

Водянова Мария Александровна

**ЭКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СПОСОБОВ  
БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЁННЫХ ПОЧВ СЕЛИТЕЛЬНЫХ  
ТЕРРИТОРИЙ**

14.02.01 – Гигиена

03.02.08 – Экология (биологические науки)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в лаборатории гигиены почвы, лаборатории физико-химических исследований, лаборатории генетического мониторинга и санитарной микробиологии и паразитологии федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Научные руководители:**

кандидат медицинских наук  
кандидат химических наук, доцент

Крятов Игорь Александрович  
Хабарова Елена Ивановна

**Официальные оппоненты:**

Ведущий научный сотрудник  
Лаборатории эколого-гигиенической оценки  
и прогнозирования токсичности веществ,  
доктор медицинских наук, профессор  
ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н.Сысина»  
Минздрава России

Жолдакова Зоя Ильинична

Заведующий кафедры экологии  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего  
профессионального образования  
«Владимирский государственный университет  
имени Александра Григорьевича и  
Николая Григорьевича Столетовых»,  
доктор биологических наук, профессор

Трифонова Татьяна Анатольевна

**Ведущая организация:** ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова  
Минздрава России

Защита диссертации состоится «24» октября 2013 г. в 11<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 208.133.01 в федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119992, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, строение 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России.

Автореферат разослан «    » сентября 2013 года.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор биологических наук,  
профессор

Беляева Наталия Николаевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Одним из компонентов окружающей среды, постоянно подвергающимся масштабному негативному воздействию, является почва. Важным и опасным приоритетным загрязнителем городской почвы являются нефтяные углеводороды (НУВ) [Русаков и соавт., 2007]. Как показывают многолетние исследования, содержание НУВ в городских почвах г. Москвы колеблется в значительных пределах: от 0,010 мг/кг до 1000 мг/кг [Карцева Н.Ю., 2006], а иногда и до 6000 мг/кг [Вардомская Е.Е., 2008].

Анализ литературы показал, что нефтяные углеводороды и продукты их трансформации оказывают негативное воздействие на окружающую среду и здоровье населения [Амирова И.А., 2003, Леденцова Е.Е., 2003, Сабирова З.Ф., 2000, Жолдакова З.И., 2006]. Немаловажным аспектом является и то, что с ухудшением самоочищающей способности, возрастает эпидемическая опасность почвы.

Для осуществления комплексного подхода к задаче оздоровления городских почв Департаментом природопользования и охраны окружающей среды г. Москвы реализуется Программа первоочередных мероприятий по оздоровлению почв города и рекультивации участков с интенсивным загрязнением. Начиная с 2011 года, ведется работа над проектом постановления Правительства Москвы «О создании системы управления качеством почв города Москвы» и по внесению изменений в Закон города Москвы «О городских почвах» от 04.07.2007 № 31 [Доклад о состоянии окружающей среды в городе Москве в 2011 году, 2012].

В зависимости от характера загрязнения территории предусматривается полная замена грунта или подсыпка. Ведутся работы по оздоровлению почв путем замены зараженных поверхностных слоев на произведенные почвогрунты. Однако с 2011 года в городе Москве действует временная схема закупки почвогрунтов для нужд города, не предусматривающая централизованной закупки. В связи с этим выборочный контроль в момент поставок почвогрунтов на объекты не проводится.

Принятие решений по дорогостоящему вывозу на полигоны загрязненных почв не всегда является оправданным. Необходим поиск более рационального подхода к сохранению почвенного покрова территории г. Москвы. В отечественной практике встречаются данные об использовании биоремедиации загрязненных городских почв на месте, без замены грунта. Однако оценка степени эффективности использования препаратов-биодеструкторов НУВ для почв селитебных территорий г. Москвы и выявление потенциальной опасности биодеструкции НУВ для компонентов окружающей среды селитебных территорий не изучены.

В связи с вышеизложенным, **целью** настоящего исследования явилось обоснование эколого-гигиенических индикаторных показателей и критериев оценки степени возможного негативного влияния почв, загрязнённых НУВ, на окружающую среду и целесообразность применения биоремедиации для почв селитебных зон урботерриторий.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Провести комплексную экологическую оценку загрязнения урботерриторий от автотранспорта и других источников загрязнения НУВ, например, состояния почв некоторых селитебных зон города Москвы.
2. Выявить особенности влияния различных концентраций НУВ на почвенные микроорганизмы и специфику микрофлоры почв, загрязнённых НУВ, в присутствии биодеградатора и без него.
3. Провести эколого-гигиеническую оценку целесообразности и эффективности использования биодеструкторов на территории селитебных зон.
4. Определить алгоритм проведения исследований по изучению степени опасности почв, загрязненных НУВ, селитебных зон урботерриторий и возможности применения биодеструкторов.
5. Провести оценку возможной эколого-гигиенической опасности нефтяных углеводородов, образующихся в процессе биодеструкции.

### **Научная новизна.**

Обоснован новый эколого-гигиенический критерий, определяющий условия рекультивации почв селитебных территорий, - 300 мг НУВ/кг почвы.

Установлено, что НУВ в концентрации до 1000 мг/кг почвы оказывают незначительное угнетающее действие на естественный микробоценоз почвы.

Установлено, что антагонистический характер взаимодействия почвенного микробоценоза и *E.coli* сохраняется и в присутствии загрязнения НУВ.

Установлен характер влияния почв, загрязненных НУВ, в двух диапазонах концентраций:  $\geq 300$  – токсическое,  $\leq 500$  – генотоксическое в тесте на индукцию доминантных летальных мутаций дрозофилы и вегетационном опыте.

Обоснована пороговая концентрация генотоксического действия для почв, загрязненных НУВ, на уровне 500 мг/кг.

Выявлено сокращение жизненного цикла *E.coli* в почве, загрязненной НУВ в концентрациях менее 300 мг/кг, под влиянием биодеструктора.

Обоснована модель изучения влияния НУВ на почву селитебных территорий и оценки безопасности применения биодеструкторов НУВ с использованием вегетационного опыта на растениях несельскохозяйственного назначения.

### **Методическая новизна.**

Предложены эколого-гигиенические чувствительные и наиболее информативные индикаторные показатели для ранней диагностики почв, загрязненных НУВ, на уровне менее 1000 мг/кг.

Предложена схема экспериментальных исследований по проведению комплексной эколого-гигиенической оценки новых биодеструкторов НУВ, планируемых для использования на почвах селитебных территорий, загрязненных НУВ, в концентрациях менее 1000 мг/кг.

Разработана краткая и расширенная схемы оценки эколого-гигиенического состояния почв, загрязненных нефтяными углеводородами.

Предложена методика оценки возможной эколого-гигиенической опасности нефтяных углеводородов, образующихся в процессе биодеструкции на основе *Drosophila melanogaster*.

#### **Практическая значимость.**

Разработан проект Методических рекомендаций «Руководство по оценке степени опасности почвы, загрязнённой нефтяными углеводородами» (Справка № 03-3/529 от 04.09.2013 г.).

Подготовлено учебно-методическое пособие, актуальное в образовательном процессе учебного курса «Основы токсикологии» МГГУ (Справка МГГУ об использовании материалов диссертационной работы Водяновой М.А. в учебном процессе от 04.09.2013 г.).

**Апробация материалов диссертации.** Материалы диссертации представлены на следующих конференциях: Международная научно-практическая конференция «Дальневосточная весна – 2008» в области экологии и безопасности жизнедеятельности. (Комсомольск-на-Амуре, ГОУВПО, 30 апреля 2008 г.); «Неделя горняка – 2008» (Москва, январь 2008 г.); VII международная конференция «Ресурсовоспроизводящие, малоотходные и природоохранные технологии освоения недр» (Москва – Ереван, 15 – 19 сентября 2008 г.); VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития» (Киров, 25 – 27 ноября 2008 г.); «Экологические проблемы промышленных городов» (Саратов, 2009 г.); «Неделя горняка – 2009» (Москва, январь 2009 г.); XV Международная конференция «Образование в интересах устойчивого развития» (Россия, Санкт-Петербург, 27 – 28 июня 2009 г.); III Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье» (Россия, Москва, 28 июня – 1 июля 2009 г.); Первый Московский молодёжный Форум «Экология Москвы и молодёжная экологическая политика в действии» (Москва, 4-5 декабря 2009 г.); Международная научно-практическая конференция «Биотехнология: Экология

крупных городов (Москва, 15-17 марта 2010 г.); IV Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов с международным участием «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» 27-28 сентября 2012 г., г. Москва; Всероссийская конференция молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» 24-28 сентября 2012 г., г. Саратов; Международная конференция "Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред" 4-6 февраля 2013 г., Москва; Международная научно-практическая конференция "Актуальные проблемы экологии и природопользования" 4-6 апреля 2013 г., Москва.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

Доказательства эколого-гигиенической опасности почв селитебных территорий г. Москвы по физико-химическим и санитарно-микробиологическим показателям.

Обоснование минимально действующей концентрации по самоочищающей способности почвы на уровне – 300 мг/кг.

Использование биодеструктора на почвах селитебных территорий, загрязненных НУВ, целесообразно в концентрации менее 300 мг/кг.

Схема экспериментальных исследований по проведению комплексной эколого-гигиенической оценки новых биодеструкторов НУВ, планируемых для использования на почвах селитебных территорий, загрязненных НУВ в концентрациях менее 1000 мг/кг.

**Личный вклад** автора составил более 80%. Работа выполнена в лабораториях гигиены почвы, физико-химических исследований, генетического мониторинга и санитарной микробиологии и паразитологии ФГБУ «НИИ ЭЧ и ГОС им. А.Н. Сысина» Минздрава России. Ряд исследований проведен совместно с Институтом медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского ММА им. И.М.Сеченова Минздрава России.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе, 4 в журналах, рекомендованных ВАК.

**Структура работы.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка литературы, приложений. Текст изложен на 157 страницах машинописи, содержит 44 рисунка, 30 таблиц, 4 приложения. Библиография включает 156 источника, в том числе 31 иностранный автор.

### **ОБЪЕКТЫ, МЕТОДЫ И ОБЪЕМ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для изучения состояния городских почв и оценки влияния на них НУВ проводились натурные исследования на почвах селитебных зон г. Москвы включающие оценку экологической обстановки территории, оценку по общесанитарному и физико-химическому показателям вредности. С 2009 по 2012 гг. проведен ежегодный мониторинг почв детских игровых площадок ЦАО г. Москвы района Хамовники, площадью 950 га, в два периода: весна – осень.

Модельные экспериментальные исследования проводились на наиболее распространенной в России (52%) дерновоподзолистой среднесуглинистой почве. Изучалось воздействие смеси Западносибирских нефтей, товарного качества, плотностью (при  $t = 15\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 0,8765 г/л, содержанием серы 1,67 %, солей – 0,04 %, обводненностью – 0,12 %. Концентрации для экспериментальных исследований подбирались в диапазоне от 100 мг НУВ /кг почвы до 10000 мг НУВ/кг почвы.

Для изучения процессов самоочищения почвы от НУВ и оценки почвенной активности был поставлен эксперимент с использованием *E.coli* (штамм 1257).

Учет НУВ в почве проводился в соответствии с МУК 4.1.1956-05 «Определение концентрации нефти в почве методом инфракрасной спектrophотометрии».

Исследования по биодеструкции НУВ в почве проводили на примере микробно-ферментного реагента Микрозим (тм) «Петро Трит» (ПТР).

Наблюдение за модельными растениями в вегетационном опыте проводилось с использованием газонной травы, срок наблюдения – два вегетационных периода, разница между которыми составила 37 суток.



Объемы и методы исследований представлены в таблице 1.

Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований проведена с использованием пакетов стандартных компьютерных программ Excel 7.0, Statistica 8.0.

Таблица 1

Объекты, методы и объем исследований

№ п/п	Направление исследований	Число определений
1	<i>Модельные эксперименты по изучению влияния НУВ на почву с применением биодеградатора</i>	
	1.1. Тестирование с использованием гидробионтов	756
	1.2. Фитотестирование:	
	1.2.1. Проростки овса	252
	1.2.2. Высшие растения	72
	1.3. Тестирование с использованием КСБ	580
	1.4. Оценка потенциальной генотоксичности	84
	1.5. Физико-химические методы исследования	84
2	1.6. Санитарно-микробиологические методы исследования	504
	<i>Мониторинговые исследования почв селитебных территорий</i>	
	2.1. Тестирование с использованием гидробионтов	430
	2.2. Фитотестирование:	
	2.2.1. Проростки овса	240
	2.3. Тестирование с использованием КСБ	400
	2.4. Физико-химические методы исследования	80
2.5. Санитарно-микробиологические методы исследования	720	
3	<i>Модельные эксперименты по изучению суммарной мутагенной активности почв, загрязнённой НУВ,</i>	
	3.1. Оценка суммарной мутагенной активности (СМА) ацетоновых и водных экстрактов модельных образцов почвы, загрязненных НУВ,	192
4	<i>Модельный эксперимент по изучению влияния почвы, загрязнённой НУВ, на развитие цист лямблий, аскариды человеческой и кишечную палочку (E.coli)</i>	
	4.1. Санитарно-микробиологические методы исследования	400
	4.2. Паразитологические методы исследования	90
5	<i>Определение концентрации нефти в почве</i>	96
	Итого	4980

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Изучение эколого-гигиенического состояния почв г. Москвы

В почвах детских игровых площадок района Хамовники ЦАО происходит накопление НУВ. Как видно из таблицы 2, демонтаж производственных объектов, располагавшихся на территории района Хамовники ЦАО, снизил уровень НУВ в ряде исследованных почв.

Таблица 2

Содержание НУВ в исследуемых образцах почвы, мг/кг

Место отбора проб	Содержание НУВ в почве, мг/кг в динамике				
	2006	2009	Весна 2010	Осень 2010	Весна 2011
Погодинская ул. 9	712	210	53,4	80,87	120
Кооперативная 2/12	1755	640	94,0	262,37	177
3-я Фрунзенская ул. 12	798	944	33,3	157,5	265
Несвижский пер. 4-6	161	125	13,9	73,25	192,5
Новодевичий пр-д, 4	155	83	30,9	57,12	220
Ул. Остоженка, 38	-	361	38,5	-	-

В весенний период 2011 г. концентрация НУВ в почвах детских игровых площадок находилась в диапазоне 120 – 220 мг/кг, в то время как среднее содержание НУВ в почве г. Москвы за 2011 г. установлено – 266,4 мг/кг. В сравнении с 2009 и 2010 гг., Концентрации НУВ в почвах детских игровых площадок находились в диапазонах 14 – 94 мг/кг и 57 – 262 мг/кг, соответственно. При этом среднее содержание НУВ в почве г. Москвы за указанные периоды значительно не менялось. Таким образом, концентрация НУВ в почве за период 2010 – 2011 гг. варьирует от 57,13 до 265 мг/кг.

Как видно из таблицы, обнаружена аномально высокая обсеменённость почв ОКБ и *E.coli* (таблица 3).

## Санитарно-эпидемиологическая характеристика почв г. Москвы в 2011 г.

Места отбора проб	Показатели, КОЕ/г				НВЧ/50г
	ГКБ	ОКБ	<i>E. coli</i>	Фекальные энтерококки	Сальмонеллы
ул. Погодинская 9	2300	230	230	940	0
ул. Кооперативная, д. 2, к.2	23800	230	230	2300	0
ул. 3-я Фрунзенская, д. 12	23800	2300	2300	2300	0
Несвижский пр. между д.4 и 6	2300	230	0	2300	0
Новодевичий проезд, д. 4 (сквер)	238000	230	0	238000	0
ул. Остоженка, д. 38	238000	230	0	2300	0

Почвы детских игровых площадок следует отнести по бактериологическому показателю к опасным и чрезвычайно опасным, в соответствии с требованиями СанПиН 2.1.7.1287-03 «Почва, очистка населенных мест, бытовые и промышленные отходы, санитарная охрана почвы. Санитарно-эпидемиологические требования к качеству почвы». Вместе с тем, согласно Постановлению Правительства Москвы от 27.07.2004 N 514-ПП с поправками от августа 2012 г. «О повышении качества почвогрунтов в городе Москве» основанием для замены почвы является концентрация НУВ на уровне 600 мг/кг в почве. Работы по рекультивации или замене зараженных почв на исследованных участках не снижают их степень опасности, что, в свою очередь, повышает риск возникновения эпидемически опасных заболеваний.

**Влияние почв, загрязненных НУВ, на развитие  
возбудителей инвазионных заболеваний**

Результаты мониторинга почв по г. Москве показали, что почвы селитебных зон г. Москвы в период с 2005 по 2011 гг. остаются значительно загрязненными биологическими агентами: геогельминтами, что создает прямую угрозу заражения людей, особенно детей, имеющих прямой контакт с почвой

(игровые площадки, песочницы), кишечными инфекциями и глистными инвазиями (Русаков Н.В. с соавт., 2007 г.).

В модельном эксперименте при концентрациях НУВ 100-500 мг/кг в почве жизненный цикл гельминтов в почве не отличался от контрольного образца. Угнетение наблюдалось только при высоких концентрациях НУВ в почве (5000-10000 мг/кг).

### **Изучение самоочищающей способности почв, загрязненных НУВ**

Выявлено, что значительная активизация аборигенной микрофлоры происходит к 21-м суткам эксперимента – естественному отмиранию *E.coli*. В образцах с концентрациями НУВ 300 и 400 мг/кг почвы зафиксировано продление жизненного цикла *E.coli* в сравнении с контролем до 28-х суток эксперимента. Концентрации НУВ 100 и 200 мг/кг почвы не изменяют жизненный цикл *E.coli* по сравнению с контролем.

Таким образом, выявлен антагонистический принцип взаимодействия *E.coli* с сапротрофными бактериями в исследуемых образцах, а также установлено, что концентрация НУВ в почве на уровне 300 мг/кг нарушает функцию самоочищения почвы.

Изученные концентрации НУВ в почве не оказали влияния на количественный состав почвенных грибов и не выявили достоверных эффектов угнетения на *Azotobacter chroococcum*.

### **Оценка суммарной мутагенной активности (СМА) и потенциальной генотоксичности различных образцов почвы, загрязненных НУВ**

Ацетоновые и водные экстракты модельных образцов почв, загрязненных НУВ, в концентрациях 100; 300; 500, 1000 и 5000 мг/кг не показали мутагенной активности в тесте Эймса на штаммах *S. typhimurium* TA 100, TA 98 и TA 97 без (СМ-) и в присутствии системы метаболической активации (СМ+).

Водные экстракты почвы, содержащей НУВ в почве в концентрациях 100-1000 мг/кг, в опыте на *Drosophila melanogaster*, снижали фертильность

самцов дрозофилы. Изученный диапазон концентраций НУВ в почве может быть разбит на два узких диапазона: 100-300 мг/кг и 500-1000 мг/кг.

Соотношение частот ранних и поздних эмбриональных леталей (РЭЛ, ПЭЛ) с уровнями, индуцированными экстрактом контрольной почвы, показано в таблице 4.

Таблица 4

Сравнение частот доминантных летальных мутаций, индуцированных экстрактами почв, содержащих НУВ, с эффектами контрольной почвы

	%РЭЛ / контрольной почвы	% РЭЛ	%ПЭЛ / контрольной почвы	%ПЭЛ
Лабораторный контроль	0,82		0,48	
Контрольная почва	1,00		1,00	
100 мг/кг	0,58		0,16	
300 мг/кг	<b>2,56**</b> ↓		<b>1,02**</b> ↓	
500 мг/кг	0,55		0,38	
1000 мг/кг	0,85* ↓		0,66* ↓	

\*) – значимо по сравнению с эффектом меньшей дозы ( $p < 0,05$ )

\*\*\*) – значимо по сравнению с эффектом меньшей дозы ( $p < 0,01$ ).

Максимальная частота (РЭЛ) (которая в 2,5 раза превышала уровень контрольной почвы,  $X^2 = 64,69$ ) наблюдалась при экспозиции самцов мух водным экстрактом почвы, содержащей 300 мг/кг НУВ.

Частота ПЭЛ ни в одном случае не превышала уровень контрольной почвы, но закономерно увеличивалась с увеличением концентрации НУВ в почве, что доказывает наличие у НУВ генотоксической активности для половых клеток самцов мух.

#### **Изучение процессов самоочищения почв, загрязненных НУВ, под действием биодеструктора**

Изучено влияние НУВ на почвенный микробоценоз при загрязнении почв в концентрациях 100, 200, 300, 400, 500, 1000 и 10000 мг/кг в присутствии биодеструктора в концентрациях К – 0,04 г/кг; 100 – 0,04 г/кг; 200 – 0,08 г/кг;

300 – 0,12 г/кг; 400 – 0,16 г/кг; 500 – 0,2 г/кг; 1000 – 0,4 г/кг; 10000 – 4 г/кг и целенаправленной контаминацией *E.coli*.

Внесение биодеструктора проводилось в соответствии с рекомендациями по его использованию и исследуемыми концентрациями в расчете на 1 кг почвы (Инструкция по применению препарата-биодеструктора нефтяного загрязнения Микрозим (ТМ) Петро Трит. ООО «РСЭ-трейдинг», МИКРОЗИМ (ТМ), Экологическая биотехнология (ТМ), Москва, 2005. – 14 с.: ил.).

Присутствие биодеструктора в контрольной почве значительно сокращало жизненный цикл *E.coli*. Уже на 14-е сутки эксперимента колонии образующие единицы (КОЕ) *E.coli* в почве отсутствовали. Подобная динамика повторялась под действием биодеструктора в образцах с концентрациями НУВ 100-300 мг/кг, в которых отмирание *E.coli* наблюдалось на 14-е, 7-е и 7-е сутки эксперимента, соответственно.

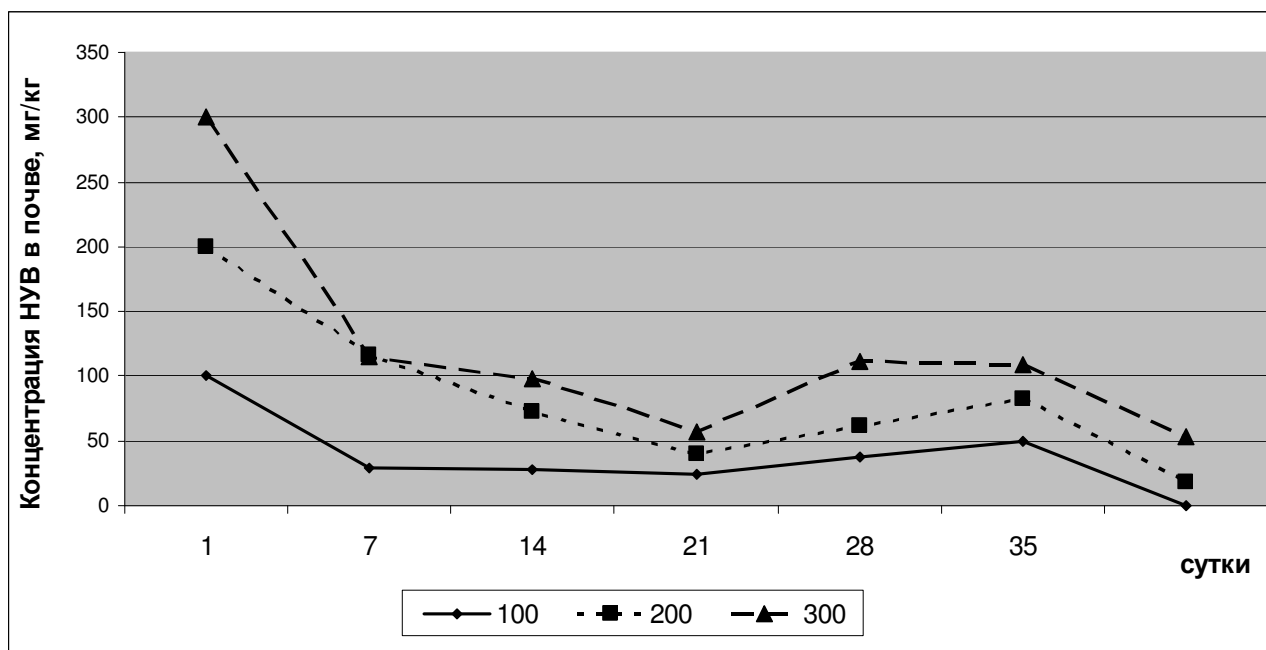
Во всех образцах, также как и в серии эксперимента без внесения биодеструктора, наблюдались антагонистические взаимодействия. Значительная активизация аборигенной микрофлоры происходила также к 21-м суткам эксперимента.

Таким образом, внесение биодеструктора в контрольную почву и почвы, загрязненные НУВ в концентрациях 100-300 мг/кг, позволило сократить жизненный цикл *E.coli* на 7-14 суток.

Под действием биодеструктора в изученных концентрациях НУВ не оказали влияния на количественный состав почвенных грибов и не выявили достоверных эффектов угнетения на *Azotobacter chroococcum*.

Максимальная эффективность разложения НУВ под действием биодеструктора наблюдалась в образцах с концентрациями 100 и 200 мг/кг в завершающий этап эксперимента, а именно: 100 и 91 %, соответственно (рисунок 1).

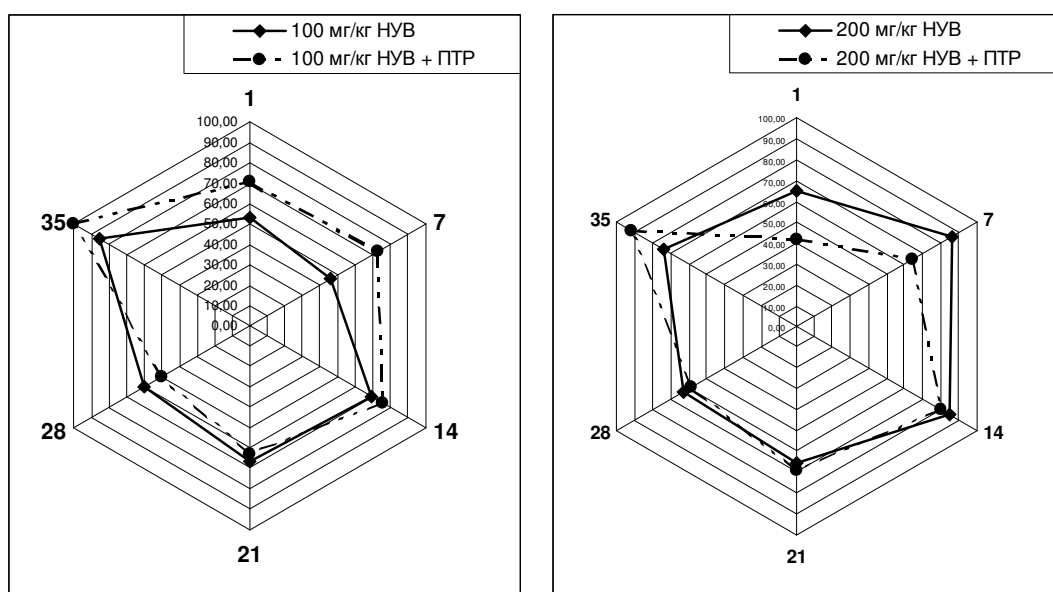
Динамика содержания НУВ в почвах в присутствии биодеградатора в концентрациях 100 – 300 мг/кг



С целью выявления оптимального диапазона концентраций, при которых целесообразно использовать биодеградатор нефтяных углеводородов, проведено сравнение полученных результатов по двум сериям эксперимента – с внесением биодеградатора и без него (рисунок 2).

Рисунок 2

Сравнительная характеристика эффективности разложения НУВ в образцах почвы под действием ПТР и без него в концентрациях НУВ 100 и 200 мг/кг



В ходе эксперимента установлена максимальная эффективность биодеструктора в концентрациях НУВ 100 и 200 мг/кг по завершении эксперимента на 35-е сутки. Начиная с концентрации НУВ в почве 300 мг/кг эффективность действия аборигенной микрофлоры и биодеструктора находится в равном диапазоне и не превышает 83 %. Минимальная эффективность отмечена в концентрации 1000 и 10000 НУВ мг/кг – 62 и 64 %, соответственно.

Хотя различия динамики деструкции НУВ при наличии биодеструктора и без него статистически не достоверно, но по истечении 35-и суток эксперимента наиболее выраженная эффективность достигнута при НУВ в концентрациях 100 и 200 мг/кг. Динамические колебания содержания НУВ в почве в процессе деструкции НУВ во всех изученных концентрациях и сериях эксперимента не противоречат как литературным данным, так и натурным исследованиям.

Таким образом, исследованный биодеструктор эффективен только при концентрации НУВ менее 200 мг/кг.

### **Сравнительная оценка токсичности НУВ в присутствии биодеструктора и без него**

Оценка сравнительной токсичности почв, загрязненных НУВ, в присутствии биодеструктора и без него проводилась по фитотоксичности, биотестированию, генотоксичности, вегетационном опыте и оценке почвенного микробоценоза.

При проведении оценки безопасности применения биодеградатора на культуре клеток млекопитающих и гидробионтах, было установлено, что логичных закономерных изменений индекса токсичности, связанных с величиной воздействующей концентрации НУВ в диапазоне 100 – 10000 мг/кг установлено не было. Все отклонения носили спонтанный характер, и не могут расцениваться как биоэффекты, характеризующие воздействие НУВ на клеточный тест-объект.

В вегетационном опыте визуальные наблюдения показали, что газонная трава под действием биодеструктора значительно выше, чем без него как в 1-ом



вегетационном периоде, так и во 2-ом. Полученные ростки более крепкие, цвет зеленый насыщенный, листья увлажнены.

Рисунок 3.

Сравнительная характеристика влияния различных концентраций нефтяных углеводородов на длину газонной травы 1-ого вегетационного периода (05.03.12 г.) в присутствии ПТР и без него, см

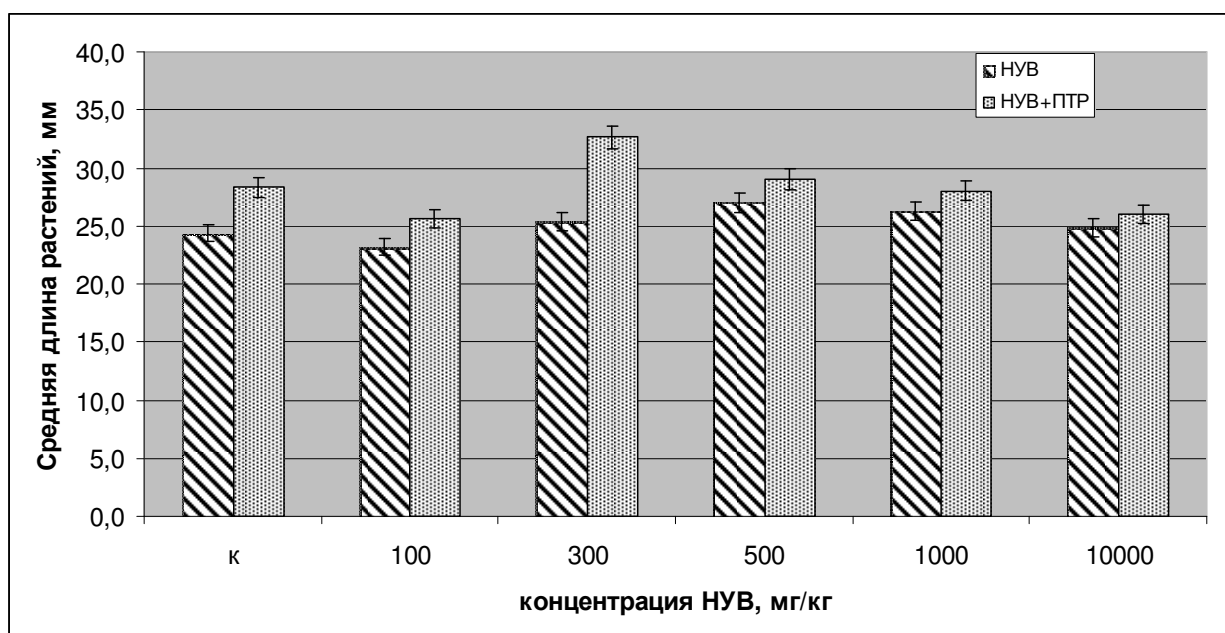
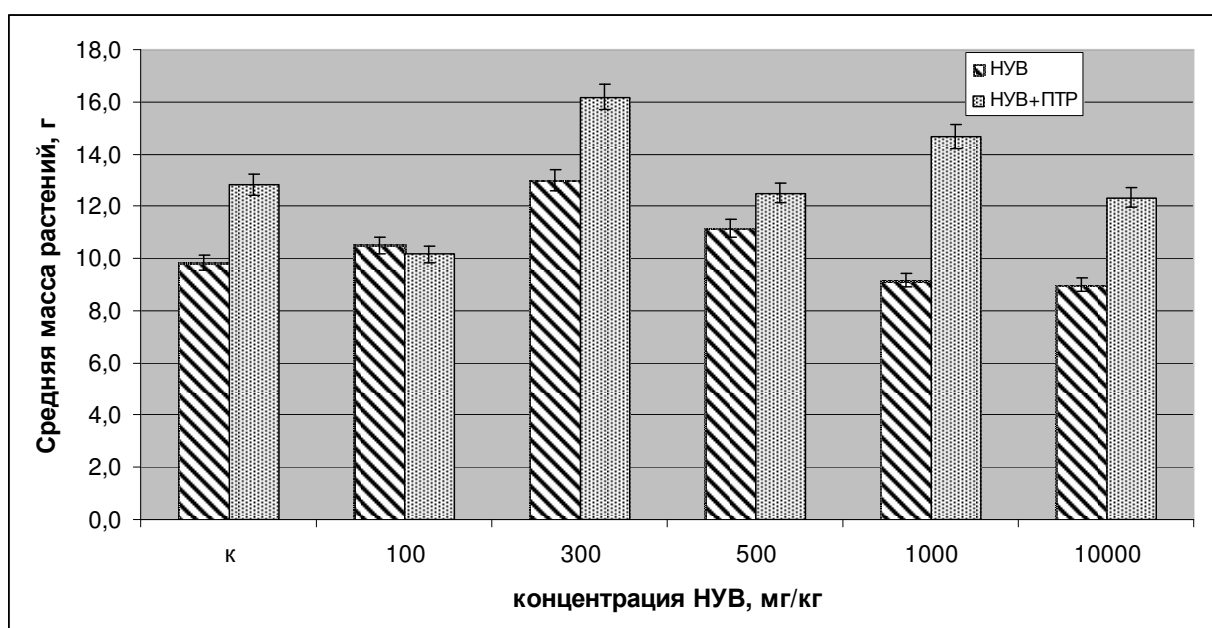


Рисунок 4.

Сравнительная характеристика влияния различных концентраций нефтяных углеводородов на массу газонной травы 1-ого вегетационного периода (05.03.12 г.) в присутствии ПТР и без него, г



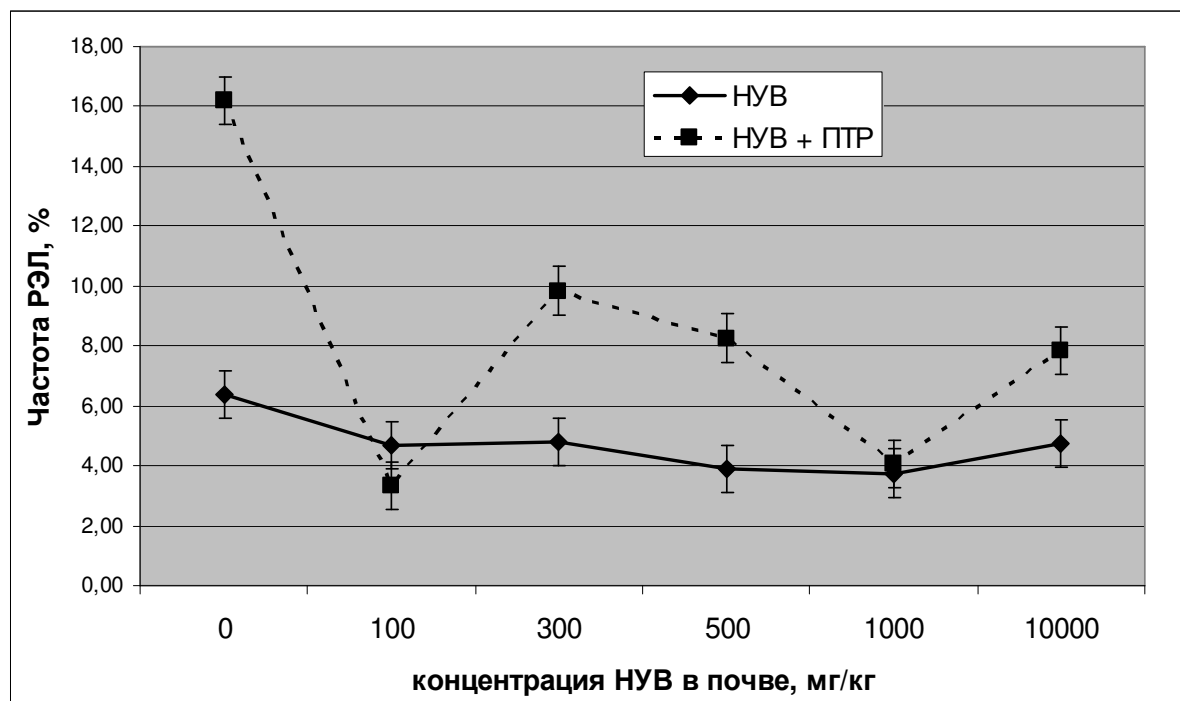
Как видно из рисунков 3, 4 концентрация НУВ 100 мг/кг не значительно угнетает длину газонной травы по сравнению с контролем. При НУВ в концентрации 300 мг/кг под действием биодеструктора масса и длина газонной травы достигают максимальных значений за весь период вегетации. Это связано с процессами деструкции НУВ и наличием доступной органики в почве для питания растений. При НУВ в концентрации 10000 мг/кг наблюдалось незначительное угнетающее действие на массу газонной травы в серии без биодеструктора и слабое угнетающее действие в образцах серии с биодеструктором.

Таким образом, исследуемый биодеструктор оказывает стимулирующее действие на рост и развитие растений при концентрации НУВ 300 – 1000 мг/кг. В концентрации НУВ 100 мг/кг оказывает стрессовое действие на рост и развитие растений в двух сериях эксперимента. Во 2-ом вегетационном периоде эффекты угнетения снижены до уровня контроля, за исключением образца с концентрацией НУВ 10000 мг/кг.

Изучение генотоксичности выросшей газонной травы двух вегетационных периодов на почвах, загрязненных НУВ, в различных концентрациях с использованием *Drosophila melanogaster* показало, что после 72-часовой экспозиции самцов дрозофилы экстрактами растений выжили все мухи.

Фертильность самцов дрозофилы при экспозиции экстрактами растений была на 5-9% выше, чем в лабораторном контроле (дистиллированная вода), а для почв, содержащих биодеструктор НУВ – на 23% выше (различия значимы,  $\chi^2=7,29$ ). Максимальные частоты как РЭЛ, так и ПЭЛ отмечены в водных экстрактах растений, выросших на почве, загрязненной НУВ в концентрации 300 мг/кг.

Сравнение частот РЭЛ при экспозиции самцов мух водными экстрактами растений 2-го вегетационного периода, выращенных на почвах, загрязненных НУВ, в присутствии биодеструктора и без него



Из рисунка 5 видно, что водные экстракты растений, выращенных во втором вегетационном периоде на почвах, содержащих НУВ и биодеструктор, приводят к увеличению частот доминантных летальных мутаций. Такие изменения наблюдались во всех образцах, кроме концентрации НУВ в почве на уровне 100 мг/кг. Водный экстракт растений, выращенных на почве, загрязненной НУВ в концентрации 100 мг/кг, в присутствии биодеструктора показал достоверное снижение эффектов в сравнении с контролем ( $X^2=157,6$ ). Таким образом, использование биодеструктора НУВ безопасно для почв с исходным загрязнением на уровне 100 мг/кг.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Учитывая проведенные исследования, наиболее информативными показателями оказались: индукция доминантных летальных мутаций дрозофил и оценка влияния НУВ на самоочищающую способность почвы. На основании полученных результатов и анализа литературных данных в качестве информативных индикаторных показателей, позволяющих выявить уровень

негативного воздействия почв с содержанием НУВ менее 1000 мг/кг, были сформированы две схемы экспериментальных исследований (таблица 5).

Таблица 5

Схема оценки эколого-гигиенического состояния почв, загрязненных нефтяными углеводородами

Краткая схема	Расширенная схема
<p>Физико-химические исследования: -определение содержания НУВ в почве мг/кг; - определения физико-химических свойств почвы – рН.</p>	<p>Физико-химические исследования: - определение содержания НУВ в почве мг/кг; - определения физико-химических свойств почвы - рН, ОВП.</p>
<p>Биотестирование (определение фитотоксичности (бобовые - горох)).</p>	<p>Токсикологические исследования: - токсикологические эксперименты на лабораторных животных (кожно-резорбтивное, раздражающее действие); - фитотоксичность.</p>
<p>Общесанитарные показатели вредности - <i>E.coli</i>; - сапротрофные бактерии.</p>	<p>Общесанитарные показатели вредности: -<i>E.coli</i>; -сапротрофные бактерии; -определение паразитарных патогенов - гельминты.</p>
	<p>Транслокационный показатель вредности: -оценка влияния нефтезагрязненных почв на процессы вегетации сельскохозяйственных растений в вегетационном опыте.</p>
	<p>Оценка ферментативной активности почв - целлюлозная активность</p>
	<p>Оценка канцерогенной активности почв -индукция доминантных летальных мутаций дрозофил</p>

Разработанная схема вошла в проект Методических рекомендаций «Руководство по оценке степени опасности почвы, загрязненной нефтяными углеводородами».

Выявление наиболее чувствительных и информативных показателей позволит установить степень опасности нефтезагрязненных почв селитебных территорий на стадии ранней диагностики негативного воздействия нефти на почву и оценить риск возможного влияния на среду обитания человека, его здоровье, а также разработать эффективные мероприятия по эколого-гигиенической санации почв.

Проведенные исследования позволили составить схему экспериментальных исследований по проведению комплексной эколого-гигиенической оценки новых биодеструкторов НУВ, планируемых для использования на почвах селитебных территорий, загрязненных НУВ, в концентрациях менее 1000 мг/кг (таблица 6).

Таблица 6

Схема экспериментальных исследований по проведению комплексной эколого-гигиенической оценки новых биодеструкторов НУВ, планируемых для использования на почвах селитебных территорий, загрязненных НУВ, в концентрациях до 1000 мг/кг

<p><b>I Этап. Комплексное эколого-гигиеническое изучение почв выбранной территории:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Эколого-гигиеническая характеристика района исследований;</li><li>Определение фактических концентраций НУВ в почве;</li><li>Изучение почв по общесанитарным показателям вредности (<i>E.coli</i>, сапротрофные бактерии).</li></ul>
<p><b>II Этап. Проведение модельных экспериментальных исследований по выявлению эффективности, целесообразности и безопасности использования планируемого к применению биодеструктора по наиболее информативным показателям, а именно:</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Определение динамики изменения содержания НУВ в почве под влиянием биодеструктора;</li></ul>

Изучение процессов самоочищения почв, загрязненных НУВ,, под влиянием биодеструктора (*E.coli*, сапротрофные бактерии);

Оценка эффективности и безопасности применения биодеструктора в вегетационном опыте (газонная трава);

Оценка потенциальной генотоксичности водных экстрактов из растений, выращенных на почвах, загрязненных НУВ,, под действием биодеструктора в тесте на индукцию доминантных летальных мутаций дрозофилы.

**III Этап. Принятие окончательного решения относительно эколого-гигиенической оценки способа биоремедиации почв, загрязненных НУВ,, селитебных территорий.**

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать следующие **выводы**.

### **ВЫВОДЫ**

1. Почва селитебных территорий г. Москвы (детских игровых площадок района «Хамовники» ЦАО г. Москвы), загрязнена НУВ антропогенного происхождения, их уровень находится в диапазоне концентраций 13,9 – 900 мг/кг, а также характеризуется стабильно высоким обсеменением *E.coli* и ОКБ. Степень загрязненности оценивается, как «чрезвычайно опасная» и «высоко опасная».

2. На основании процессов самоочищения – концентрации НУВ более 300 мг/кг в почве вызывают нарушения процессов самоочищения в почве, что приводит к продлению жизненного цикла *E.coli*. Можно предположить, что постоянное поддержание концентрации НУВ в диапазоне 300 мг/кг в естественных условиях (постоянное попадание НУВ на почву от автотранспорта) будет сохранять также стабильную численность *E.coli*, что повышает степень эпидемического риска. В концентрациях НУВ в диапазоне от 100 до 500 мг/кг почвы не оказывает влияния на развитие яиц аскарид в модельных условиях.

Внесение биодеструктора в контрольную почву и почвы, загрязненные НУВ в концентрациях в диапазоне от 100 до 300 мг/кг, позволяет сократить

жизненный цикл *E.coli*, что повышает вероятность улучшения санитарно-эпидемической ситуации городских территорий и снижение влияния на здоровье населения.

3. Максимальная эффективность действия биодеструктора установлена в концентрациях НУВ 100 и 200 мг/кг по завершении эксперимента на 35-е сутки. При исходной концентрации НУВ 300 мг/кг, в завершающий этап эксперимента, эффективность работы аборигенной микрофлоры и работы биодеструктора находится в равном диапазоне и не превышает 83 %. Минимальная эффективность отмечена в концентрациях 1000 и 10000 НУВ мг/кг – 62 и 64 %, соответственно.

4. В тесте на индукцию доминантных летальных мутаций дрозофилы для почвы, загрязненной НУВ, экспериментально установлен их различный характер действия, а именно: токсическое действие – в диапазоне концентраций НУВ 100–300 мг/кг почвы; генотоксическое – 500–1000 мг/кг почвы. Порогом генотоксического действия определена концентрация НУВ 500 мг/кг почвы.

Использование биодеструктора НУВ, приводит к увеличению частот доминантных летальных мутаций при изучении водных экстрактов растений, выращенных на почвах, загрязненных НУВ. Водный экстракт растений, выращенных на почве, загрязненной НУВ в концентрации 100 мг/кг, в присутствии биодеструктора показал достоверное снижение эффектов в сравнении с контролем ( $\chi^2=157,6$ ). Таким образом, использование биодеструктора НУВ безопасно для почв с исходным загрязнением на уровне 100 мг/кг.

5. Растения не сельскохозяйственного назначения могут служить моделью для оценки степени опасности почв селитебных территорий, загрязненных НУВ, и продуктов биодеструкции.

6. Использование биодеструктора на почвах, загрязненных НУВ, целесообразно лишь в концентрации менее 200 мг/кг.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Водянова М. А. Биотестирование и микробиологические методы в оценке загрязнения почв. Горный информационно-аналитический бюллетень (ГИАБ) – № 8, Москва, 2006, стр. 202 – 206.
2. Водянова М. А., Хабарова Е. И. Статистика патентования технологий восстановления земель. Материалы международной научно-практической конференции в области экологии и безопасности жизнедеятельности «Дальневосточная весна – 2008», Комсомольск-на-Амуре: ГОУВПО «КНАГТУ», 2008, 30 апреля, 492 – 495.
3. Водянова М. А., Хабарова Е. И. О патентовании биотехнологий восстановления земель за последние 25 лет (1983 – июнь 2008 г.). Материалы VII международной конференции «Ресурсовоспроизводящие, малоотходные и природоохранные технологии освоения недр», Москва – Ереван, 15 – 19 сентября 2008 г. – РУДН, 2008. – 137 – 138.
4. Донерьян Л. Г., Водянова М. А. Биомониторинг нефтезагрязнённых почв. Сборник материалов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием в 2 частях «Проблемы региональной экологии в условиях устойчивого развития». Часть 1, 25 – 27 ноября 2008 г., Киров: Издательство «О-Краткое», 2008 г. стр. 186 – 188.
5. Водянова М. А., Хабарова Е. И., Донерьян Л. Г. Учёт гигиенических аспектов при выборе и проведении рекультивационных мероприятий на нефтезагрязнённых почвах. Сборник материалов под редакцией академика РАМН Ю.А. Рахманина, 28 июня – 1 июля 2009 г., Москва, III Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов «Окружающая среда и здоровье» CD носитель.
6. Водянова М. А., Хабарова Е. И., Донерьян Л. Г. Сформированный ряд микробиологических препаратов, используемых для биоаугментации нефтезагрязнённых почв. Сборник научных трудов 4-й Всероссийской научно-практической конференции с международным участием



- «Экологические проблемы промышленных городов», часть 1, Саратов: Саратовский государственный технический университет, 2009 г. стр. 19 – 22.
7. Водянова М. А., Хабарова Е. И. Сравнительный анализ нефтезагрязнённых почв в присутствии биодеградатора и без него. Материалы Московской международной научно-практической конференции «Биотехнология: Экология крупных городов» 15 – 17 марта 2010 г., Секция 4 Экология почвогрунтов мегаполиса, ЗАО «Экспо-биохим-технологии», РХТУ им. Д. И. Менделеева, Москва, 2010 г. стр. 120 – 121.
  8. **Водянова М. А., Хабарова Е. И., Донерьян Л. Г. Анализ существующих микробиологических препаратов, используемых для биodeградации нефти и нефтепродуктов в почве. Горный информационно-аналитический бюллетень научно-технический журнал «ГИАБ», № 7, Москва, 2010 г. стр. 253 – 258.**
  9. Водянова М. А. Мониторинг почв территорий ЦАО г. Москвы в условиях проблем нормирования нефтезагрязнений. Сборник материалов и докладов Московского молодёжного форума «Экология Москвы и молодёжная экологическая политика в действии» (4 – 5 декабря 2009 г.), Москва, 2010 г. стр. 50 – 55.
  10. Крятов И.А., Новосильцев Г.И., Тонкопий Н.И., Ушакова О.В., **Водянова М.А.**, Чернышенко А.И. Влияние нефтезагрязнённых почв на развитие возбудителей инвазионных заболеваний. Мир науки, культуры, образования № 6 (31), Часть I, стр. 235 – 238.
  11. **Современные проблемы разработки гигиенических нормативов в почве/ Крятов И.А., Тонкопий Н.И., Ушакова О.В., Водянова М.А./ «Гигиена и санитария» № 5, 2012 г., Изд-во «Медицина», г. Москва, С. 69-72.**
  12. Влияние нефтяных углеводородов на взаимодействие микроорганизмов почвы с окружающей средой/ Водянова М.А., Ушакова О.В., Ингель

- Ф.И./ Материалы VI Всероссийской конференции молодых ученых «Стратегия взаимодействия микроорганизмов и растений с окружающей средой» 24-28 сентября 2012 г., Полиграфия ООО «Ракурс», г. Саратов, С. 94.
13. Влияние нефтяных углеводородов на почвы селитебных зон/ Водянова М.А., Крятов И.А./ Материалы IV Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов с международным участием «Окружающая среда и здоровье. Молодые ученые за устойчивое развитие страны в глобальном мире» 27-28 сентября 2012 г. под редакцией академика Ю. А. Рахманина, г. Москва/ Типография МГУ, г. Москва, С. 79 – 81.
14. Информативность показателей для гигиенической оценки нефтезагрязненных почв/ Крятов И.А., Тонкопий Н.И., Водянова М.А., Ушакова О.В., Донерьян Л.Г., Ушаков Д.И., Евсеева И.С./ Тезисы докладов международной конференции "Биодиагностика в экологической оценке почв и сопредельных сред" 4-6 февраля 2013 г., Москва, "БИНОМ. Лаборатория знаний", С. 110.
15. Эколого-гигиеническая оценка нефтезагрязненных почв селитебных территорий и способов их рекультивации/ Водянова М.А., Крятов И.А./ Сборник научных трудов, выпуск № 15 "Актуальные проблемы экологии и природопользования", Москва, Типография РУДН, С. 408 - 411.
16. Эколого-гигиенические аспекты сохранения качества почв – среды обитания человека/ Крятов И.А., Тонкопий Н.И., Ушакова О.В., Водянова М.А., Донерьян Л.Г., Евсеева И.С., Ушаков Д.И., Туркова И.С., Воробьева О.В./ Тезисы научно-практического конгресса «Влияние окружающей среды на здоровье населения государств-участников СНГ» 29 – 31 мая 2013 г., Москва, CD носитель, С. 73 – 76.
17. Сборник лабораторный работ по курсу «Основы токсикологии»/ Тарасова М.В., Водянова М.А., Головки И.В., Болотный А.А., Хабарова Е.И./ ОИУП МГГУ, Москва, 2010 г., С. 108.