

УДК 631.86:631.61

**ПРИМЕНЕНИЕ ШТАММОВЫХ КУЛЬТУР ГРИБОВ-САПРОФИТОВ  
В МЕТОДИКЕ РЕКУЛЬТИВАЦИИ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ НЕФТЬЮ****<sup>1</sup>Баландина А.В., <sup>1</sup>Одегова Т.Ф., <sup>2</sup>Казаков А.В., <sup>1</sup>Кузнецов Д.Б.**<sup>1</sup>ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия»,  
Пермь, e-mail: balandinaa1@mail.ru;<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,  
Пушино, e-mail: albit@itaec.ru

В настоящее время актуальность рекультивации почв, загрязненных нефтью, растет все больше. В некоторых нефтедобывающих регионах Российской Федерации ситуация доходит до экологического бедствия. Сейчас возрос интерес к экологически чистым и безопасным способам ликвидации нефтяных загрязнений окружающей среды, в основе которых лежит внесение культур микроорганизмов в почву. В статье представлены результаты исследования штаммовых культур грибов-сапрофитов и сельскохозяйственных препаратов в рекультивации нефтезагрязненных почв. Определено влияние различных комбинаций штаммовых культур и сельскохозяйственных препаратов, внесенных в почву, на ее кислотность, содержание углерода, углеводов, калия, фосфора и азота, а также на изменения биоценоза в целом. Подобраны оптимальные комбинации для практического использования в рекультивации почв, загрязненных нефтью.

**Ключевые слова:** рекультивация, биоремедиация, интенсификаторы, нефтезагрязнение, углеводороды**THE APPLICATION OF THE STRAIN CULTURES OF FUNGI SAPROPHYTE  
IN RECLAMATION METHODS OF SOILS POLLUTED BY OIL****<sup>1</sup>Balandina A.V., <sup>1</sup>Odegova T.F., <sup>2</sup>Kazakov A.V., <sup>1</sup>Kuznecov D.B.**<sup>1</sup>Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, e-mail: balandinaa1@mail.ru;<sup>2</sup>Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences  
named Scriabin, Puschino, e-mail: albit@itaec.ru

At present, the relevance of remediation of soils contaminated with oil is growing more and more. In some oil producing regions of the Russian Federation, the situation comes to environmental disaster. Now a growing interest in environmentally friendly and safe methods of oil pollution of the environment which are based on the introduction of cultures of microorganisms in the soil. The article contains the results of the research of strain saprophytic fungi cultures and agricultural products in remediation of oil-polluted soils. It also defines the of different combinations of strain saprophytic fungi cultures and agricultural products on soil acidity, carbon, hydrocarbon, potassium and phosphorus content. The optimum combinations were found for practical use in remediation of oil-polluted soils.

**Keywords:** remediation, bioremediation, intensifiers, oil pollution, hydrocarbons

Естественное самоочищение почв от загрязнения нефтью и нефтепродуктами может длиться десятилетиями. В настоящее время большинство традиционных способов восстановления почв, загрязненных нефтью (сжигание, закапывание и т.п.), являются не только не эффективными, но и вредными, так как, например, при сжигании в результате пиролиза нефти и ее компонентов образуются канцерогенные полициклические ароматические углеводороды. Поэтому особую актуальность приобретает поиск безопасных для окружающей среды и человека средств и методов рекультивации нефтезагрязненных почв.

Альтернативой традиционных способов очистки земель, загрязненных нефтью, является метод биоремедиации с помощью биологически активных препаратов, в состав которых входят штаммы микроорганизмов – деструкторов нефтяных углеводородов, а также интенсификаторы местной почвенной микрофлоры [5].

В задачи работы входила оценка химического состояния почв площадок, подвер-

гнутых рекультивации, и изучение эффекта воздействия препаратов и штаммов *Phoma eurygena* и *Serphaliophora tropica*. Указанные препараты применялись на втором этапе рекультивации [7].

Результаты исследования смешанных образцов с площадок, подвергнутых рекультивации, показали, что проведенные мероприятия не оказывают существенного влияния на изменение актуальной кислотности. Значение последней в фоновых образцах дерново-подзолистой глинистой почвы, загрязненной нефтью, находилось на уровне нейтральной или слабощелочной, а разница между фоновым и образцами, загрязненными нефтью, не превышала 0,5 единицы pH.

Содержание углерода непосредственно связано с количеством внесенной нефти. Исходное содержание общего углерода составило 1,6%. На площадках с применением диаммонийфосфата содержание углерода составило 9,3% при нагрузке нефти 100 мг/кг, что свидетельствует о низкой эффективности препарата.

Наиболее эффективно снижает содержание углерода внесение штаммов *Phoma eurygena* + «Альбит» и *Sephaliophora tropica* + «Альбит» на нагрузках нефти 10 и 5 л/м<sup>2</sup> – до 4,2% и 8,8% соответственно, а также при обработке почвы «Альбитом» на нагрузке 10 л/м<sup>2</sup> углерод составил 9,2%.

Применение гриба-сапрофита *Phoma eurygena* + «Альбит» на нагрузке 100 мг/кг содержание углерода составило 10,09%, при нагрузках 100 мг/кг – 9,04%, при нагрузках 50 мг/кг – 3,02% соответственно.

Применение штамма *Phoma eurygena* + «Альбит» на почве, загрязненной нефтью, привело к снижению содержа-

ния углеводов нефти в почве на 3–4% по сравнению с контрольным опытом (5–10%). Использование штамма *Phoma eurygena* + Альбит привело к снижению содержания углеводов нефти на 10,22%. Наименьшее положительное влияние на разложение углеводов в почве оказало действие диаммонийфосфата и препарата «Идеал» (1%).

Таким образом, наибольшую эффективность в механизме разложения нефти продемонстрировало использование двух указанных штаммов в смеси с «Альбитом». Наименее эффективным оказалось использование диаммонийфосфата и «Идеала» (табл. 1) [6].

Таблица 1

Значение актуальной кислотности, содержания углерода и углеводов в нефтезагрязненных и фоновых образцах почвы

№ п/п	Площадка	pH	C, %	УВ, %	% дег. УВ
1	Почва без нефти (контроль)	7,25	1,64	–	1,64
2	Почва, нефть (200 мг/кг) контроль	7,40	–	20,00	–
3	Почва, нефть (100 мг/кг) контроль	7,39	–	10,00	–
4	Почва, нефть (50 мг/кг) контроль	7,28	–	5,00	–
5	Почва, нефть (50 мг/кг), <i>Phoma eurygena</i> , «Альбит»	7,30	3,02	3,00	32,00
6	Почва, нефть (100 мг/кг), <i>Phoma eurygena</i> , «Альбит»	7,35	9,04	8,00	18,00
7	Почва, нефть (200 мг/кг), <i>Phoma eurygena</i> , «Альбит»	7,32	10,02	10,00	49,50
8	Почва, нефть (100 мг/кг), диаммонийфосфат	7,70	9,30	9,00	9,10
9	Почва, нефть (50 мг/кг), «Идеал»	7,33	4,80	4,00	16,00
10	Почва, нефть (100 мг/кг), «Идеал»	7,32	9,80	9,00	9,00
11	Почва, нефть (200 мг/кг), «Идеал»	7,43	9,81	18,11	9,45
12	Почва, нефть (50 мг/кг), «Альбит»	7,34	4,89	2,55	49,00
13	Почва, нефть (100 мг/кг), «Альбит»	7,44	9,20	6,00	37,00
14	Почва, нефть (200 мг/кг), «Альбит»	7,54	11,55	9,11	54,45
15	Почва, нефть (50 мг/кг), <i>Phoma eurygena</i> , <i>Sephaliophora tropica</i> , «Альбит»	7,28	2,40	2,00	52,10
16	Почва, нефть (100 мг/кг), <i>Phoma eurygena</i> , <i>Sephaliophora tropica</i> , «Альбит»	7,27	8,80	6,00	37,00
17	Почва, нефть (200 мг/кг), <i>Phoma eurygena</i> , <i>Sephaliophora tropica</i> , «Альбит»	7,45	10,35	10,12	49,40

На основании полученных результатов по исследованию содержания нитратного азота в почве экспериментальных площадок можно предположить, что при загрязнении вместе с углеводородами нефти в почву дополнительно поступают нитрат-ионы в виде солей, которые переходят в водную вытяжку при определении. Так, в контрольном загрязненном нефтью и не обработанном препаратом образце с нагрузкой 200 мг/кг содержание нитрат-ионов выше в 2,3 раза, чем в соответствующем контрольном образце (без нефти). Применение штамма *Phoma eurygena* + «Альбит» при нагрузке 200 и 100 мг/кг снижает нитратный азот в 3,3 раза, а при нагрузке

50 мг/кг – в 2,1 раза. Максимальное содержание нитратного азота было получено при применении препарата «Идеал» при нагрузке 100 мг/кг (11,20 мг/кг) и при нагрузке 50 мг/кг (24,56 мг/кг). Существенное снижение нитратного азота по сравнению с контрольным образцом, загрязненным нефтью, было получено при использовании штаммов *Phoma eurygena* и *Sephaliophora tropica* + «Альбит» при нагрузке 100 и 50 мг/кг: в 4,5 и 4,1 раза соответственно.

Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о том, что препарат «Идеал» эффективно иммобилизует нитратный азот из почвы, но при этом подавляются процессы биологической денитрификации, в ре-

зультате чего азот накапливается в почве в больших количествах. Штаммы, применяемые на нагрузках, наоборот, стимулируют рост микрофлоры, участвующей в процессе денитрификации, вызывая резкое падение содержания нитратного азота в почве.

Следует также отметить, что загрязнение нефтью не повлияло на содержание подвижных соединений фосфора. В образцах, загрязненных нефтью, содержание легкорастворимых фосфатов практически не отличалось от содержания в контрольном образце без нефти: 6,52 мг/100 г и при нагрузках нефти от 50 до 200 мг/кг: 6,68 мг/100 г; 6,35 мг/100 г; 6,41 мг/100 г.

Применение различных препаратов на загрязненных нефтью площадках повысило содержание фосфатов в почве в несколько

раз по сравнению с контрольными опытами. Причем наибольший эффект для фосфатов наблюдался при внесении штаммов увеличение в 2,5 раза, а также применение «Альбита». Менее эффективным оказался препарат «Идеал» [4].

Отметим, что нефтяное загрязнение незначительно влияет на содержание в почве подвижных соединений калия.

Влияние ряда препаратов на содержание подвижного калия отражает те же тенденции, как и в случае подвижного фосфора. В образцах, на которых применялись штаммы, содержание подвижного калия увеличилось в 4–5 раз по сравнению с контрольным и загрязненным нефтью образцом. При применении препарата «Альбит» содержание калия увеличилось в 3,7 раза. (табл. 2).

Таблица 2

Содержание агрохимических показателей в нефтезагрязненных и фоновых образцах дерново-подзолистой глинистой почвы

№ п/п	Площадка	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , мг/100 г	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/100 г	K <sub>2</sub> O, мг/100 г
1	Почва без нефти (контроль)	39,35	6,52	3,21
2	Почва, нефть (200 мг/кг) контроль	90,27	6,68	3,46
3	Почва, нефть (100 мг/кг) контроль	80,30	6,35	3,24
4	Почва, нефть (50 мг/кг) контроль	67,58	6,41	3,18
5	Почва, нефть (50 мг/кг), Phoma eurygena, «Альбит»	31,06	13,51	14,06
6	Почва, нефть (100 мг/кг), Phoma eurygena, «Альбит»	24,15	14,01	13,10
7	Почва, нефть (200 мг/кг), Phoma eurygena, «Альбит»	26,56	13,11	12,11
8	Почва, нефть (100 мг/кг), диаммонийфосфат	33,76	11,38	8,84
9	Почва, нефть (50 мг/кг), «Идеал»	92,14	7,98	7,22
10	Почва, нефть (100 мг/кг), «Идеал»	91,51	8,18	5,16
11	Почва, нефть (50 мг/кг), «Альбит»	44,34	22,54	14,11
12	Почва, нефть (100 мг/кг), «Альбит»	32,45	15,14	12,18
13	Почва, нефть (200 мг/кг), «Альбит»	23,12	16,32	14,03
14	Почва, нефть (100 мг/кг), Phoma eurygena, Cephalophora tropica, «Альбит»	17,78	16,12	14,37
15	Почва, нефть (50 мг/кг), Phoma eurygena, Cephalophora tropica, «Альбит»	16,54	17,08	15,18
16	Почва, нефть (200 мг/кг), Phoma eurygena, Cephalophora tropica, «Альбит»	15,33	18,54	13,21
17	Почва, нефть (200 мг/кг), «Идеал»	89,55	8,44	4,21

#### Характеристика биоценоза почв экспериментальных площадок

Биоценоз незагрязненной почвы типичен для подзолистых почв и представлен следующими группами бактерий: Pseudomonas (10<sup>6</sup> КОЕ/мл), Rhodococcus (10<sup>8</sup> КОЕ/мл), Bacillus (10<sup>7</sup> КОЕ/мл), а также миксальные микромицеты родов Fusarium (10<sup>6</sup> КОЕ/мл), Penicillium (10<sup>8</sup> КОЕ/мл). Присутствуют патогенные бактерии и грибы следующих групп Xanthomonas 10<sup>5</sup> КОЕ/мл Clavibacter 10<sup>6</sup> (КОЕ/мл), Agrobacterium

(10<sup>8</sup> КОЕ/мл), Rhizoctonia (10<sup>6</sup> КОЕ/мл), Phytophthora (10<sup>8</sup> КОЕ/мл) [2, 3].

После разлива нефти через неделю была проведена оценка биоценоза почвы и в результате получены следующие данные: у групп Pseudomonas, Rhodococcus и Bacillus снизился титр в 2–2,5 раза. Отсутствовали грибы родов Penicillium, Fusarium. Патогенные микроорганизмы Xanthomonas, Rhizoctonia также снизили свой титр, а патогены Clavibacter, Agrobacterium, Phytophthora полностью отсутствовали.

Через 2 недели биоценоз почв существенно не изменился. После внесения штамма *Phoma eurygena* + «Альбит», индивидуального «Альбита», диаммоний-фосфата через 35 дней обнаружены микробиологические группы *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Xanthomonas* на начальной стадии восстановления. Выяснено, что концентрация патогенных микроорганизмов нарастает быстрее, чем концентрация полезной микрофлоры (~в 2 раза). Наиболее эффективный рост микрофлоры наблюдался после обработок штаммами *Phoma eurygena* + «Альбит», *Serpaliophora tropica* + «Альбит» и «Альбит». Концентрация штамма *Phoma eurygena* на нагрузке нефти 50 мг/кг составили  $10^8$  КОЕ/мл [1].

Групповой анализ через 70 дней (табл. 3) после внесения всех составов на нефтеза-

грязненные площадки показал существенное изменение микробиологических групп *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*. Их содержание приблизилось к фону образца при нагрузке 50 мг/кг ( $10^5$ ,  $10^7$ ,  $10^6$  КОЕ/мл) соответственно. Группа *Xanthomonas* достигла фоновой концентрации  $10^5$  КОЕ/мл при нагрузке 50 мг/кг. Патогенные микроорганизмы *Clavibacter*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora* отсутствовали на площадках с нагрузкой нефти 50 мг/кг, обработанных смесями *Phoma eurygena* + «Альбит»; *Phoma eurygena* + *Serpaliophora tropica* + «Альбит» или индивидуальным препаратом «Альбит». Данные препараты оказывали губительное действие на патогенный состав почвы, загрязненной нефтью. Нарастание штамма *Phoma eurygena* и *Serpaliophora tropica* достигло  $10^8$  и  $10^{10}$  КОЕ/мл при нагрузке нефти 50 мг/кг.

**Таблица 3**

Биоценоз после разлива через 70 дней на экспериментальных площадках Ильинского района (2007 г.)

Наимен. микробиол. групп	Биоценоз до разлива, Фон	Площадка по нагрузкам											
		20, контроль	10, контроль	5, контроль	20, «Альбит» + штамм	10, «Альбит» + штамм	5, «Альбит» + штамм	10, диаммон. фосфат	10, «Альбит»	10, «Альбит» + штамм 1,2	5, «Альбит» + штамм 1,2	10, вытязка преп. «Идеал»	5, вытязк. преп. «Идеал»
<i>Pseudomonas</i>	$10^7$	$10^2$	$10^2$	$10^3$	$10^4$	$10^4$	$10^5$	$10^4$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^3$	$10^2$
<i>Rhodococcus</i>	$10^8$	$10^2$	$10^2$	$10^4$	$10^5$	$10^6$	$10^7$	$10^3$	$10^4$	$10^5$	$10^5$	$10^2$	$10^2$
<i>Bacillus</i>	$10^7$	-	$10^3$	$10^2$	$10^5$	$10^5$	$10^6$	$10^3$	$10^5$	$10^4$	$10^4$	$10^2$	$10^3$
<i>Xanthomonas</i>	$10^5$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^4$	$10^4$	$10^5$	$10^4$	$10^5$	$10^4$	$10^5$	$10^3$	$10^3$
<i>Clavibacter</i>	$10^6$	$10^3$	$10^4$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	-	$10^3$	$10^2$	$10^3$	-	$10^4$	$10^3$
<i>Agrobacterium</i>	$10^8$	$10^2$	$10^4$	$10^4$	$10^3$	$10^5$	$10^6$	$10^2$	$10^4$	$10^2$	$10^3$	$10^3$	$10^2$
<i>Rhizoctonia</i>	$10^6$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^3$	$10^2$	-	$10^3$	$10^2$	$10^2$	-	$10^4$	$10^3$
<i>Phytophthora</i>	$10^8$	$10^5$	$10^4$	$10^4$	$10^2$	$10^2$	-	$10^3$	$10^3$	$10^2$	-	$10^3$	$10^3$
<i>Penicillium</i>	$10^8$	$10^2$	$10^2$	$10^3$	$10^3$	$10^5$	$10^2$	$10^2$	$10^3$	$10^2$	$10^2$	$10^2$	$10^2$
<i>Fusarium</i>	$10^6$	$10^4$	$10^3$	$10^4$	$10^2$	$10^4$	$10^3$	$10^3$	$10^3$	$10^2$	$10^3$	$10^2$	$10^3$
Штамм № 1					$10^6$	$10^7$	$10^{10}$			$10^7$	$10^7$		
Штамм № 2										$10^6$	$10^5$		

**Заключение**

Проведенные исследования показывают перспективность использования штаммовых культур грибов-сапрофитов совместно с сельскохозяйственными препаратами. По результатам исследования восстано-

вительной способности биологического состояния почвы, загрязненной нефтью, на разложение углеводов нефти наиболее эффективно влияют штаммы *Phoma eurygena* и *Serpaliophora tropica* на фоне препарата «Альбит».

### Список литературы

1. Злотников А.К. Биопрепарат Альбит для повышения урожая и защиты сельскохозяйственных культур. – Подольск: ПФОП, 2006.

2. Биоремедиация черноземной почвы, загрязненной нефтью / Э.В. Карасева, И.Е. Гирич, А.А. Худоков, Н.Ю. Алешина, С.Г. Карасев // Биотехнология. – 2005. – № 2.

3. Красавин А.П. Способ биологической ремедиации нефтеразличных почв / А.П. Красавин, И.В. Катаева, Г.А. Оборин. – 2006. Россия № 2290270 – С. 108.

4. Назаров А.В., Иларионов С.А. Потенциал использования микробно-растительного взаимодействия для биоремедиации // Биотехнология. – 2005. – № 5.

5. Рахимова Э.Р., Осипова А.Л., Зарипова С.К. Очистка почвы от нефтяного загрязнения с использованием денитрифицирующих углеводородокисляющих их микроорганизмов // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – Т. 40. – № 6.

6. Саттон Д., Фотергилл А., Ринальди М. Определитель патогенных и условно патогенных грибов. – М., 2001. – 468 с.

7. Агрохимия / Б.А. Ягодин, П.М. Смирнов, А.В. Петербургский и др.; под ред. Б.А. Ягодина. – 2-е изд. перераб. и доп. – М.: Агропромиздат, 1989. – 639 с. – (Учебник и учеб. пособие для студентов высш. учеб. заведений).

### References

1. Zlotnikov A.K. Biopreparat Al'bit dlja povysheniya urozhaja i zashchity sel'skhozajstvennyh kul'tur. Podol'sk: PFO, 2006.

2. Karaseva Je.V., Girich I.E., Hudokormov A.A., Aleshina N.Ju., Karase S.G. Bioremediacija chernozemnoj pochvy, zagraznennoj neft'ju // Biotehnologija. 2005. no. 2.

3. Krasavin A.P. Sposob biologicheskoy remediacii nefterazlichnyh poch / Krasavin A.P., Kataeva I.V., Oborin G.A. 2006. Rossija no. 2290270 pp. 108.

4. Nazarov A.V., Ilarionov S.A. Potencial ispol'zovanija mikrobno-rastitel'nogo vzaimodejstvija dlja bioremediacii // Biotehnologija. 2005. no. 5.

5. Rahimova Je.R., Osipova A.L., Zaripova S.K. Ochistka pochvy ot nefljanogo zagraznenija s ispol'zovaniem denitricirujushhh uglevodorodokisljajushhh ih mikroorganizmov // Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. 2004. T.40. no. 6.

6. Satton D., Fotergill A., Rinal'di M. Opredelitel' patogennyh i uslovno patogennyh gribov. M.: 2001 468 p.

7. Jagodin B.A., Smirnov P.M., Peterburgskij A.V. i dr.; Agrohimiya Pod red. B.A. Jagodina. 2-e izd. pererab i dop. M.: Agropromizdat, 1989. 639 p. (Uchebnik i ucheb. posobie dlja studentov vyssh. ucheb. zavedenij).

### Рецензенты:

Глушков В.А., д.х.н., доцент, ФГБУН «Институт технической химии УфО РАН», г. Пермь;

Леснов А.Е., д.х.н., профессор кафедры экологии Пермской государственной сельскохозяйственной академии имени академика Д.Н. Прянишникова, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 22.04.2013.