

Т.М. Ногина, Т.У. Думанская, Л.А. Хоменко, В.С. Подгорский

*Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины,
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА «ЭКОЛАН-М» ДЛЯ ОЧИСТКИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ ПОЧВЫ

Исследована эффективность очистки препаратом «Эколан-М» загрязненного нефтью чернозема суглинистого. В течение 12 месяцев комплексная биоремедиация почвы с использованием препарата и люцерны в качестве фитомелиоранта на завершающем этапе очистки привела к уменьшению содержания углеводов до 97,0 %, а в отсутствие препарата – на 65,5 %. При этом в варианте опыта с препаратом через 8 месяцев достигнуто 100 % снижение фитотоксичности почвы и наблюдалось значительное стимулирование роста и развития растений. Процесс очистки почвы сопровождался интенсивным развитием углеводородокисляющих микроорганизмов, количество которых по мере снижения концентрации нефти постепенно уменьшалось, приближаясь к уровню в контрольной незагрязненной почве.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, углеводородокисляющие микроорганизмы, актинобактерии, биоремедиация, фитотоксичность.

Нефть и нефтепродукты признаны в настоящее время наиболее распространенными антропогенными факторами загрязнения окружающей среды [8, 11]. Высокое содержание этих веществ в почве нарушает экологическое равновесие природных ландшафтов, изменяет биологические и агрохимические свойства почвы – повышает гидрофобность, уменьшает аэрацию, отрицательно влияет на азотный, фосфорный и углеводный обмен, замедляет развитие или вызывает гибель почвенной флоры и фауны [5, 17]. Все это приводит к отчуждению загрязненных земельных угодий из сельскохозяйственного оборота, которые становятся практически непригодными для земледелия.

Наиболее эффективными и экологически безопасными являются биологические методы очистки окружающей среды от нефтяных загрязнений, в которых решающее значение имеет активность комплекса углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ). Искусственное внесение (интродукция) чистых или смешанных культур УОМ в загрязненную среду и создание благоприятных условий для их развития позволяет сократить сроки биоремедиации в пять и более раз [8]. Следует отметить, что деструкция нефти и нефтепродуктов в природных условиях является сложным многофакторным процессом, на который оказывают влияние состав, концентрация и продолжительность действия загрязнителя, многообразие и изменчивость почвенно-климатических условий и биологических характеристик экосистемы, а также другие факторы. Это объясняет необходимость адаптации биоремедиационных технологий к конкретным условиям на загрязненной территории.

Целью данной работы было определение эффективности использования препарата «Эколан-М» для очистки загрязненной нефтью почвы.

Материалы и методы. Биоремедиацию загрязненной нефтью почвы (чернозем суглинистый) проводили в условиях полевого эксперимента с использованием разработанного нами ранее препарата «Эколан-М», который включает иммобилизованные на нефтепоглощающем сорбенте углеводородокисляющие актинобактерии и биогенные добавки. Экспериментальная площадка была разделена на 3 части, каждая из которых состояла из 2-х отделенных друг от друга участков, площадью 1 м² каждый (рис. 1). Перед началом проведения работ почву перекапывали на глубину 10–15 см, увлажняли до 60 % от полной влагоемкости почвы, поддерживая ее на таком уровне в течение вегетационного опыта. На участки 1–4 вносили нефть в количестве 20 г/кг почвы, что в 5 раз превышает принятую в Украине норму ориентировочно допустимой концентрации (ОДК) нефти в почве [2].

| <u>Участки 1, 2 (Опыт)</u> | <u>Участки 3, 4 (Контроль)</u> | <u>Участки 5, 6 (Контроль)</u> |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| Нефть Препарат Минеральное удобрение Известь | Нефть | Незагрязненная почва |

Рис. 1. Схема полевого эксперимента

Для оптимизации соотношения углерода (С) и азота (N), нарушенного вследствие загрязнения углеводородами, в почву вносили 625 г на 1 м² минерального удобрения нитроаммофоски из расчета, что рекомендуемое соотношение С:N для нормального роста и развития нефтеокисляющих микроорганизмов в загрязненной среде составляет 100:5 [13]. При этом 1/3 от общего количества удобрения была внесена сразу, а остальные 2/3 – через две недели при повторной обработке почвы препаратом. С целью поддержания нейтрального значения рН среды в процессе окисления углеводородов в почву добавляли известь в количестве 2 г/кг почвы. Препарат вносили на загрязненные участки в таком количестве, чтобы численность УОМ составила не менее 10⁶ клеток/г почвы. В качестве контроля использовали загрязненную и незагрязненную почву, в которую не добавляли препарат и другие ингредиенты.

Всего биоремедиация включала 3 периода: I – умеренно теплый период продолжительностью 3 месяца (август – октябрь), в течение которого проводилась агротехническая обработка почвы на 1 и 2 участках; II – холодный период продолжительностью 6 месяцев (ноябрь–апрель), когда не проводилась обработка почвы; III – теплый период продолжительностью 3,5 месяца (май – август), в течение которого проводилась фиторемедиация почвы путем выращивания люцерны (*Medicago sativa L.*). Основной целью продолжения эксперимента в холодный и последующий теплый период была оценка возможности протекания процесса деструкции углеводородов при низких температурах и максимальное снижение количества остаточных углеводородов в почве.

Отбор и подготовку образцов почвы для анализа проводили по стандартным методикам [7]. Количество УОМ исследовали на жидкой минеральной среде Бердичевской [1] с использованием метода десятикратных предельных разведений с применением для пересчета таблиц Мак-Креди [14]. Содержание углеводородов определяли на анализаторе нефтепродуктов АН-1 с предварительной их экстракцией четыреххлористым углеродом [12]. Фитотоксичные свойства почвы изучали по приросту биомассы надземной части и корней, а также, по общей массе тест-растения кукурузы (*Zea mays L.*) сорта Брусница [18]. Контролем служила чистая почва.

Все опыты выполняли в трех повторностях, статистическую обработку данных проводили с использованием компьютерной программы Microsoft Office Excel 2003.

Результаты и их обсуждение. Исследование фракционного состава использованной в работе сырой нефти (плотность 0,88 г/мл) показало, что она содержала 63,9 % парафино-нафтеновой, 32,2 % ароматической и 3,9 % смолисто-асфальтеновой фракции углеводородов.

Установлено, что геохимический фон (кларк) углеводородов в контрольной незагрязненной нефтью почве составлял 0,56 г/кг. Это незначительно превышает кларк углеводородов в почвах европейских стран (0,01–0,5 г/кг почвы), однако ниже, чем в крупных городах Украины (1–3 г/кг) и на территориях, прилегающих к предприятиям переработки и добычи нефти, где фон достигает 6 г/кг почвы [16]. Согласно предложенным для черноземной зоны Украины градации загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами [3, 16] использованная нами в работе концентрация нефти 20 г/кг почвы соответствует сильному уровню загрязнения.

Изучение динамики деструкции углеводородов на загрязненных участках показало, что уже через 15 суток после начала эксперимента уровень деструкции нефти препаратом «Эколан-М» достиг значения 34,3 %, что в 5,5 раз превышало показатели варианта опыта без препарата, где проходили процессы самоочистки почвы аборигенными нефтеокисляющими микроорганизмами (рис. 2). В конце первого периода эксперимента (август – октябрь) эффективность деструкции углеводородов при использовании препарата достигла 75,6 %, что соответствовало снижению уровня загрязнения с 20 г/кг до 4,9 г/кг, то есть имело близкое к ОДК значение. При этом в почве без препарата уровень деструкции углеводородов был значительно ниже (30,4 %).

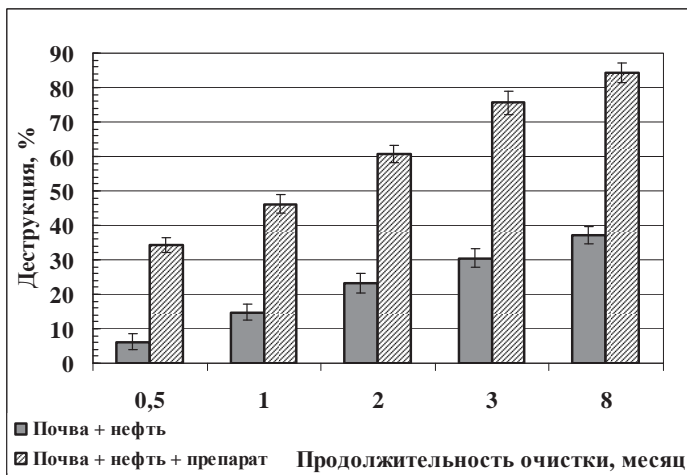


Рис. 2. Динамика деструкции нефти в течение 8 месяцев (август – март) в черноземе суглинистом.

Дальнейшие наблюдения показали, что процесс разложения углеводородов частично продолжался и в холодный период года (ноябрь – март). За это время концентрация нефти в почве, где использовался препарат, уменьшилась на 8,7 %, а содержание углеводородов в ней (3,1 г/кг почвы) было в 1,3 раза ниже ОДК, но превышало их фоновое количество в 5,6 раза. Таким образом, за первые два периода эксперимента уровень деструкции углеводородов при использовании препарата достиг 84,3 % (рис. 2). В отличие от этого, в почве без препарата деструкция углеводородов протекала значительно медленнее и составила всего 37,2 %, что соответствовало содержанию остаточных углеводородов 12,6 г/кг почвы.

Анализ динамики численности УОМ в почвах всех вариантов опыта показал, что начальное количество этих микроорганизмов в незагрязненной почве составляло $7,2 \times 10^4$ клеток/г почвы. При внесении препарата в загрязненную почву численность УОМ в ней достигла значения $2,1 \times 10^6$ клеток/г почвы (рис. 3).

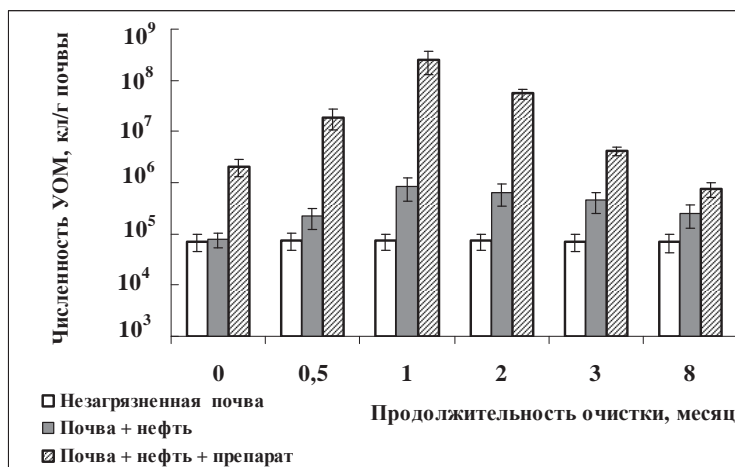


Рис. 3. Численность углеводородоокисляющих микроорганизмов в почве при ее биоремедиации.

Наибольшее количество УОМ в загрязненной почве как при использовании препарата, так и без него наблюдалась через 1 месяц от начала эксперимента и составляла $3,3 \times 10^8$ и $8,5 \times 10^5$ клеток/г почвы, соответственно. По мере снижения содержания нефти численность УОМ в почве, где использовался препарат, постепенно уменьшалась, приближаясь к значению в незагрязненной почве, исключая тем самым возможность побочного негативного явления

интродукции – дополнительного микробного загрязнения окружающей среды. Полученные нами данные согласуются с представленными в литературе результатами изучения процессов биоремедиации нефтезагрязненных почв и их влияния на развитие углеводородоксиляющих микробных сообществ [11, 15].

Известно, что одним из основных критериев пригодности очищенной от нефти и нефтепродуктов почвы для сельскохозяйственного использования является уровень ее фитотоксичности [5, 6]. При этом следует отметить, что негативное влияние углеводородов нефти на рост и развитие растений обусловлено не только непосредственным токсическим действием этих веществ, но и нарушением водного режима почвы, главным образом из-за увеличения ее гидрофобности и снижения влагоемкости [8, 17]. Установлено, что в условиях нашего эксперимента внесение нефти уменьшало влагоемкость почвы на 46,5 % относительно незагрязненной почвы (рис. 4).



Рис. 4. Влияние нефтяного загрязнения на влагоемкость почвы.

В процессе биоремедиации по мере уменьшения содержания нефти, влагоемкость почвы в варианте опыта с препаратом постепенно возрастала и через 3 месяца приблизилась к значениям в контрольной незагрязненной почве. В отсутствие препарата этот показатель увеличивался более медленно, достигнув к 8 месяцам 45,0 %.

Тестирование загрязненной нефтью почвы по токсикологическим параметрам показало, что ее первоначальная фитотоксичность по отношению к тест-растениям кукурузы достигала 85,1 %. Через месяц после начала эксперимента почва еще обладала достаточно высоким уровнем фитотоксичности, что проявлялось, как в уменьшении всхожести семян кукурузы (рис. 5), так и в ингибировании прироста биомассы тест-растений (рис. 6). Установлено, что в варианте опыта, где вносился препарат, ингибирование прироста массы проростков кукурузы по сравнению с контрольной незагрязненной почвой было значительно меньшим (41,3 %), чем без препарата (65,3 %).

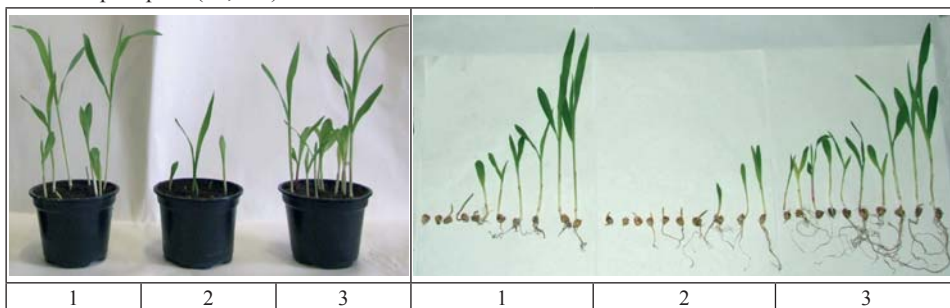


Рис. 5. Влияние загрязненной и очищенной препаратом в течение месяца почвы на прорастание семян кукурузы: 1 – почва + нефть + препарат; 2 – почва + нефть; 3 – незагрязненная почва.

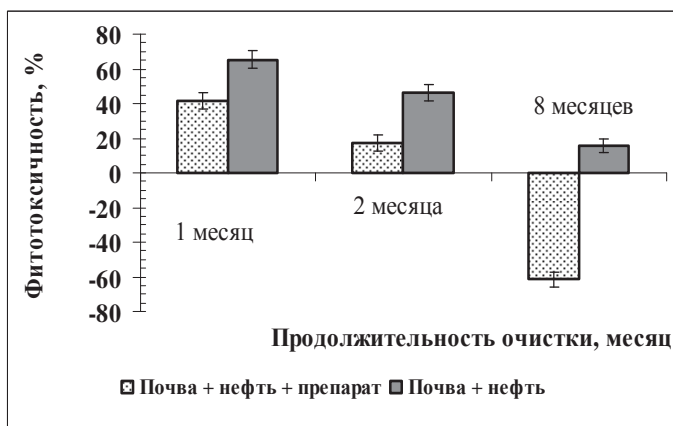


Рис. 6. Изменение фитотоксичности почвы в процессе ее биоремедиации.

Уже через 2 месяца в обработанной препаратом почве всхожесть семян сравнялась с аналогичными показателями незагрязненной почвы, а в варианте опыта без препарата всхожесть достигала значения 70,0 % от уровня в незагрязненной почве. При этом в почве с препаратом угнетение прироста биомассы тест-растений относительно незагрязненной почвы составило 17,5 %, а без препарата – 46,3 % (рис. 6).

В конце второго периода биоремедиации (через 8 месяцев от начала эксперимента) в загрязненной нефтью почве без препарата уровень фитотоксичности снизился до 15,8 %. К этому времени очищенная препаратом почва не только не проявляла фитотоксичности, но и вызвала значительное (на 61,5 %) стимулирование роста и развития тест-растений кукурузы. Это может быть связано с влиянием метаболитов, синтезируемых УОМ при усвоении нефти и/или промежуточных продуктов ее деструкции, которые содержат вещества – регуляторы роста растений. Подтверждением этого служат полученные нами ранее [4] данные о способности, входящих в состав препарата актинобактерий, при усвоении углеводов синтезировать поверхностно активные вещества, содержащие трегалозолипиды, которые, по данным литературы [15], стимулируют рост растений. Кроме того, известно, что углеводородокисляющие бактерии ризосферной зоны растений при метаболизме ароматических углеводов и их производных способны синтезировать фитогормоны [10].

Исследование влияния очищенной препаратом и загрязненной нефтью почвы на прирост биомассы надземной части и корней кукурузы (рис. 7, 8) показало, что в вариантах опыта с препаратом наблюдалось значительное стимулирование прироста надземной части (78,7 %), и в меньшей степени – корней растения (25,6 %) по сравнению с незагрязненной почвой. Вместе с тем, в загрязненной нефтью почве, где не использовался препарат, было отмечено ингибирование на 25,7 % развития надземной части растений и незначительное стимулирование (на 14,9 %) прироста биомассы корней.

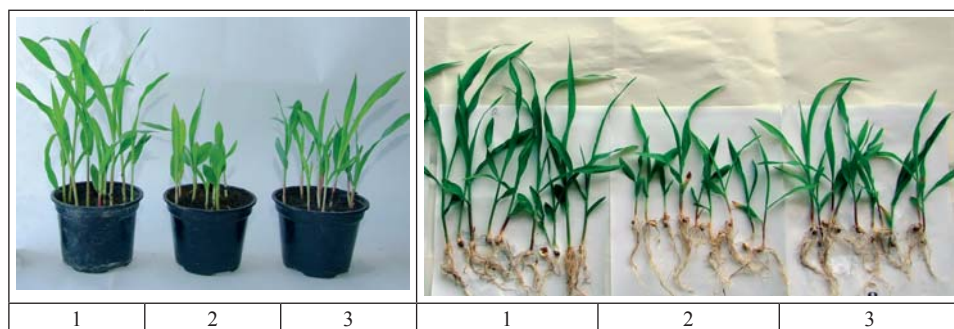


Рис. 7. Развитие кукурузы в очищенной препаратом в течение 8 месяцев и загрязненной нефтью почве: 1 – почва + нефть + препарат; 2 – почва + нефть; 3 – незагрязненная почва.

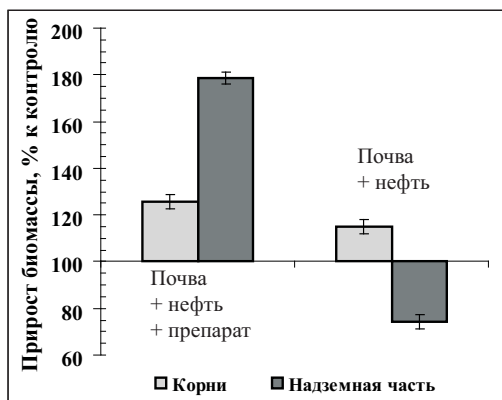


Рис. 8. Влияние очищенной препаратом в течение 8 месяцев и загрязненной нефтью почвы на развитие корней и надземной части кукурузы.

На завершающем этапе очистки почвы от нефтяного загрязнения во время третьего периода (май – август) была проведена фиторемедиация с использованием люцерны. Как известно, основной задачей этого этапа очистки является интенсификация почвенно-биологических процессов, способствующих кометаболическому разложению наиболее труднодоступных компонентов остаточной нефти [8, 9]. Использование в наших опытах люцерны как фитомелиоранта основывалось на том, что это растение повышает эффективность детоксикации нефтезагрязненных почв, проявляет устойчивость к нефтяным углеводородам и к неблагоприятным факторам среды, в частности, засухе и засоленности [17, 6].

Нами установлено, что люцерна, выросшая на почве, где ранее использовался препарат, давала более ранние (на 10 суток) и более дружные (на 20 %) всходы по сравнению с контрольной незагрязненной почвой. При этом в почве без обработки препаратом наблюдалась существенная (до 20 суток) задержка появления всходов относительно незагрязненной почвы. После фиторемедиации почва не проявляла фитотоксичности, содержание остаточных углеводородов в варианте опыта, где вносился препарат, снизилось до близкого к фоновому значению и составило 0,6 г/кг почвы, а в варианте опыта без применения препарата их количество снизилось до 6,9 г/кг почвы. Суммарная очистка обработанной препаратом почвы за весь период наблюдений составила 97,0 %, а в отсутствие препарата – 65,5 %.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что препарат «Эколан-М» проявляет высокую эффективность при очистке загрязненной нефтью почвы, оказывает стимулирующее действие на рост и развитие высших растений и является экологически безопасным для окружающей среды, что свидетельствует о перспективности его промышленного использования для биоремедиации нефтезагрязненных экосистем.

Т.М Нозіна, Т.У. Думанська, Л.А. Хоменко, В.С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К.Заболотного НАН України, Київ

ЭФФЕКТИВНІСТЬ ПРЕПАРАТУ «ЕКОЛАН-М» ДЛЯ ОЧИЩЕННЯ НАФТОВИХ ЗАБРУДНЕНЬ ҐРУНТУ

Резюме

Досліджено ефективність очищення препаратом «Еколан-М» забрудненого нафтою чорнозему суглинкового. Протягом 12 місяців комплексна біоремедиация ґрунту з використанням препарату і люцерни як фітомеліоранта на завершальному етапі очищення призвела до зменшення вмісту вуглеводнів на 97,0 %, а за відсутності препарату – на 65,5 %. При цьому у варіанті досліді з препаратом через 8 місяців досягнуто 100 % зниження фітотоксичності ґрунту і спостерігалось значне стимулювання росту і розвитку рослин. Процес очищення ґрунту супроводжувався інтенсивним розвитком вуглеводнеокиснювальних мікроорганізмів, кількість яких по мірі зниження концентрації нафти поступово зменшувалась, наближаючись до їхнього рівня у контрольному незабрудненому ґрунті.

Ключові слова: нафтове забруднення, вуглеводнеокиснювальні мікроорганізми, актинобактерії, біоремедиация, фітотоксичність.

EFFICIENCY OF THE PREPARATION “EKOLAN-M” FOR PURIFICATION OF OIL POLLUTED SOIL

Summary

The efficiency of purification of oil contaminated loamy chernozem by the preparation “Ekolan-M” was investigated. During 12 months a complex soil bioremediation using the preparation and alfalfa, as the land-improving plant, at the final stage of purification resulted in the reduction of hydrocarbon content by 97.0 %, and without the preparation – by 65.5 %. In the version of experiment with the preparation a 100% decrease of soil phytotoxicity was achieved and a significant stimulation of plant growth and development was observed. The process of soil purification was accompanied by intensive development of hydrocarbon-oxidizing microorganisms, the amount of which during the process of oil concentration gradually decreased, approaching the level in the control uncontaminated soil.

The paper is presented in Russian.

Key words: oil contamination, hydrocarbon-oxidizing microorganisms, actinobacteria, bioremediation, phytotoxicity.

The author's address: Nogina T.M., Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154 Acad. Zabolotny St., Kyiv MSP, D03680, Ukraine.

1. Бердичевская М.В., Козырева Г.И., Блажных А.В. Численность, видовой состав и оксигенная активность углеводородоксилирующего сообщества нефтезагрязненных речных акваторий Урала и Западной Сибири // Микробиология. – 1991. – 60, № 6. – С. 122–128.
2. ГСТУ 41-00 032 626-00-007-97. Галузевий стандарт України. Охорона довкілля. Спорудження розвідувальних і експлуатаційних свердловин на нафту та газ на суші.
3. Демидиенко А. Я. Пути восстановления плодородия нефтезагрязненных почв черноземной зоны Украины // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 197–205.
4. Думанська Т. У., Карпенко О. В., Нозіна Т. М., Вільданова-Марцишин Р. І., Підгорський В. С. Поверхнево активні властивості штамів *Rhodococcus erythropolis*, *Gordonia rubropertinctus* та *Acinetobacter calcoaceticus* // Наукові записки НАУКМА. Серія Біологія та екологія. – 2006. – 54. – С. 35–39.
5. Киреева Н.А., Кузьяметов Г.Г., Мифтахова А.М., Водопьянов В.В. Фитотоксичность антропогенно-загрязненных почв. – Уфа: Гелем, 2003. – 266 с.
6. Киреева Н.А., Тарасенко Е.М., Огнегова Т.С., Бакаева М.Д. Комплексная биоремедиация нефтезагрязненных почв для снижения токсичности // Биотехнология. – 2004. – № 6. – С. 63–70.
7. Методи почвенной микробиологии и биохимии. / Под ред. Д.Г.Звягинцева. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 304 с.
8. Микроорганизмы и охрана почв. / Под ред. Д.Г. Звягинцева. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1989. – 206 с.
9. Муратова А.Ю., Турковская О.В., Хюбнер Т., Кушк П. Использование люцерны и тростника для фитомередиации загрязненного углеводородами грунта // Прикладная биохимия и микробиология. – 2003. – 39, № 6. – С. 681–688.
10. Назаров А.А. Микробно-растительное взаимодействие при нефтяном загрязнении дерново-подзолистых почв Южной тайги Предуралья: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Пермь, 2000. – 24 с.
11. Нечаева И.А. Биодegradация углеводородов нефти психротрофными микроорганизмами-деструкторами: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Пушино, 2009. – 30 с.
12. ОСТ 38.01378-85. Охрана природы. Гидросфера, определение нефтепродуктов в сточных водах методом инфракрасной спектрофотометрии. – Москва: Изд-во стандартов, 1985. – 8 с.
13. Пиковский Ю.И. Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 7–22.
14. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. / Под ред. Н.С.Егорова. – Москва: Изд-во Моск. ун-та, 1983. – 221 с.
15. Рычкова М.И. Влияние *Rhodococcus*-биосурфактантов на процессы десорбции и деградации нефтяных углеводородов в почве: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Пермь, 2007. – 26 с.
16. Соловьев В.И., Кожанова Г.А., Гудзенко Т.В., Кривицкая Т.Н., Семина Н.В. Биоремедиация как основа восстановления нефтезагрязненных почв. Проблемы сбора, переработки и утилизации отходов, Сборник научных статей. – Одесса: ОЦНТЭИ, 2001. – С. 339–345.
17. Терек О.І, Величко О.І, Джура Н.М. Фізіологічні аспекти адаптації рослин до нафтозабрудненого ґрунту. В кн. Фізіологія рослин: проблеми та перспективи розвитку. У двох томах. Том 2. // Під ред. В.В.Моргун. К.: Логос, 2009. – С. 217–225.
18. Фомин Г.С., Фомин А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. Справочник. – М.: Изд-во «Протектор», 2001. – 304 с.

Отримано 14.09.2011