

УДК 504.53.062.4:595.1:579.2

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ РЕКУЛЬТИВАЦИЯ ПОЧВ, ЗАГРЯЗНЕННЫХ ОТРАБОТАННЫМ АВТОМОБИЛЬНЫМ МАСЛОМ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДОЖДЕВЫХ ЧЕРВЕЙ *EISENIA ANDREI* И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Чачина С.Б., Райман С.А.

ФГБОУ ВПО «Омский государственный технический университет», Омск, e-mail: ksb3@yandex.ru

Изучена эффективность биоремедиации в почве, загрязненной отработанным автомобильным маслом в количестве 40-100 г/кг, при использовании дождевых червей *E. andrei*, в присутствии бактерий *Pseudomonas*, азотфиксирующих бактерий *Azotobacter* и *Clostridium*, дрожжей *Saccharomyces*, грибов *Aspergillus* и *Penicillium*, Actinomycetales, входящих в состав биологических препаратов «Байкал ЭМ 1» и «Тамир». Показано, что после 18 недель выдержки образцов загрязненной маслом почвы, содержащей червей и бактерии, количество углеводов в почве снизилось на 61-80%.

**Ключевые слова:** дождевые черви, *Eisenia andrei*, биологическая рекультивация, удаление нефтяных углеводов, загрязнение почвы

## BIOLOGICAL REMEDIATION OF SOILS CONTAMINATED WITH SPENT AUTOMOBILE ENGINE OIL USING EARTHWORM *EISENIA ANDREI* AND MICROBIOLOGICAL AGENTS

Chachina S.B., Rayman S.A.

Omsk State Technical University, Omsk, e-mail: ksb3@yandex.ru

We have studied the effectiveness of bioremediation of soil contaminated spent automobile engine oil in an amount of 40-100 g/kg, when using earthworm *E. andrei*, in the presence of the bacteria *Pseudomonas*, Azotobacter nitrogen-fixing bacteria *Azotobacter* and *Clostridium*, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus* and *Penicillium*, Actinomycetales, included in the composition of biological agents «Baikal EM 1» and «Tамир». It was shown that after 18 weeks of exposure oily soil samples containing bacteria and worms, the amount of hydrocarbons in the soil decreased by 61-80%.

**Keywords:** earthworms, *Eisenia andrei*, biological recultivation, removal of petroleum hydrocarbons, soil contamination

При загрязнении нефтью наблюдается нарушение физических, химических и биологических свойств почв. Почва, пропитанная нефтью, становится токсичной и на многие годы теряет плодородие. Самоочищение почвы от нефтезагрязнений может происходить в течение многих десятилетий [1].

Стандартные методы ремедиации почв, отравленных нефтепродуктами, например сжигание и захоронение, не только опасны с экологической точки зрения, но и обладают крайне низкой эффективностью. По этой причине крайне актуален поиск средств и способов рекультивации нефтезагрязненных почв, не заключающих в себе опасности для среды обитания человека.

Недавно был использован термин «вермиремедиация» для обозначения использования дождевых червей при удалении загрязнений из почвы или когда дождевые черви способствуют разложению неразлагаемых отходов [6]. Положительный эффект дождевых червей при удалении загрязняющих веществ, таких как нефть, ПАУ, ПХБ, пестицидов и тяжелых металлов наблюдался несколькими авторами [8, 4].

Также для ликвидации последствий нефтезагрязнений применяют биопрепараты, в которых имеется комплекс специально подобранных нефтеокисляющих бактериальных культур. Данная технология позволяет добиться максимальной деградации нефтепродуктов до экологически безвредных веществ, не требует применения дорогостоящих реагентов и нефтесорбентов, одновременно способствуя восстановлению биологических свойств рекультивированных субстратов [2].

Дождевые черви могут выжить при высоких концентрациях загрязняющих веществ, например, *E. andrei* выжил в почве, загрязненной 100 мг карбенадцим кг<sup>-1</sup>. Поэтому они могут быть использованы для ремедиации загрязненных почв, хотя выживание зависит от продолжительности экспозиции и метаболомика предполагает, что их метаболическая активность может измениться [3] или их ДНК может быть повреждена [5].

Natal-Da-Luz и др. использовали колонки грунта с добавлением осадков, загрязненных ПАУ (общей концентрации 18,2 мг кг<sup>-1</sup>)

и применили *E. andrei* при высокой (1000 особей м<sup>-2</sup>) и низкой (250 особей м<sup>-2</sup>) плотностях на 126 дней [7]. Они наблюдали высокую выживаемость (87,5%) и 17,3% потерянному весу по сравнению с первоначальным весом дождевых червей после 126 дней.

Таким образом, проведенный анализ литературы показывает, что использование дождевых червей *E. andrei* для биоремедиации загрязненных почв является эффективным приемом. Учитывая вышеизложенное, задачей настоящего исследования было изучение эффективности биоремедиации нефтезагрязненной почвы при использовании дождевых червей *E. andrei* в присутствии биопрепаратов «Байкал ЭМ 1» и «Тамир» в почве, загрязненной различными концентрациями масла (от 40 г/кг до 100 г/кг).

## Материалы и методы исследования

### *Виды дождевых червей*

Для проведения вермиремедиации загрязненной почвой были выбраны дождевые (навозные) черви *Eisenia andrei*. В эксперименте использовались только половозрелые особи. Взрослые особи были приобретены в ЛПХ Ермак (Россия, г. Саратов). Средняя масса червей составляла 0,5-0,9 г.

### *Микробиологический препарат*

В качестве источника молочнокислых, азотфиксирующих бактерий использовали биопрепарат «Байкал ЭМ 1» (изготовлен ООО «НПО ЭМ-Центр», Россия (номер государственной регистрации 226-19.156-1)), биопрепарат «Тамир» (изготовлен ООО «НПО ЭМ-Центр», Россия (номер государственной регистрации 77.01.03.929)), в количестве 5 мл на 1 кг субстрата при уровне загрязнения нефтепродуктами выше 40 г/кг почвы. Биопрепараты содержат большое количество микроорганизмов, обитающих в почве: молочнокислые, азотфиксирующие, нитрифицирующие бактерии, актиномицеты, дрожжи и ферментирующие грибы.

Биологически активный препарат «Тамир» (серии ЭМ) предназначен для утилизации органических отходов. Применение его широко, от возрождения плодородия почвы до утилизации органических отходов. Препарат «Тамир» – это живое сообщество 86 полезных почвенных микроорганизмов с усиленной способностью к переработке и ферментации органических отходов.

Применение ЭМ-препаратов позволяет решать проблемы загрязнения окружающей среды и других негативных последствий индустриализации естественными методами. ЭМ-препараты существенно улучшают экологическое состояние биосферы.

### *Почвенный субстрат*

Тест-субстратом для трех экспериментов была черноземная почва ЗАО «СибНИИСхоз». Почва была загрязнена в эксперименте отработанным автомобильным маслом (минимальная концентрация – 40 г/кг, максимальная – 100 г/кг).

Состав субстрата: содержание гумуса – 6,5%, азот общий – 0,3%, фосфор валовый – 1980 мг/кг, фосфор подвижный – 92 мг/кг, калий обменный – 420 г/кг, рН – 6,45.

Всего было подготовлено 2 серии образцов загрязненных почв.

В образцах серии 1, для получения образцов загрязненных почв, в почву было добавлено отработанное автомобильное масло в количестве 40-100 г/кг с внесением червей *E. andrei* и микробиологического препарата «Байкал ЭМ 1».

В образцах серии 2, для получения образцов загрязненных почв, в почву было добавлено отработанное автомобильное масло в количестве 40-100 г/кг с внесением червей *E. andrei* и микробиологического препарата «Тамир».

### *Подготовка образцов почвы*

В полипропиленовые емкости объемом 2 литра на дно укладывали дренаж. В качестве дренажа использовался керамзит с диаметром частиц 2 см, на дренаж насыпали слой почвы толщиной 15 см (1 кг). В каждую емкость вносили по 10 половозрелых червей. На протяжении всего эксперимента почву увлажняли один раз в неделю, добавляя в каждую емкость по 100 мл дистиллированной воды. Сосуды с почвой накрывали хлопчатобумажной тканью. Червей подкармливали свежим тертым картофелем по 5 г 1 раз в неделю. Червей инкубировали при температуре 15°C в течение 5 месяцев. Инкубирование экспериментальных образцов загрязненных почв с введенными червями и добавлением микробиологического препарата, а также контрольных образцов почвы, проводилось в течение 7 месяцев – с ноября 2014 г. по май 2015 г.

*Определение содержания нефтепродуктов и органических веществ в загрязненных инкубированных почвах.*

Отбор проб из образцов почвы, загрязненных нефтепродуктами, для анализа содержания нефтепродуктов и органических веществ в образцах проводили по ГОСТ Р 54039-2010. Качество почв.

Экспресс-метод спектроскопии в ближней инфракрасной области для определения содержания нефтепродуктов.

Почву размалывали в ступке. Из размолотой почвы отбирали пробу массой 3 – 5 г и дополнительно измельчали до размера частиц менее 0,3 мм и просеивали через сито с размерами ячеек 0,25 мм.

Для определения содержания нефтепродуктов в почве была использована методика, предложенная институтом экспериментальной метрологии. Данная методика основана на определении количества углеводов, экстрагированных четыреххлористым углеродом из загрязненной почвы. Полученный элюат заливали в кювету ИК-спектрофотометра ИКН-025 и определяли количество нефтепродуктов в элюате при длине волны 3,42 мкм.

Полученные результаты были обработаны с использованием рангового метода Фишера с использованием лицензионной программы «Статистика».

## Результаты исследования и их обсуждение

*Изменение количества червей при внесении различных концентраций масла.*

### *Исследование выживаемости*

*Общая численность E. andrei и микробиологический препарат «Байкал ЭМ 1».*

В контрольном варианте общая численность *E. andrei* увеличилась в 1,5 раза, а при внесении биопрепарата «Байкал ЭМ 1» в 2,5 раза. В варианте с концентрацией

масла 40 г/кг и биопрепаратом выживаемость червей составила 90%, и общая численность составила 9 экз/сосуд. В варианте с концентрацией масла 60 г/кг и биопрепаратом выживаемость червей составила 46% на 16 неделе исследования, и общая численность составила 4,6 экз/сосуд. В варианте с концентрацией масла 80 г/кг и биопрепаратом выживаемость червей составила 36% на 16 неделе исследования, и общая численность составила 3,6 экз/сосуд. А при концентрации масла 100 г/кг выживаемость на 16 неделе составила 23%, и общая численность составила 2,3 экз/сосуд.

*Общая численность E. andrei и микробиологический препарат «Тамир».*

В контрольном варианте общая численность *E. andrei* увеличилась в 1,5 раза, а при внесении биопрепарата «Тамир» в 3,2 раза. В варианте с концентрацией масла 40 г/кг и биопрепаратом выживаемость червей

составила 100%, и общая численность составила 10,3 экз/сосуд. В варианте с концентрацией масла 60 г/кг и биопрепаратом выживаемость червей составила 70% на 16 неделе исследования, и общая численность составила 7,6 экз/сосуд. В варианте с концентрацией масла 80 г/кг и биопрепаратом выживаемость червей составила 56% на 16 неделе исследования, и общая численность составила 5,6 экз/сосуд. А при концентрации масла 100 г/кг выживаемость на 15 неделе составила 10%, но через неделю все черви погибали.

*Разложение углеводов нефтепродуктов*

На рис. 3 приведены зависимости изменения количества масла в загрязненных образцах почвы, содержащих червей *E. andrei* и биопрепараты «Байкал ЭМ 1», «Тамир», от времени инкубирования образцов при температуре 15-17°C.

Изменение общей численности *E. andrei* в процессе инкубирования загрязненных маслом почв с использованием микробиологических препаратов через 18 недель инкубирования

№ п/п	Концентрация масла, г/кг	Выживаемость, %	Общая численность
1	Контроль	100	15,66
2	Байкал	100	25,49
3	Тамир	100	32,67
4	40 г/кг + Байкал	90	9
5	60 г/кг + Байкал	46	4,67
6	80 г/кг + Байкал	36	3,67
7	100 г/кг + Байкал	23	2,33
8	40 г/кг + Тамир	100	10,33
9	60 г/кг + Тамир	66	7,67
10	80 г/кг + Тамир	56	5,67
11	100 г/кг + Тамир	10	0

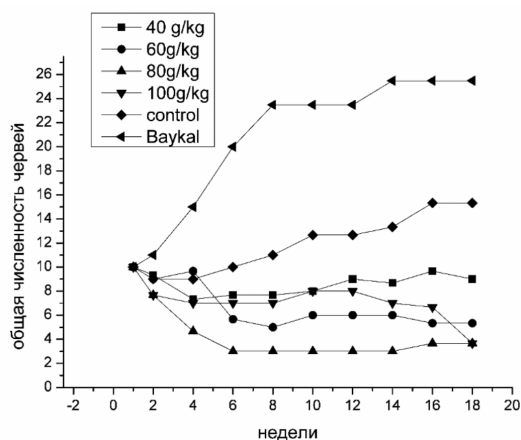


Рис. 1. Общая численность *E. andrei* и микробиологический препарат «Байкал ЭМ 1»

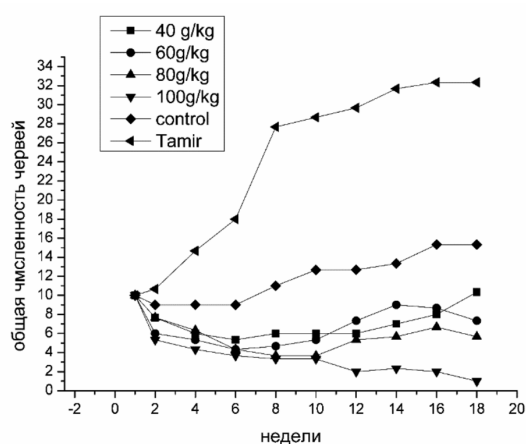


Рис. 2. Общая численность *E. andrei* и микробиологический препарат «Тамир»

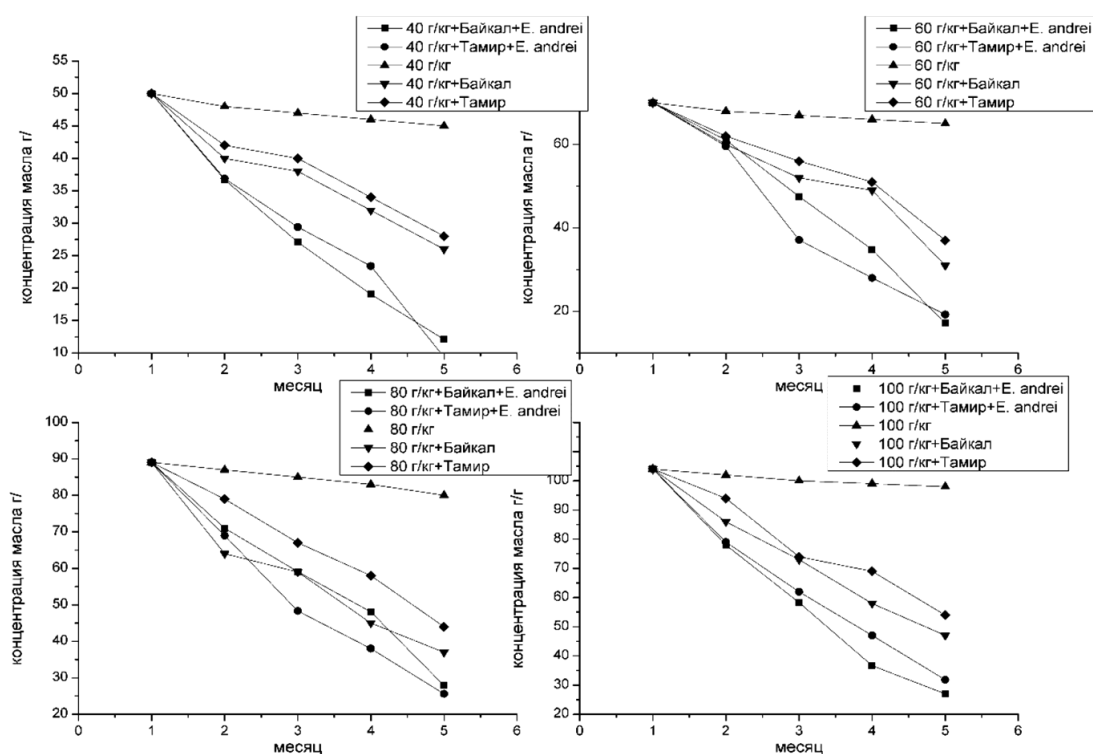


Рис. 3. Изменение концентрации масла в процессе вермикюльтивирования

Максимальное время инкубирования составляло 18 недель. Содержание углеводов в почве определяли колориметрическим методом ежемесячно. Как видно из рис. 3, для загрязненных образцов с концентрацией масла 40 г/кг, содержащих червей, биоремедиация почвы протекает более интенсивно при внесении биопрепарата «Тамир».

В контрольном варианте при внесении масла в почву в количестве 40 г/кг значительного снижения концентрации углеводов в почве не наблюдалось. В течение 4 месяцев содержание нефтепродуктов в почве снизилось до 35 г/кг. При введении в почву биопрепарата «Байкал ЭМ 1» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 5 раз до 12,1 г/кг (эффективность 73%). При введении в почву биопрепарата «Тамир» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 4,5 раза до 9,37 г/кг (эффективность 79%).

В контрольном варианте при внесении масла в почву в количестве 60 г/кг значительного снижения концентрации углеводов в почве не наблюдалось. В течение пяти месяцев содержание нефтепродуктов в почве снизилось до 55 г/кг. При введении

в почву биопрепарата «Байкал ЭМ 1» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 4,1 раза до 19,2 г/кг (эффективность 73%). А в варианте с внесением червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 2,8 раза до 24,6 г/кг (эффективность 62%). При введении в почву биопрепарата «Тамир» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 3,6 раза до 19,2 г/кг (эффективность 70%).

В контрольном варианте при внесении масла в почву в количестве 80 г/кг значительного снижения концентрации углеводов в почве не наблюдалось. В течение четырех месяцев содержание нефтепродуктов в почве снизилось до 70 г/кг. При введении в почву биопрепарата «Байкал ЭМ 1» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 3,2 раза до 27,9 г/кг (эффективность 65%). При введении в почву биопрепарата «Тамир» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 3,5 раза до 25,6 г/кг (эффективность 68%).

В контрольном варианте, при внесении масла в почву в количестве 100 г/кг значительного снижения концентрации углеводов в почве не наблюдалось. В течение пяти месяцев содержание нефтепродуктов

в почве снизилась до 88 г/кг. При введении в почву биопрепарата «Байкал ЭМ 1» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 3,8 раза до 27,04 г/кг (эффективность 72%). А в варианте с внесением червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 4,1 раза до 25,44 г/кг (эффективность 74%). При введении в почву биопрепарата «Тамир» и червей *E. andrei* концентрация масла в почве снизилась в 3,3 раза до 31,8 г/кг (эффективность 68%).

#### Заключение

Эффективность и скорость деградации масла зависит от концентрации его в почве. При внесении низких концентраций отработанного масла 20-40 г/кг почвы процесс рекультивации занимал 4 месяца, в ходе которого концентрация углеводов снижалась на 97-99%. Внесение микробиологического препарата оказывало существенное влияние на процесс деградации масла. В процессе вермикюльтивирования содержание масла снижалось на 60-90%. Наибольшая эффективность разложения отработанного автомобильного масла в почве отмечена при совместном использовании

*E. andrei* и биопрепаратов «Байкал-Эм-1» и «Тамир» (эффективность 70-80%).

#### Список литературы

1. Пиковский Ю.И. Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах / Ю.И. Пиковский // Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем. – М.: Наука, 1988. – С. 7–22.
2. Стахина Л.Д. Биодеструкция нефтяных загрязнений под действием микроорганизмов торфа / Л.Д. Стахина // Нефтепереработка и нефтехимия. – 2001. – № 5. – С. 57–61.
3. Brown S.A.E.  $^1\text{H}$  NMR metabolomics of earthworm responses to sublethal PAH exposure / S.A.E. Brown, A.J. Simpson, M.J. Simpson // Environ. Chem. – 2009. – Vol. 6. – P. 432–440.
4. Contribution of earthworms to PCB bioremediation / A.C. Singer [et al] // Soil Biol. Biochem. – 2001. – Vol. 33. – P. 765–776.
5. DNA damage and repair process in earthworm after in vivo and in vitro exposure to soils irrigated by wastewaters / M. Qiao [et al] // Environ. Pollut. – 2007. – Vol. 148. – P. 141–147.
6. Gupta, R. Vermiremediation and nutrient recovery of non-recyclable paper waste employing *Eisenia fetida* / R. Gupta, V.K. Garg // J. Hazard. Mater. – 2009. – Vol. 162. – P. 430–439.
7. Influence of earthworm activity on microbial communities related with the degradation of persistent pollutants / T. Natal-Da-Luz [et al] // Environ. Toxicol. Chem. – 2012. – Vol. 31. – P. 794–803.
8. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil / F. Binet [et al] // Soil Biol. Biochem. – 2006. – Vol. 38. – P. 1255–1263.