

УДК 576.8.095

## ВЛИЯНИЕ АГРОХИМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ НА ДИНАМИКУ ЧИСЛЕННОСТИ МЕЗОФИЛЬНЫХ И ПСИХРОФИЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

И. В. Трусей<sup>1</sup>, Ю. Л. Гуревич<sup>2</sup>, В. П. Ладыгина<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Красноярский государственный педагогический университет им. В. П. Астафьева  
Россия, 660049, Красноярск, Ады Лебедевой, 89*

*E-mail: trusey@list.ru*

<sup>2</sup> *Красноярский научный центр СО РАН  
Россия, 660036, Красноярск, Академгородок*

*E-mail: btchem@mail.ru*

Поступила в редакцию 10.06.15 г.

**Влияние агрохимической обработки нефтезагрязненной почвы на динамику численности мезофильных и психрофильных микроорганизмов.** – Трусей И. В., Гуревич Ю. Л., Ладыгина В. П. – В работе оценивали влияние на численность мезофильных и психрофильных микроорганизмов в нефтезагрязненной почве полимерного структурообразователя, мела и микроорганизмов. Наибольший положительный эффект на рост микроорганизмов оказал карбамидо-формальдегидный структурообразователь. В меньшей степени повлияло внесение углеводородокисляющих бактерий и мела. Численность мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих бактерий на площадках, обработанных структурообразователем, увеличилась с  $2.8 \times 10^5$  до  $1.95 \times 10^8$  КОЕ/г и с  $2.0 \times 10^5$  до  $1.9 \times 10^7$  КОЕ/г соответственно. Этот эффект оказался более выраженным через год, когда численность данных групп микроорганизмов увеличилась на 3-4 порядка.

*Ключевые слова:* нефтезагрязненные почвы, психрофилы, мезофильные микроорганизмы, карбамидо-формальдегидный структурообразователь, мел, интродукция.

**Influence of the agrochemical treatment of oil-contaminated soil on the abundance dynamics of mesophilic and psychrophilic microorganisms.** – Trusey I. V., Gurevich Y. L., and Ladygina V. P. – The influence of a polymeric structure-formation agent, chalk and microorganisms on the numbers of mesophilic and psychrophilic microorganisms in oil-contaminated soil was estimated. A carbamide-formaldehyde structure-formation agent had the most positive effect on microbial growth. Introducing hydrocarbon-degrading bacteria and chalk influenced to a lesser degree. The numbers of mesophilic and psychrophilic hydrocarbon-degrading bacteria on the sites treated with the agent increased from  $2.8 \times 10^5$  to  $1.95 \times 10^8$  cfu/g and from  $2.0 \times 10^5$  to  $1.9 \times 10^7$  cfu/g, respectively. This effect appeared to be more expressed in a year, when the numbers of these groups of microorganisms increased by  $10^3 - 10^4$ .

*Key words:* oil-contaminated soil, psychrophilic microorganisms, mesophilic microorganisms, carbamide-formaldehyde structure-formation agent, chalk, introduction.

DOI: 10.18500/1684-7318-2016-4-467-475

### ВВЕДЕНИЕ

При восстановлении почв, загрязненных углеводородными поллютантами, используют два биологических подхода – биостимуляцию, основанную на стиму-

лировании роста естественной микрофлоры, и биоаугментацию, принципиальное отличие которой – внесение микробных препаратов (Климентова и др., 2007; Atlas, 1995). Стимулирование роста аборигенной микрофлоры чаще всего осуществляют путем внесения минеральных удобрений, поскольку загрязнение почв органическими соединениями приводит к избытку углерода и недостатку биогенных элементов питания. В этой ситуации внесение удобрений представляет собой универсальный и высокоэффективный прием, позволяющий сбалансировать питание и увеличить численность автохтонных микроорганизмов. Соответственно, повышается скорость биodeградации углеводородов нефти и других органических поллютантов. В сравнении с «рутинными» методами химизации почв использование рекламируемых микробных препаратов часто представляется как необходимый и эффективный подход. В связи с этим отметим, что при мероприятиях биоаугментации рекомендуется вносить в почву биогенные элементы. Ряд авторов считает, что вклад интродуцированных микроорганизмов в деградацию поллютанта существенно меньше, чем вклад биостимуляции (Atlas, 1995; Margesin et al., 2008). В работах A. D. Venosa с соавт. (1992) и G. Thouand с соавт. (1999) проанализирован целый ряд коммерческих микробных препаратов и отмечена их низкая эффективность. Нередкие неудачи использования микробных препаратов предъявляют высокие требования к подбору штаммов-нефтедеструкторов. Должны быть учтены не только нефтеокисляющая активность бактерий, но и температурный диапазон роста, биоэмульгирующая способность, наличие катаболических плазмид и другие показатели (Ветрова и др., 2013; Margesin et al., 2008). В то же время активно развиваются методы стимулирования аборигенной микрофлоры в нефтезагрязненных почвенных экосистемах (Климентова и др., 2007). Например, используют удобрения пролонгированного действия, торф и т.д.

Настоящая работа направлена на анализ возможностей биостимуляции. В частности, оценивали влияние на численность микроорганизмов внесения в почву структурообразователя и мела. Действие этих факторов изучали на фоне внесенных в почву источников азотного и фосфорного питания микроорганизмов. Испытания проводили в зоне умеренного резко-континентального климата, поэтому в дополнение к обычно используемому контролю за численностью мезофильных микроорганизмов определяли численность психрофилов и психротолерантов.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служила территория, загрязненная в результате аварийного разлива сырой нефти весной 2002 г. в районе г. Красноярска. Нарушенный участок занимал узкую полосу вдоль пересыхающего ручья, на котором преобладали темно-серые оподзоленные почвы. Эксперимент проводили с мая 2002 г. по сентябрь 2003 г. на площадках размером 2.5 м<sup>2</sup>, которые обрабатывались тремя способами: внесением структурообразователя, мела и интродукцией ассоциаций микроорганизмов. Всего было заложено 5 опытных площадок, обработанных по схеме, представленной в таблице.

Анализ влияния различных обработок на почву проводили в условиях, когда рост микроорганизмов не ограничивался недостатком питательных элементов –

## ВЛИЯНИЕ АГРОХИМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

азота и фосфора. Поэтому на все участки, включая контрольный (№ 5), вносили азотно-фосфорное удобрение (аммофос и суперфосфат) ежемесячно в период с июня по сентябрь, дозы внесения азота 35 кг/га, фосфора 22.5 кг/га. В качестве структурообразователя почвы использовали карбамидо-формальдегидный полимер марки Униполимер-М, который обладает свойствами азотного удобрения пролонгированного действия (Агрохимия, 1989; Мелкозеров и др., 2010). Полимер вносили в почву гнездовым способом на глубину 5 – 10 см, расстояние между гнездами 20 см. При этом почву разрезали лопатой и отодвигали, чтобы сохранить почвенный профиль. Доза внесения составляла 40 – 50 кг/га (Мелкозеров и др., 2010), форма – порошкообразная или легко рассыпающиеся гранулы с удельным весом 10 г/дм<sup>3</sup>. Для поддержания рН почвенного раствора использовали мел (Агрохимия, 1989; Зубайдуллин, 2003). Доза внесения мела – 1200 кг/га.

Схема обработки экспериментальных опытных площадок

Средство обработки	№ площадки				
	1	2	3	4	5 (контроль)
Униполимер-М	+	–	+	+	–
Мел	+	+	–	+	–
Ассоциация микроорганизмов 1	+	–	–	–	–
Ассоциация микроорганизмов 2	–	+	+	+	–
Удобрения	+	+	+	+	+

*Примечание.* + – средство использовали, – – средство не использовали.

Также в работе оценивали эффективность интродукции микробных ассоциаций (см. таблицу). Ассоциация 1 – это автохтонные микроорганизмы, выращенные в накопительном режиме с аэрацией. Почву отбирали с загрязненного участка, вносили в жидкую минеральную среду (см. ниже) с нефтью. Выращивание микроорганизмов проводили при комнатной температуре в течение недели. Полученную ассоциацию микроорганизмов вносили на площадку № 1 (см. таблицу). Объем суспензии составлял 5 л, титр микроорганизмов – 10<sup>8</sup> КОЕ/мл. Ассоциация 2 представляла собой смешанную культуру из биореактора очистки сточной воды производства фенол-формальдегидных смол, которая способна к деградации ароматических углеводородов, в частности нафталина, фенантрена, антрацена, флуорена (Гуревич и др., 1995). Доминантные виды – *Pseudomonas putida* и *Pseudomonas* sp.. Предварительная проверка показала, что культура может использовать сырую нефть в качестве единственного источника углерода. На площадки № 2 – 4 вносили по 1 л суспензии с титром 10<sup>9</sup> КОЕ/мл (см. таблицу).

По данным контрольного замера в почве загрязненного участка численность углеводородокисляющих составляла 10<sup>6</sup> КОЕ/г. Чтобы уравнивать численность исследуемых ассоциаций, доза внесения ассоциации 1 (автохтонные углеводородокисляющие) была в 2 раза меньше, чем ассоциации 2.

При отборе проб на контрольной площадке № 5 измеряли температуру почвы на глубине 5 см. Содержание нефти в почве определяли на ИК-спектрометре после экстракции четыреххлористым углеродом (Методика выполнения измерений...,

1998). Актуальную кислотность почвы измеряли с помощью рН-метра. Влажность определяли весовым методом. Пробы почвы отбирали на опытных площадках методом «конверта» (5 проб с каждой площадки) с горизонта 0 – 5 см и помещали в стерильные бьюксы, которые содержались при температуре + 5°C, высеив проводили в течение суток. Масса почвенного образца составляла 15 – 20 г.

В работе оценивали численность аммонифицирующих микроорганизмов как наиболее многочисленной группы в почвенных экосистемах и численность углеводородоокисляющих микроорганизмов. При этом учитывали не только мезофильные формы, но и психрофильные. Для учета численности микроорганизмов использовали два метода: посев в многослойный агар и метод предельных разведений с высевом на агаризованную среду (Методы общей бактериологии, 1983). Количество микроорганизмов рассчитывали на сухую массу почвы. Подсчет числа аммонифицирующих микроорганизмов проводили на пептонном агаре, а углеводородоокисляющих – на среде следующего состава (г/л):  $\text{KNO}_3$  – 4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0.6;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – 1.4;  $\text{MgSO}_4$  – 0.4; выщелоченный агар – 20, рН 7.2 – 7.3. В качестве источника углерода в среду вносили 2 мл/л сырой нефти. Нефть добавляли в среду перед посевом. Определение численности психрофильных (в том числе и психротолерантных) микроорганизмов проводили при температуре +5°C, мезофильных – при +30°C. Время инкубации для психрофилов 10 суток, для мезофилов – 7 суток.

Для оценки общего влияния обработки почвы на микрофлору (различных комбинаций внесения структурообразователя, мела и микроорганизмов) сравнивали среднюю численность микроорганизмов на площадках № 1 – 4 (20 проб) со средней численностью на контрольной площадке № 5 (5 проб) (см. таблицу). Для оценки влияния каждого из вышеперечисленных способов обработки в отдельности сравнивали среднюю численность микроорганизмов в почве площадок, обработанных анализируемым способом (для каждого способа – 3 площадки), с численностью на площадке, которая не подвергалась обработке (см. таблицу). Для оценки действия внесенных ассоциаций сравнивали данные на площадках № 1 и № 4. Обработку данных проводили с использованием статистики Пуассона, стандартных статистических методов для нормального распределения и непараметрического критерия Вилкоксона (Шараф и др., 1989).

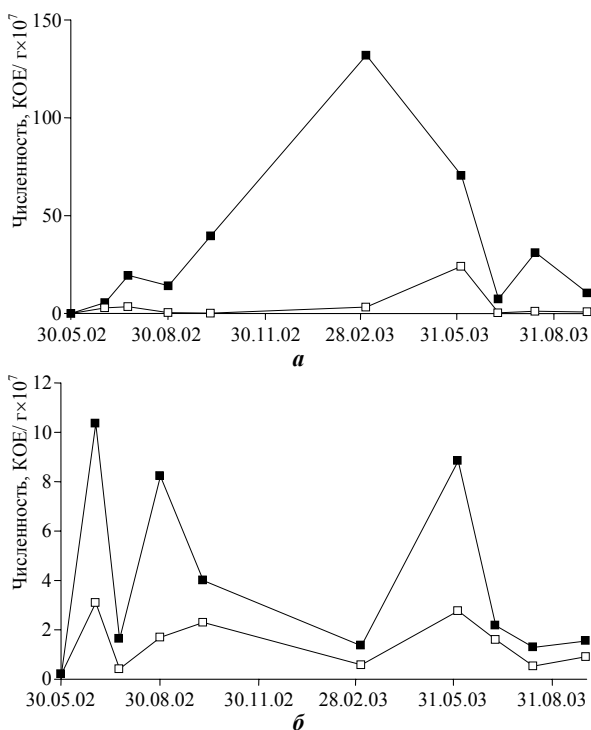
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования на нефтезагрязненной территории начались через месяц после аварийного разлива. Концентрация нефти на опытных площадках варьировала в диапазоне от 97 до 167 г/кг почвы в течение всего эксперимента. Это связано с тем, что опытные площадки располагались в нижней части (по высоте) загрязненной территории. Поэтому стимулирование микрофлоры происходило в условиях продолжающегося поступления нефти и сохранения большой концентрации ее на протяжении длительного периода времени, что нередко имеет место. В этой ситуации концентрация нефти не может служить показателем идущих в почве процессов восстановления, и более информативным становится определение динамики численности микроорганизмов.

## ВЛИЯНИЕ АГРОХИМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

На протяжении всего периода наблюдений численность исследуемых групп микроорганизмов на обработанных площадках была выше, чем на контрольной. В наибольшей степени обработка почвы стимулировала рост углеводородокисляющих микроорганизмов. Данные о средней численности мезофильных и психрофильных углеводородокисляющих микроорганизмов на обработанных участках № 1 – 4, а также контрольном участке № 5 представлены на рис. 1.

Результаты показывают, что простые агротехнические приемы позволяют увеличить численность микроорганизмов на 2-3 порядка. Средняя численность мезофильных углеводородокисляющих микроорганизмов на площадках № 1 – 4 возросла с  $2.8 \times 10^5$  до  $1.95 \times 10^8$  КОЕ/г (см. рис. 1, а), а психрофильных – с  $2.0 \times 10^5$  до  $1.9 \times 10^7$  КОЕ/г (см. рис. 1, б). Стимулирование микроорганизмов стало еще более заметным через год после обработки, численность углеводородокисляющих микроорганизмов увеличилась на 3-4



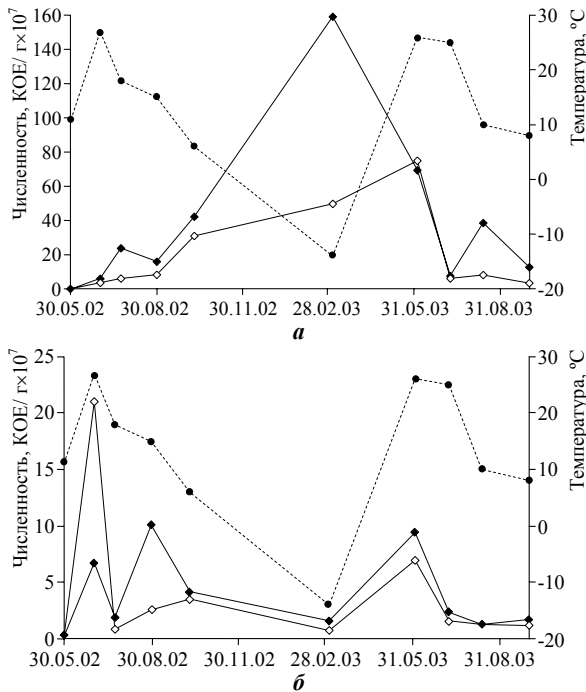
**Рис. 1.** Динамика численности мезофильных (а) и психрофильных (б) углеводородокисляющих микроорганизмов: ■ – среднее по площадкам № 1 – 4; □ – контрольная площадка № 5

порядка, а численность аммонификаторов достигла  $4.92 \times 10^9$  КОЕ/г. При этом значительное увеличение численности всех групп микроорганизмов за исключением психрофильных, окисляющих углеводороды, отмечается в марте, когда почва еще замерзшая. Это связано с эффектом оттаивания замерзшей почвы. При оттаивании происходит десорбция большей части микроорганизмов с частичек замерзшей почвы (Демкина, 2004; Кряжевских и др., 2012). Однако у психрофильных микроорганизмов, окисляющих углеводороды, такой эффект не отмечался, что, вероятно, связано с более низкой скоростью их размножения.

Влияние исследуемых способов обработки почвы на численность микроорганизмов в загрязненной почве было неодинаково. Наибольшее положительное влияние отмечается при внесении структурообразователя, внесение мела угнетало развитие почвенной микрофлоры. Интродукция оказывала положительное влияние на одну физиологическую группу микроорганизмов почвы.

Положительное влияние структурообразователя на развитие почвенных микроорганизмов отмечено в течение всего эксперимента. Это следует из сравнения динамики их численностей на площадке № 2 и обработанных структурообразователем почвах площадках № 1, 3 и 4 (рис. 2).

В целом анализ показал, что психрофильные микроорганизмы более чувствительны к изменениям температуры в почве. Увеличение температуры сопровождалось увеличением численности психрофилов, однако при температуре почвы более 25°C численность психрофилов снижалась. Присутствие структурообразователя в почве позволило микроорганизмам достичь более высоких численностей (см. рис. 2, б). С наступлением холодного времени года снижение численности микроорганизмов на площадках с Униполимером-М было меньше, чем на площадке № 2. Такой эффект от обработки структурообразователя вызван тем, что полимер, имеющий низкий коэффициент теплопроводности (0.023 – 0.03 ккал/м·час·градус) (Мелкозеров и др., 2010), изменяет теплофизические свойства почвы.



**Рис. 2.** Влияние структурообразователя на численность мезофильных (а) и психрофильных (б) углеводородоокисляющих микроорганизмов: ◆ – среднее по площадкам № 1, 3, 4; ◇ – площадка № 2; ● – температура почвы на глубине 5 см

В частности, резкие перепады температуры воздуха сглаживаются при уменьшении коэффициента теплопроводности почвы. В лабораторном эксперименте по определению динамики температуры почвы с полимером и без него при изменении внешней температуры воздуха на 4°C скорость ее изменения составляла 1.0 и 2.2°C в час соответственно.

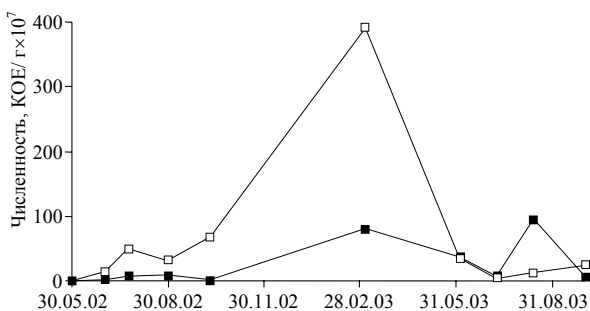
Внесение мела в почву – хорошо известный агротехнический прием. Авторы ряда работ отмечают положительное влияние этой обработки на развитие автохтонной микрофлоры нефтезагрязненной почвы, особенно в северных регионах, где почвы характеризуются низкими значениями рН (Зубайдуллин, 2003). На исследуемой почве подобный эффект обнаружен не был. В целом кислотность

почвы на исследуемых площадках в начале вегетационного периода (и эксперимента) составляла около 6 единиц рН. В последующий период на всех участках

наблюдалось повышение. На кислотность почвы повлияло также внесение мела. Так, через месяц рН почвы на участке без внесения мела (№ 3) была несколько ниже (6,0), чем в почве с мелом (6,5 – среднее по площадкам № 1, 2 и 4). В конце сезона (через 3-4 месяца от начала эксперимента) кислотность на участке без мела составляла 7,4, в то время как в почве с мелом – 7,7. Именно в данный период времени отмечается более низкая численность исследуемых групп микроорганизмов на участках с мелом. Этот вывод можно сделать с доверительной вероятностью 0,95 или 0,9 для мезофилов и психрофилов соответственно. Динамика численностей углеводородоокисляющих мезофилов на площадке № 3 (без мела) и на обработанных мелом площадках № 1, 2 и 4 показана на рис. 3. Возможно, при внесении мела в почвенном растворе появлялся свободный кальций, который связывал необходимый микроорганизмам фосфат-ион (Robertson, Alexander, 1992).

Оценка эффективности микробных ассоциаций 1 и 2 показала, что использование ассоциации 2 увеличило численность только одной группы – психрофильных аммонификаторов (критерий Вилкоксона составляет 0,98). Достоверные отличия в численности остальных групп исследуемых микроорганизмов между площадками с внесением ассоциаций 1 и 2 обнаружены не были. Статистически незначительный эффект от внесения ассоциации 1, в сравнении с ассоциацией 2, не означает бездейственность соответствующих микроорганизмов. Для выявления различий между ними требуется эксперимент большего объема. В общем это говорит об относительно небольшом влиянии обеих ассоциаций.

В связи с этим заметим, что одним из наиболее часто применяемых способов стимулирования микрофлоры нефтезагрязненных почв является внесение микробных препаратов. Однако в обзорной работе R. Margesin и F. Schinner (1999) отмечается, что это приводит к незначительному уменьшению углеводородного загрязнения (5 – 7%) в бедных азотом и фосфором почвах, а в богатых – положительный эффект вовсе не наблюдается. Для получения регулярного и более положительного эффекта, видимо, необходим детальный анализ условий развития микрофлоры в почве, на которой планируются проведение биоремедиационных работ и соответствующий подбор интродуцируемых микроорганизмов.



**Рис. 3.** Влияние мела на численность мезофильных углеводородоокисляющих микроорганизмов: □ – среднее по площадкам № 1, 2, 4; ■ – площадка № 3

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, сравнительный анализ показал, что стимулирование роста мезофильных и психрофильных микроорганизмов в загрязненной нефтью почве можно обеспечить простыми агрохимическими методами. На исследуемой почве

наибольший положительный эффект получен при внесении структурообразователя почв. Использованный в экспериментах карбамидо-формальдегидный полимер служит источником азотного питания только в локальной области контакта частиц полимера и микроорганизмов, т.е. не на всей обрабатываемой площади. Вероятно, медленно действующая подпитка создает ощутимый эффект в локальной области. В результате образуется очаг активного роста микроорганизмов, которые могут мигрировать и распространяться по всей площади. Интродукция микроорганизмов увеличила численность только аммонифицирующих психрофилов, значимое влияние на другие группы не отмечено. Внесение мела оказывало отрицательное влияние. В почве зоны умеренного (резко-континентального) климата численность психрофильных микроорганизмов была одного порядка с мезофильными, что должно учитываться при разработке мероприятий по ликвидации нефтяных загрязнений.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Агрохимия / под ред. Б. А. Ягодина. М. : Агропромиздат, 1989. 655 с.
- Ветрова А. А., Иванова А. А., Филонов А. Е., Забелин В. А., Гафаров А. Б., Соколов С. Л., Нечаева И. А., Пунтус И. Ф., Боронин А. М. Биодеструкция нефти отдельными штаммами и принципы составления микробных консорциумов для очистки окружающей среды от углеводородов нефти // Изв. Тульского гос. ун-та. Естественные науки. 2013. Вып. 2, ч. 1. С. 241 – 257.
- Гуревич Ю. Л., Ладыгина В. П., Теремова М. И. Деградация техногенных потоков вещества сообществом микроорганизмов и простейших // Изв. РАН. Сер. биол. 1995. № 2. С. 226 – 230.
- Демкина Е. В. Выживание неспорообразующих бактерий в вечномёрзлых хосадных породах : автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004. 24 с.
- Зубайдуллин А. А. Рекультивация нефтезагрязненных земель в Среднем Приобье : недостатки и основные причины низкой эффективности // Биологические ресурсы и природопользование. Сургут : Изд-во «Дефис», 2003. С. 129 – 139.
- Климентова Е. Г., Зудова Т. А., Меццеракова А. А. Рекультивация почв, загрязненных нефтепродуктами // Экология промышленного производства. 2007. № 3. С. 38 – 40.
- Кряжевских Н. А., Демкина Е. В., Манучарова Н. А., Соина В. С., Гальченко В. Ф., Эль-Регистан Г. И. Реактивация покоящихся и некультивируемых форм бактерий из древних почв и мерзлых подпочвенных отложений // Микробиология. 2012. Т. 81, № 4. С. 474 – 485.
- Мелкозеров В. М., Васильев С. И., Вельп А. Я., Горбунова Л. Н., Гуревич Ю. Л., Ладыгина В. П., Трусей И. В. Очистка нефтезагрязненных земель и водоемов Сибири с применением адсорбентов // Нефтепромысловое дело. 2010. № 11. С. 58 – 62.
- Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНДФ 16.1:2.2.22-98 / Гос. комитет РФ по охране окружающей среды. М., 1998. 12 с.
- Методы общей бактериологии / под ред. Ф. Герхардта. М. : Мир, 1983. 536 с.
- Шараф М. А., Иллман Д. Л., Ковальски Б. Р. Хемометрика. Л. : Химия. Ленингр. отделение, 1989. 269 с.
- Atlas R. M. Bioremediation of petroleum pollutants // Intern. Biodeterioration and Biodegradation. 1995. Vol. 30, iss. 1 – 3. P. 317 – 327.
- Margesin R., Schinner F. Biological decontamination of oil spills in cold environments // J. of Chemical Technology and Biotechnology. 1999. Vol. 74, iss. 5. P. 381 – 389.



## ВЛИЯНИЕ АГРОХИМИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ПОЧВЫ

*Margesin R., Schinner F., Marx J.-C., Gerday C.* Psychrophiles : from Biodiversity to Biotechnology / eds. R. Margesin, F. Schinner, J.-C. Marx, C. Gerday. Berlin : Springer, 2008. 462 p.

*Robertson B. K., Alexander M.* Influence of calcium, iron, and pH on phosphate availability for microbial mineralization of organic chemicals // *Applied and Environmental Microbiology*. 1992. Vol. 58, № 1. P. 38 – 41.

*Thouand G., Bauda P., Oudot J., Kirsch G., Sutton C., Vidalie J.* Laboratory evaluation of crude oil biodegradation with commercial or natural microbial inocula // *Canadian J. of Microbiology*. 1999. Vol. 45, № 2. P. 106 – 115.

*Venosa A. D., Haines J R., Nisamanepong W., Goving R., Pradhan S., Siddique B.* Efficacy of commercial products in enhancing oil biodegradation in closed laboratory reactors // *J. of Industrial Microbiology*. 1992. Vol. 10, iss. 1. P. 13 – 23.