

УДК 504.53.062.4

## ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ТЕХНОЛОГИЙ БИОРЕКУЛЬТИВАЦИИ - НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ НА СООБЩЕСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ

*Сибирко Ю.А., ас.*

*Сумський державний університет  
44007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2  
E-mail: pri\_ecol@sumdu.edu.ua*

Представлено аналіз дії деяких типів рекультивациі нафтозабруднених ґрунтів (біостимуляції, внесення біопрепарату із власної нафтодеградуючої мікрофлори ґрунтів та сучасного комерційного біопрепарату) на загальну кількість бактерій, грибів та бактерій-деградаторів нафти. До зкінчення експерименту початкове співвідношення мікроорганізмів спостерігалось тільки в зразку з комерційним біопрепаратом.

**Ключові слова:** рекультивация, нафтозабруднений ґрунт, біопрепарат, мікробіоценоз.

There is shown the influences some remediation technologies of petroleum-contaminated soil (biostimulation, bioaugmentation of autochthonous hydrocarbons degrading microflora (bacterial) and modern bacteriological commercial product) on number of bacteria, number of fungi and number of petroleum degrading bacteria in soil. In the end of experiment initial quantitative and qualitative of microflora was achieved in sample with modern commercial bacteriological preparation.

**Key words:** remediation, petroleum-contaminated soil, biopreparation, microbiocenose.

**Введение.** Защита природной среды от техногенного воздействия – важнейшая проблема современности. Одними из наиболее распространенных загрязнителей в последние десятилетия являются нефть и нефтепродукты.

Опасность нефтяного загрязнения состоит в нарушении динамического равновесия в сложившихся экосистемах из-за изменения структуры почвенного покрова, биогеохимических свойств почв и токсического действия на растения и почвенные микроорганизмы.

**Анализ предварительных исследований.** При загрязнении почвы нефтью и нефтепродуктами возрастают запасы углерода во всех генетических горизонтах и ухудшается азотный режим, вследствие чего нарушается корневое питание растений; снижается самоочищающая способность почвы. На поверхности образуется плотная битумная пленка, что, в свою очередь, создает неблагоприятный водно-воздушный режим. Общая особенность всех нефтезагрязненных почв – изменение численности и ограничение видового разнообразия микроорганизмов.

Однако почвы обладают способностью к восстановлению. Эффективность этих процессов зависит от наличия микроорганизмов, способных использовать нефть как ресурс углерода. Поверхностный слой почвы содержит от  $10^6$  до  $10^9$  бактерий на 1 г почвы, из которых 1% и более составляют бактерии – деградаторы углеводородов нефти [1, 2].

Восстановление нефтезагрязненных почв в естественных условиях является многоступенчатым процессом и требует длительного времени. Поэтому необходима разработка различных методов интенсификации процесса восстановления почв. В настоящее время насчитывается значительное количество различных технологий восстановления загрязненных нефтью и нефтепродуктами почв. Особую

популярность среди них приобрели биологические методы рекультивации.

Методы биорекультивации почв делятся на две основные группы: активизация собственной микрофлоры почвы, способной к разложению углеводородов нефти, и внесение биологических препаратов (приготовленных либо из аборигенной микрофлоры, либо коммерческих штаммов, активных в разложении углеводородов нефти).

Выбор наиболее эффективного метода восстановления почв зависит от многих параметров (характеристик почвы, концентрации и состава загрязнителя, климатических условий и т.д.). Эффективность технологий рекультивации традиционно оценивается степенью удаления загрязнителя, степенью восстановления физических и химических свойств почвы. Но в последнее время для оценки эффективности восстановления почв разрабатываются и внедряются биологические или экологические оценки [3]. Они характеризуют восстановление биоценоза почвы, почвенного плодородия, устойчивость биологической продуктивности и т.д.

Многочисленные исследования показывают [4-14], что воздействие на микробиоценоз почвы оказывают не только загрязнение нефти. Процесс биорекультивации также может оказывать негативное воздействие на количественный и качественный состав микроорганизмов.

Воздействие внесения бактериологических препаратов на микробиоценоз почвы можно разделить на несколько периодов:

- первоначальное увеличение количества бактерий – деградаторов углеводородов нефти (связанное с внесением бактериологического биопрепарата, коммерческого или полученного из аборигенной микрофлоры) [4];
- незначительное снижение количества бактерий

и деградаторов нефти в первые несколько дней (связанное с адаптацией к новым условиям окружающей среды) или резкое снижение количества этих групп микроорганизмов (связанное с неудавшейся адаптацией) [4, 5];

- рост количества бактерий и деградаторов углеводов до 45-90 дней с начала эксперимента (связанный со стабилизацией процесса рекультивации) [1, 4-7];
- снижение количества всех групп микроорганизмов (связанное с дефицитом биогенов, появлением токсических продуктов полураспада или окончанием процесса биорекультивации) [4-8].

Внесение бактериологических препаратов вызывает конфликт между бактериями и микобиотой, который приводит к снижению общего количества представителей царства грибов [5-8].

Биостимуляция аборигенной микрофлоры в разложении углеводов нефти внесением биогенных элементов (N, P, K) приводит к:

- росту количества всех групп микроорганизмов до 35-45 дней (связанному с появлением ресурсов углерода, азота, фосфора и т.д.) [9-12],
- снижению количества всех групп микроорганизмов (связанному с истощением биогенов, появлением токсических продуктов полураспада или окончанием процесса биорекультивации) [9, 13, 14].

Внесение биогенных элементов приводит также к конфликту между бактериями и микобиотой, однако, не такое критическое, как с использованием биопрепаратов [11, 14].

**Цель работы.** Определение воздействия некоторых типов рекультивации (биостимуляции, внесения биопрепарата из собственной нефтедеградирующей микрофлоры почв и современного коммерческого биопрепарата) на почвенный микробиоценоз.

**Материалы и результаты исследований.** Для эксперимента была выбрана суглинистая почва из парка в г. Гливице, Польша. Почва была просеяна и распределена по 9 образцам весом 2,5 кг. В увлажненные и подготовленные образцы внесли сырую нефть в качестве загрязнителя в разных концентрациях (в 4 образца внесли 100 г нефти, в 4 – 200 г и один образец без загрязнения - контрольный).

Два образца с нефтяным загрязнением остались в качестве контроля без технологий рекультивации.

Загрязненные образцы были подвержены технологиям рекультивации – биостимуляции азотом и фосфором, внесению биопрепарата из аборигенной бактериальной микрофлоры и современного коммерческого биопрепарата.

Биостимуляция микрофлоры азотом и фосфором производилась соединениями  $\text{KN}_2\text{PO}_4$  и  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  до соотношения C:N:P = 100:10:1.

Бактериологический препарат из аборигенной микрофлоры был приготовлен мультипликацией 15 штаммов бактерий, активных в разложении углеводов нефти. В образец с 4% нефти внесены  $4,5 \times 10^9$  бактерий, в образец с 8% -  $9 \times 10^9$ .

Коммерческий продукт, который использовали для рекультивации образцов, был БАРС, биологиче-

ский сорбент из активированного угля с нанесенным консорциумом бактерий – деградаторов углеводов нефти, созданный Институтом сорбции и проблем эндоэкологии НАН Украины совместно с ООО НПК «Техноэкосорб». Количество препарата вносили в соответствии с инструкцией производителя – 1 г на 4 г нефти. Модификации образцов почвы представлены в табл. 1.

**Таблица 1 – Модификации образцов почвы**

| Наименование образцов | Количество нефти, % | Технология ремедиации                           |
|-----------------------|---------------------|---|
| К                     | 0                   | -   |
| 4%                    | 4                   | -   |
| 8%                    | 8                   | -   |
| A4                    | 4                   | Внесение биопрепарата из аборигенной микрофлоры |
| A8                    | 8                   | Внесение биопрепарата из аборигенной микрофлоры |
| N4                    | 4                   | Биостимуляция биогенными элементами             |
| N8                    | 8                   | Биостимуляция биогенными элементами             |
| CP4                   | 4                   | Внесение коммерческого биопрепарата             |
| CP8                   | 8                   | Внесение коммерческого биопрепарата             |

Все образцы систематически рыхлились и увлажнялись до оптимальной влажности (20-25%).

Эксперимент длился 88 дней, в начале эксперимента и каждые 22 дня выполнялись анализы для определения общего количества бактерий (на субстрате агар), общего количества микобиоты (на субстрате *Sabouraud*) и количества бактерий - деградаторов углеводов нефти (на субстрате *Bushnell-Hass* с пленкой нефти). Результаты анализов представлены в табл. 2-4.

**Таблица 2 – Общее количество бактерий в образцах (кл/г сухой почвы)**

|      | 0 день            | 22 день           | 44 день           | 66 день           | 88 день           |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| К    | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | $2,5 \times 10^7$ |
| 4%   | $1,0 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $5,0 \times 10^8$ | $6,0 \times 10^7$ |
| 8%   | $1,0 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^7$ | $4,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ |
| A 4  | $5,0 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ | $4,0 \times 10^8$ | $4,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ |
| A 8  | $2,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^9$ | $2,0 \times 10^8$ |
| N 4  | $1,0 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^8$ | $3,0 \times 10^8$ | $2,0 \times 10^9$ | $1,0 \times 10^9$ |
| N 8  | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^9$ | $1,0 \times 10^9$ |
| CP 4 | $1,0 \times 10^7$ | $4,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ | $4,0 \times 10^7$ |
| CP 8 | $1,0 \times 10^7$ | $6,0 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^7$ |

Почва, которая была выбрана для эксперимента, испытывала в прошлом на себе антропогенное воздействие и была загрязнена углеводородами нефти. Анализ почвы не показал наличия углеводородов нефти на момент начала эксперимента. Однако со-

отношения микроорганизмов (в образце К общее количество бактерий составляло  $1,0 \times 10^7$  кл/г сух. почвы и  $3,0 \times 10^6$  кл/г сух. почвы нефтедеградирующих бактерий) составляло 3:10. (Популяция бактерий, активных в разложении углеводородов нефти, в нормальных условиях составляет 1% от общего количества бактерий, в загрязненной почве этот показатель возрастает, обычно до 10% и более [3]).

**Таблица 3 – Общее количество микобиоты в образцах (кл/г сухой почвы)**

|      | 0 день            | 22 день           | 44 день           | 66 день           | 88 день           |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| К    | $1,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ |
| 4%   | $1,0 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^5$ | $5,0 \times 10^4$ | $4,0 \times 10^4$ |
| 8%   | $1,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ | $6,0 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^4$ |
| А 4  | $3,0 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^5$ | $5,0 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^4$ | $4,0 \times 10^4$ |
| А 8  | $2,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ | $4,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ |
| Н 4  | $1,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^5$ | $5,0 \times 10^5$ |
| Н 8  | $1,0 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^7$ | $6,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^5$ |
| СР 4 | $1,0 \times 10^5$ | $6,0 \times 10^5$ | $6,0 \times 10^6$ | $3,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ |
| СР 8 | $1,0 \times 10^7$ | $6,0 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^7$ |

**Таблица 4 – Общее количество бактерий – деградаторов углеводородов нефти в образцах (кл/г сухой почвы)**

|      | 0 день            | 22 день           | 44 день           | 66 день           | 88 день           |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| К    | $3,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^6$ |
| 4%   | $3,0 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^4$ | $1,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ |
| 8%   | $3,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^5$ | $4,0 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ |
| А 4  | $2,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^7$ | $3,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ |
| А 8  | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^7$ | $7,0 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ |
| Н 4  | $3,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^7$ |
| Н 8  | $3,0 \times 10^6$ | $3,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^7$ | $2,0 \times 10^8$ | $1,0 \times 10^8$ |
| СР 4 | $3,0 \times 10^7$ | $8,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^7$ | $4,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ |
| СР 8 | $2,0 \times 10^7$ | $1,4 \times 10^7$ | $7,0 \times 10^6$ | $2,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^6$ |

Потенциал биорекультивации почвы зависит от способности микроорганизмов адаптироваться к новым условиям. Как видно из динамики микроорганизмов в образцах 4% и 8% (загрязненных нефтью, но без применения технологий рекультивации), в естественных условиях процесс адаптации был более длительным, чем в других образцах. Рост общего количества бактерий и нефтедеградирующих бактерий наблюдался только на 44 день. Кроме того, рост этих групп микроорганизмов сопровождался снижением количества микобиоты. Причиной снижения является конкуренция между бактериями и микофлорой за биогенные элементы. На 88 день наблюдалось снижение всех групп микроорганизмов, однако, процесс рекультивации еще не был завершен. В естественных условиях 88 дней не достаточно для полного разложения углеводородов нефти (по окончании эксперимента почва в образцах имела характерные для нефтяного загрязнения физические и химические свойства).

Согласно литературным данным основной при-

чиной остановки процесса деградации углеводородов нефти в естественных условиях является дефицит биогенных элементов. В образцы N4 и N8 с целью интенсификации процесса разложения нефти были внесены удобрения в количестве, необходимом для полного перевода углерода нефти в биомассу. Как видно из данных табл. 2-4, в образцах N4 и N8 наблюдались самые высокие темпы роста и самое значительное увеличение количества всех групп микроорганизмов. Максимальное количество всех микроорганизмов наблюдалось на 66 день. На 88 день образцы уже характеризовались незначительным спадом общего числа бактерий и нефтедеградирующих бактерий и ощутимым снижением количества микобиоты, что говорит об исчерпании ресурсов биогенов. В целом процесс биорекультивации к окончанию эксперимента не был завершен (анализы показывали наличие углеводородов нефти в почве), восстановление микробиоценоза почвы не наблюдалось.

Последние десятилетия широкое распространение приобретают методы внесения готового биопрепарата из нефтедеградирующих бактерий.

Биопрепарат, приготовленный из 15 штаммов аборигенной нефтедеградирующей микрофлоры почв был внесен в образцы А4 и А8. Внесение биопрепарата в начале эксперимента привело к резкому возрастанию количества бактерий, способных к разложению углеводородов нефти и последующему снижению на 22 день, связанному с адаптацией бактерий к условиям почвы. Стабилизация количества деградаторов нефти на 44 и 66 дни и рост общего числа бактерий (до установления соотношения между вышеуказанными группами микроорганизмов до 1:10 соответственно) свидетельствует о стабилизации процесса разложения нефти. На 88 день наблюдалось незначительное снижение количества всех групп микроорганизмов в связи с появлением дефицита биогенов. Максимум в динамике микобиоты наблюдался в образцах А4 и А8 на 44 день и составил  $5,0 \times 10^5$  кл/г сух. почвы в образце А4 и  $4,0 \times 10^6$  кл/г сух. почвы – в А8. Процесс биорекультивации с применением биопрепарата из аборигенной микрофлоры к концу эксперимента не был завершен и восстановления первоначального микробиоценоза не произошло.

Последней технологией рекультивации, которые исследовали в работе, было внесение современного коммерческого биопрепарата. Отличительная особенность препарата БАРС – наличие субстрата для штаммов бактерий в виде активированного угля. Как показали исследования, сразу же после внесения биопрепарата в образцы значительная часть нефти из почвы была адсорбирована на поверхности угля. Бактерии практически не мигрировали в почву (как показали анализы незначительный рост нефтедеградирующей микрофлоры наблюдался в начале эксперимента). В течение эксперимента количество микроорганизмов, разлагающих углеводороды нефти, практически не менялось, на 88 день наблюдалось незначительное снижение, связанное в образце

СР4 – с окончанием процесса рекультивации и в образце СР8 с возникновением дефицита биогенов. Поскольку в образцах с коммерческим биопрепаратом деградация углеводородов нефти происходила на поверхности активированного угля, то в почве мы наблюдали процесс разложения полупродуктов распада нефти. Как видно из динамики процесса, основную роль в разложении полупродуктов играют бактерии, не входящие в группу деградаторов нефти и микобиота (на 22 день в образце СР4 и на 44 день в СР8 наблюдался рост количества общего числа бактерий и микобиоты). Динамика микробиоценоза в обоих образцах подобная и отличается только амплитудой колебаний и временными характеристиками (связано с в 2 раза большим загрязнением образца СР8 по сравнению с СР4).

В конце эксперимента (на 88 день) в почве с низким уровнем загрязнения (4%) наблюдалось завершение процесса рекультивации и восстановление исходного соотношения в микробиоценозе почвы. В образце с высоким содержанием загрязнения (СР8) на 88 день наблюдалось незначительное снижение всех групп микроорганизмов вызванное дефицитом биогенов.

**Выводы.** Сравнительный анализ результатов исследования привел к следующим выводам:

- технологии рекультивации также как и загрязнение, влияет на почвенный микробиоценоз, это воздействие выражается, в основном, в конкуренции групп микроорганизмов за биогенные элементы и токсическом действии продуктов полураспада углеводородов нефти;
- применение технологий на начальном этапе привели к росту общего числа бактерий и бактерий – деградаторов углеводородов нефти;
- главным лимитирующим фактором для процессов рекультивации является дефицит биогенов;
- интродукция бактерий снижает общее число представителей царства грибов;
- микобиота более чувствительна к дефициту биогенных элементов, чем бактерии;
- динамика изменения количества бактерий - деградаторов нефти после стабилизации процесса рекультивации соотносится с динамикой общего количества бактерий;
- в разложении продуктов полураспада принимают участие бактерии, не входящие в группу деградаторов нефти и микобиота;
- первоначальное количественное и качественное соотношение между исследуемыми группами микроорганизмов наблюдалось только в образце с умеренным загрязнением (4%) и применением современного коммерческого биопрепарата.

Таким образом, данное исследование показало, что технология очистки нефтезагрязненной почвы с помощью современного биопрепарата-адсорбента к окончанию процесса рекультивации восстанавливает микробиоценоз, подобный исходному, который наблюдался до загрязнения почвы углеводородами нефти.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Donerski W., Wódkowska A. Occurrence of water bacterium and clever soil to degradation of diesel oils // *Materials from V Polish Symposium Scientifically - Technical Environmental Biotechnology*, Vol. 85, 1997.
2. Olańczuk-Neyman K., Prejzner J., Topolnicki M. Chemical and bacteriological evaluation of petroleum contaminated soils from reloading stations // *Biotechnology*, Vol. 2(25), 1994.
3. Roland M. Atlas Bioremediation of petroleum pollutants // *International Biodeterioration and Biodegradation*, 1995.
4. Ghazali F.M., Rahman R.N., Salleh A.B., Basri M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium // *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 54, 2004.
5. Leavitt M.E., Brown K.L. Biostimulation versus bioaugmentation – three case studies. *Hydrocarbon Bioremediation/ edited by Hinchee R.E. and others*, 1996.
6. Sorkhoh, N.A., Al-Hasan, R.H., Khanafer, M., Radwan, S.S. Establishment of oil-degrading bacteria associated with cyanobacteria in oil-polluted soil // *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 78, 1995.
7. Forsyth J.V., Tsao Y.M., Bleam R.D. Bioremediation: when is augmentation needed? *Bioaugmentation for Site Remediation/ edited by Hinchee R.E. and others*, 1997.
8. Zabłocka-Godlewska E., Miksch K. Efekty zastosowania biopreparatów naturalnych i komercyjnych w bioremediacji gruntów zanieczyszczonych substancjami ropopochodnymi // *Archiwum Ochrony Środowiska*, Vol. 29, 4, 2003.
9. Lee K., Siron R. and others Effectiveness of bioremediation in reducing toxicity in oiled intertidal sediments. *Microbial Processes for Bioremediation/ edited by Hinchee R.E. and others*, 1995.
10. Sarkar D., Ferguson M., Datta R., Birnbaum S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soil: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation // *Environmental Pollution*, Vol. 135, 2005.
11. Wyszowska J, Kucharski J. Correlation between number of microbes and degree of soil contamination by petrol // *Polish Journal of Environmental Studies* Vol. 10, No.3, 2001.
12. Chaineau C.H., Rougeus G., Yepremian C., Oudot J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil // *Soil Biology and Biochemistry*, Vol. 37, 2005.
13. Sabate J., Viñas M., Solanas A.M. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils // *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 54, 2004.
14. Evans F.F., Rosado A.S. and others. Impact of oil contamination and biostimulation on the diversity of indigenous bacterial communities in soil microcosms // *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 49, 2004.

Статья поступила 14.06.2007.

Рекомендовано к печати к.т.н., доц.  
Бахаревым В.С.