов и применения их для интенсификации процессов культивирования дрожжей: Диссертация ... докт. биол. наук. – Кашинцево, 2009. 414 с.
16. Шаскольский, Б.Л. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. Композитные иммобилизованные биокатализаторы с частицами ферментного препарата, включенного в матрицу криогеля поливинилового спирта / Б.Л. Шаскольский и др. // Биотехнология. 2009. № 1. С.71-83.
17. Лозинский, В.И. Применение криогелей поливинилового спирта в биотехнологии. Сверхмакропористые носители для иммобилизации молекул / В.И. Лозинский, Ф.И. Плиева, А.Л. Зубов // Биотехнология. 1995. Т 1-2. С. 32-38.
18. Беляева, А.В. Протеиназы, иммобилизованные на криогеле поливинилового спирта, как катализаторы пептидного синтеза в органической среде: Автореф канд. дисс. – М., 2006. 197 с.
19. Степанов, Н.И. Применение клеток дрожжей и мицелиальных грибов, иммобилизованных в криогель поливинилового спирта, для получения этанола из различного сырья / Н.И. Степанов и др. // 4-й Межд. Моск. конгресс «Биотехнология: Состояние и перспективы развития. 2007». – М., 2007. 308 с.
20. Методы почвенной микробиологии и биохимии. Учеб. пособие / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во МГУ, 1991. 304 с.
21. Звягинцев, Д.Г. Биология почв / Д.Г. Звягинцев, И.П. Бабьева, Г.М. Зенова. – М.: Изд-во: МГУ, 2005. 448 с.
22. Мелехова, О.П. Биологический контроль окружающей среды: биоиндикация и биотестирование: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / О.П. Мелехова, Е.И. Егорова, Т.И. Евсеева и др.; под ред. О.П. Мелеховой и Е.И. Егоровой. – М.: Издательский центр «Академия», 2007. 288 с.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF PETROPOLLUTED SOIL WHEN USING CRYOGEL

© 2014 O.V. Garayzuyeva, A.I. Fakhрутdinov, T.D. Yampolskaya

Surgut State University of Khanty-Mansi Autonomous District-Yugra

In laboratory experiment biological reaction of the natural and broken soil system at using cryogel as cryoprotector is defined. Lack of significant quantitative and qualitative physiological reaction of test-culture regardless of concentration of cryogel against various oil pollution is found out. Change of microbial biomass volumes is recorded at similar concentration of cryogel and naphtha of 20%. In all other variants the dynamics of microbial mass is ambiguous.

Key words: *cryogel, cryoprotector, oil pollution, test-culture, microbial mass*

Olga Garayzuyeva, Minor research Fellow. E-mail:

olga-garayzuyeva@yandex.ru

Ayvar Fakhрутdinov, Candidate of Biology, Associate

Professor at the Microbiology Department. E-mail:

fakhрутdinov_a_i@mail.ru

Tatiana Yampolskaya, Candidate of Biology, Associate

Professor. E-mail: yampolska0105@mail.ru