

УДК: 502:628.516:665.7::631.465::631.86
DOI: 10.31471/2415-3184-2019-2(20)-33-42

*М. Т. Микущей, Т. В. Кундельська
Івано-Франківський національний
технічний університет нафти і газу*

ВПРОВАДЖЕННЯ ПОКАЗНИКІВ АКТИВНОСТІ ҐРУНТОВИХ ЕНЗИМІВ В РОЗРАХУНОК ОПТИМАЛЬНОЇ ДОЗИ ВНЕСЕННЯ АГЕНТІВ-СУБСТРАТІВ ПІД ЧАС РОЗРОБКИ НОВИХ СПОСОБІВ БІОРЕМЕДІАЦІЇ ҐРУНТОВОГО ПОКРИВУ, ЗАБРУДНЕНОГО НАФТОЮ І НАФТОПРОДУКТАМИ

Підтверджено взаємозв'язки між біологічною активністю ґрунтів, яку доцільно виражати як через показник активності ферменту каталази, так і через стан ензимологічного комплексу ґрунту в цілому в умовах природного фону та в забруднених нафтопродуктами ґрунтах. Виявлено, що внесення того чи іншого поживного субстрату у забруднений ґрунт позначається на підвищенні показника ферментативної активності, що підтверджує зростання мікробної популяції, проходження процесів інтоксикації забрудненого середовища внаслідок біологічної деструкції забруднювальної речовини. За результатами лабораторних досліджень було встановлено, що для використання з метою біоремедіації найдоцільніше застосовувати дослідний субстрат, який отриманий шляхом змішування рівних за масою частин окремих біогумусових субстратів. При цьому відзначається не лише найбільша збіжність кінцевого показника активності ферменту каталази з фоном та найвищий ступінь біодеградації, а також зменшення терміну до початку стабілізації показника каталазної активності, що відповідає заключному етапу сукцесії мікробної біомаси в ґрунті. За результатами аналізу даних наукової літератури та тривалих дослідів було вибрано оптимальну дозу внесення для рекомендованого типу субстрату. Розроблено новий підхід щодо внесення та коригування доз активних агентів-субстратів в процесі біоремедіації нафтозабруднених земель, при якому використовують показники біологічної активності в ґрунті, що дозволяє враховувати самовідновлювальну здатність ґрунту її спрямованість, а також рівень природної забезпеченості відновлюваної ділянки необхідними умовами для ефективної біодеградації вуглеводневих сполук. Спрощено технологічний процес відновлення що дозволяє більш раціонально використовувати активні компоненти та пришвидшити практичну реалізацію на конкретних забруднених ділянках.

Ключові слова: забруднений ґрунт, каталазна активність, нафтопродукти, дослідний субстрат, біоремедіація, фоновий показник.

Постановка проблеми у загальному вигляді та її зв'язок із важливими науковими та практичними завданнями. Необхідність розробки нових методів та підходів для відновлення ґрунтів, забруднених нафтою і нафтопродуктами, в Україні очевидна, тому що в міру тих чи інших факторів проблема вуглеводневого забруднення становить ризик для користувачів забруднених ділянок і протягом довготривалого періоду знижує економічний та екологічний потенціал територій. Це значною мірою зумовлено впливом вуглеводневих сполук, який виявляється у фітотоксичності (запобігання / гальмування росту рослин), обмеженій здатності ґрунту поглинати забруднювачі, у зв'язку з чим вони можуть потрапляти в поверхневі та підземні води, екотоксикологічними ефектами (вплив на популяції рослин тварин, мікроорганізмів), впливи на здоров'я людей (при потраплянні всередину під час проковтування, вдиханні та шкірному контакті).

Під час оцінки ступеня впливу забруднення нафтопродуктами на ґрунт і екологічний стан території в цілому недостатньо враховувати лише концентрацію нафтових вуглеводнів в ґрунті, необхідно проводити дослідження хімічних і фізичних властивостей ґрунтів, а також біотестування. Стан ґрунтового мікробіоценозу і фітотоксичність ґрунту вважаються одними з найбільш точних та інформативних індикаторів нафтового забруднення. Під час практичної реалізації відомих технологічних схем біоремедіації часто виникають суттєві ускладнення та зростають економічні витрати, що пов'язано з їх недосконалістю. Прикладні питання, які потребують вирішення, – це насамперед отримання достатньої кількості природного компоненту, що вноситься в ґрунт, з уникненням побічних впливів на навколишнє середовище; отримання повної інформації про забруднений ґрунт та фактори, що можуть вплинути на процес відновлення, і перш за все інформації про потенційну здатність ґрунту до самовідновлення, яка визначається широким спектром зовнішніх та внутрішніх факторів. При цьому потрібно досягти спрощення

технічного та лабораторного контролю процесу біоремедіації з метою зниження економічних витрат та прискорення практичної реалізації.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Огляд літературних даних дозволяє стверджувати, що процеси біологічного очищення нафтозабруднених ґрунтів набувають широкого кола вивчення у всіх розвинених країнах світу. Біоремедіація є перспективною, міжнародно визнаною технологією очищення ділянок, забруднених нафтою та нафтопродуктами. В основу біоремедіації покладено принцип повної мінералізації, або перетворення нафтопродуктів у менш токсичні форми різними групами мікроорганізмів. Крім того, біоремедіація є найефективнішим, найменш вартісним і екологічним методом. Її переваги – це збереження текстури і характеристики ґрунту, покращення фізичних і хімічних властивостей таких, як аерація, рН, вологостійкість, іонообмінні властивості тощо [1-5].

Одним з підходів, який застосовують до біоремедіації є біостимуляція, яку використовують для активації або прискорення розкладання токсичних сполук у ґрунті нативною групою мікроорганізмів. Ця стратегія полягає у стимулюванні катаболітичної активності ґрунтової мікробіоти через додавання багатих поживними речовинами органічних і неорганічних матеріалів, що постачають кисень або інші акцептори електронів, і підтримують відповідні температурні умови, реакцію середовища та режим вологи [6,7]. У якості поживних речовин рекомендують досить широке коло субстратів: мінеральні та органічні добрива [8, 9], соломі і тирсу, пептонну воду, відходи дріжджових виробництв, біогумус, сидерати, білково-вітамінний концентрат, гній [10], пташиний послід з додаванням торфу [11] та ін., внесення яких призводить до значного зниження загальної кількості вуглеводнів за рахунок прискорення зростання мікробної популяції [12].

Відомо, що оптимальну дозу внесення того чи іншого поживного субстрату в ґрунт з метою рекультивативної можна визначити лише за результатами польових стаціонарних та короткотермінових дослідів. Ця доза визначається як середнє значення з кількох дослідів, а отже є оптимальною для певної ділянки. Щоб конкретизувати показник для окремої ділянки, середню дозу коригують внесенням поправок, що в агроєкології найчастіше базуються на урахуванні вмісту елементів живлення в ґрунтах та розраховуються відповідно до запланованого рівня врожайності окремих культур [13]. У технологіях біоремедіації такі підходи до корекції доз поживних субстратів мають базуватись на інших принципах. Застосовують визначення величини дози внесення поживних субстратів в забруднений ґрунт залежно від ступеня забруднення, який при відповідних рекомендованих дозах є дуже варіабельною величиною. Це часто зумовлює необхідність повторного застосування технології на ділянках та постійного лабораторного контролю за процесом біоремедіації.

Важливими біотичними компонентами, які відповідають за біохімічні реакції ґрунту є ґрунтові ферменти. Ферментативна активність ґрунту визначається сумарним запасом ферментів, які виділяються у процесі життєдіяльності рослин і мікроорганізмів, а також тих, які акумулюються ґрунтом після руйнування відмерлих клітин і становлять загальний ферментний пул ґрунту [14]. Окрім того, ферментативна активність ґрунту тісно корелює із фізико-хімічними властивостями ґрунту і таким чином є похідною як біотичних, так і абіотичних факторів [14-16].

Вплив нафтових вуглеводнів на ґрунтову ферментну активність добре вивчено. Тому ферментативна активність ґрунту застосовується як чутливий індикатор під час визначення ступеня деградації та якості ґрунту за впливу різних забруднювальних речовин [16, 17].

Активність ферменту каталази використовують як показник загальної біологічної активності ґрунту в умовах різних рівнів забруднення нафтою та органічними речовинами. Висока активність каталази є важливою з огляду на її антиоксидантну функцію. Кисень, який утворюється за участю каталази, може використовуватися ґрунтовими мікроорганізмами, що є важливим у забезпеченні відповідних умов для швидкого очищення нафтозабруднених ґрунтів. Експериментально встановлено, що серед багатьох груп ферментів для діагностики екологічних наслідків забруднення ґрунтів нафтою і нафтопродуктами доцільно використовувати інформативні показники окисно-відновного ферменту каталази, оскільки вона є більш чутливою для цього типу антропогенного ефекту і більш стійкою порівняно з іншими показниками біологічної активності [18].

Біологічна роль ферменту каталази полягає у захисті організму від шкідливого впливу пероксидних сполук, що утворюються при внутрішньоклітинному окисненні, і залежить від хімічних та фізичних властивостей ґрунтів. Зміна властивостей ґрунту на фоні техногенного та урбаністичного навантаження впливає на активність каталази [14].

Постановка завдання. З метою рекультивативації нафтозабруднених земель доцільно розробляти інші підходи та методи уточнення середньої дози, оскільки попередні значно підвищують вартість та трудомісткість технологій рекультивативації.

Мета дослідження – імплементація високочутливого показника активності ферменту каталази в розрахунок оптимальної дози внесення агентів-субстратів під час розробки нових способів біоремедіації ґрунтового покриву, забрудненого нафтою і нафтопродуктами.

Завдання дослідження: розробити новий підхід щодо внесення доз агентів-субстратів в процесі біоремедіації нафтозабруднених земель, який дозволить враховувати показники біологічної активності в ґрунті, за якими можна охарактеризувати самовідновлювальну здатність ґрунту, її спрямованість, а також рівень забезпеченості необхідними умовами для ефективної біодеградації вуглеводневих сполук.

Виклад основного матеріалу. В основі наукового дослідження – модельні експерименти із визначення ефективності біологічної деструкції нафтопродуктів у дослідних зразках ґрунту з використанням біогумусових субстратів різних за генетичним складом та процесом утворення. У процесі модельних експериментів визначали динаміку біологічної активності в ґрунті після обробки впродовж експериментального терміну, що становив 90 діб. Біологічну активність визначали за показником активності ферменту каталази. Визначення проводили шляхом титрування 25 мл фільтрату 0,1н розчином KMnO_4 у кислому середовищі (метод Jonson, Temple) [14]. Активність каталази виражено в мл 0,1н KMnO_4 на 1 г ґрунту за 20 хв. (табл.1).

Практична частина дослідження була реалізована з червня по жовтень 2019 року в межах Тисменицького району Івано-Франківської області. Для дослідження процесу біоремедіації на забрудненій території відібрано ґрунт загальним об'ємом 120 л. Під час відбору, підготовки проб та проведення досліджень керувалися національним стандартом ДСТУ ISO 11266 – 2001 [21]. Для реалізації мети нашого дослідження було відібрано проби ґрунту для визначення фонового показника активності каталази за межами контуру забрудненої ділянки з урахуванням зони можливої горизонтальної міграції забруднювача.

Перед початком модельних експериментів одразу після транспортування ґрунт пройшов декілька етапів попередньої підготовки, яка включає:

- повне видалення органічних включень рослинного і тваринного походження;
- видалення кам'янистої фракції з розміром матеріалу від 0,3 мм;
- перетирання глинистих агрегатів крізь сито з діаметром отворів 0,3 мм;
- багаторазове перемішування дослідного об'єму ґрунту;
- стабілізація проби шляхом випаровування легких фракцій та підтримання аеробної рівноваги.

Пересушування ґрунту та додаткове зволоження недопускалися, оскільки вони є фізіологічним навантаженням для мікробного середовища, внаслідок чого відбуваються зміни в мікробній C-і N-динаміці [22]. Повторне зволоження після висушування спричиняє сплески дихання та зростання певних популяцій бактерій [23].

Різні варіанти досліду відповідають типу субстрату, яким проводилась обробка в модельних експериментах з визначення потенційних властивостей біогумусових субстратів різних генетичних складів в процесі біоремедіації нафтозабруднених ґрунтів: 1) контроль – забруднений ґрунт без обробки; 2) біогумус черв'яка каліфорнійського (Вермихаус, Новоселиця, Чернівецька область); 3) біогумусовий субстрат природного утворення на основі рослинної біомаси м. Івано-Франківськ.); 4) біогумусовий субстрат на основі органічних відходів домогосподарств; 5) компостна суміш на основі безпідстилкового та/або підстилкового пташиного посліду птахофабрики; 6) поєднання агентів 3, 4, 5 у рівних співвідношеннях за масою.

У процесі досліджень використовувалась аналітична маса внесення дослідних субстратів за масовим співвідношенням 1:50 (одна частина маси субстрату на 50 масових частин ґрунту). Протягом експериментального терміну підтримували вологість на рівні 60 – 65% шляхом регулярного зволоження. Через кожних 4-5 днів проводили перемішування для забезпечення доступу повітря до ґрунтових частинок. Ступінь біодеструкції нафтопродуктів визначали за фітотоксичністю.

Аналіз динаміки активності ферменту каталази свідчить про однонаправленість процесу, що виявляється у сплеску активності впродовж перших 15 діб з невеликим відхиленням для дослідних варіантів № 2та №6 (табл.1; рис.1). У подальшому відбувається процес поступового зниження, що може пояснюватись зменшенням числа вуглеводневоокислювальних мікроорганізмів внаслідок

детоксикації середовища. Максимальний показник каталазної активності що становить 3,45 дослідних одиниць зафіксований у варіанті № 2 на 15 добу досліджень.

Таблиця 1

Результати дослідження активності ферменту каталази у різних варіантах експерименту

Періодичність визначення активності каталази	мл 0,1н КМnO ₄ на 1г сухого ґрунту за 20 хв.					
	Варіанти досліді (номер контейнера)					
	1	2	3	4	5	6
1. Забруднений ґрунт до обробки	0,95					
2. Через 3 дні після обробки	1,12	1,41	1,55	1,82	1,59	1,87
3. Через 6 днів після обробки	1,36	1,98	1,93	2,33	2,11	2,56
4. Через 9 днів після обробки	1,9	2,81	2,63	2,69	3,13	3,44
5. Через 15 днів після обробки	2,69	3,45	3,41	3,1	3,32	3,37
6. Через 25 днів після обробки	2,43	3,12	3,12	2,87	3,14	3,1
7. Через 40 днів після обробки	2,15	2,81	2,73	2,75	2,9	2,73
8. Через 55 днів після обробки	1,87	2,56	2,51	2,66	2,71	2,49
9. Через 75 днів після обробки	1,64	2,4	2,35	2,64	2,34	2,41
10. Через 90 днів після обробки	1,57	2,35	2,28	2,63	2,21	2,4
Фоновий показник для території	2,42					

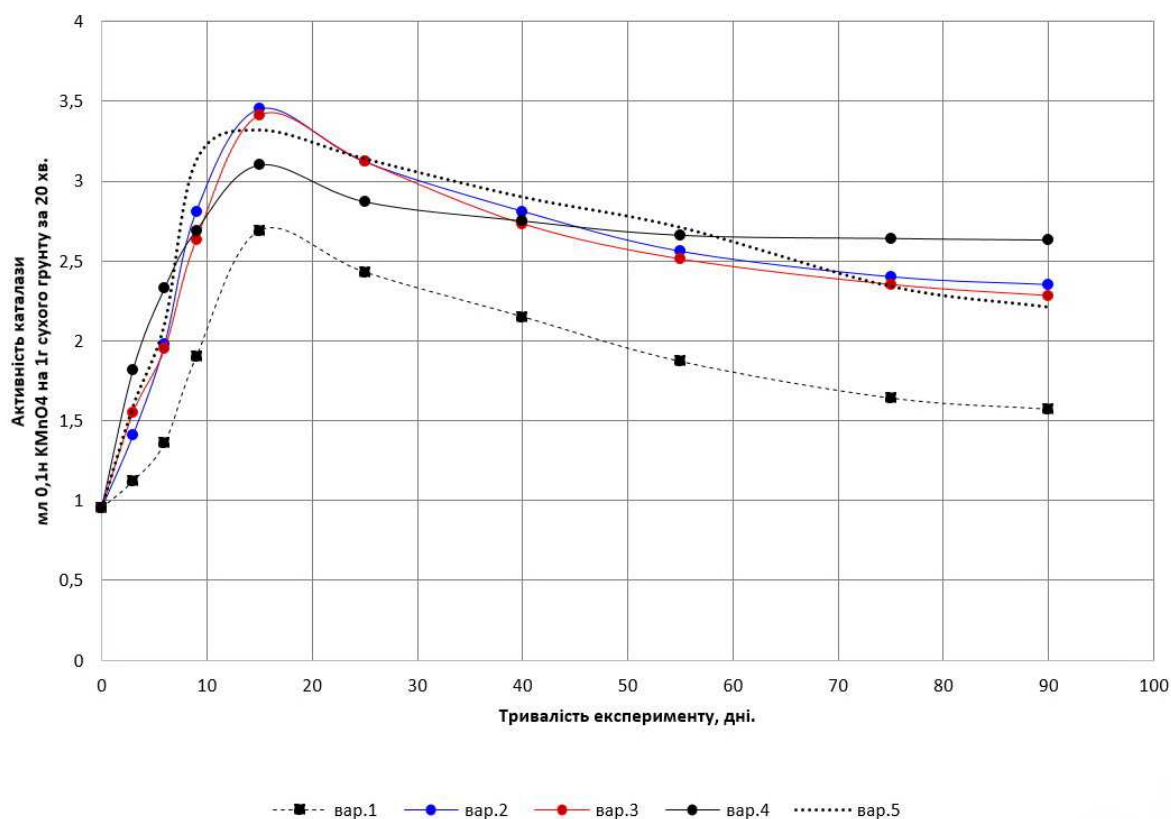


Рис. 1. Графік активності ферменту каталази у дослідних зразках ґрунту

Найнижчим максимальним показником характеризується варіант №4 – 3,1 дослідних одиниць. Результати показують, що приблизно через 70 днів починається стабілізація показника активності ферменту. Кінцеве значення показника є важливим з декількох причин: відповідність залишковому ступеню забруднення ґрунту у зв'язку з високою чутливістю показника; збіжність з фоновим показником по території; рівень умов, сприятливих для відновлення нативної популяції мікроорганізмів.

Отже, чим ближчим є кінцеве значення активності ферменту до фонового по території тим вищі потенційні властивості біогумусового субстрату, який застосовувався в експерименті, бо одночасно з цим воно відповідає зниженню концентрації поллютанта до залишкового рівня, що визначає ефективність кожного з субстратів і технології в цілому. Інтерпретація цього показника недоцільна за відсутності кінцевого етапу сукцесії мікробного комплексу – стабілізації.

Максимальне кінцеве значення активності каталази виявлено у варіанті з використанням субстрату №4, що може бути зумовлено високим вмістом нерозкладених компонентів і свідчить про незавершеність процесу гуміфікації та сприяє більш інтенсивній діяльності мікроорганізмів, життєдіяльність яких не пов'язана з біодеградацією вуглеводнів, відносно інших варіантів досліду.

Аналіз зміни активності каталази у варіанті №1 доводить, що при забезпеченні оптимальної вологості та повітрообміну в ґрунті відбувається прискорення самовідновлювальної здатності за рахунок зростання чисельності мікробіоти. Проте, через відсутність джерел мінерального живлення, поверхонь іммобілізації забруднення (мікрочастинки целюлози, немінералізовані рештки) більш складні сполуки не руйнуються, виникає міжвидова конкуренція в групах мікроорганізмів, що позначається на кінцевому результаті.

Результати дослідження показують що з метою біоремедіації найдоцільніше використовувати дослідний варіант №6, який отриманий шляхом змішування рівних частин досліджуваних субстратів №3, №4, №5. Відзначається не лише найбільша збіжність кінцевого показника активності ферменту каталази з фоном, а також коротші терміни до початку його стабілізації. Цей субстрат є поєднанням високоактивних біологічних комплексів, які в сумі виявили кращі потенційні властивості, ніж окремо кожен з них. Крім того, він розглядається не лише як джерело мінерального живлення і мікробної спільноти, а також як найкращий структуроутворювач ґрунту та іммобілізатор забруднення порівняно з іншими варіантами дослідів.

З огляду на можливість отримання великої кількості біогумусового субстрату цього типу, простоти щодо організації цього процесу, економічну доцільність та екологічну ефективність ми розробили технологічну схему, що визначає порядок дій для відновлення екологічного балансу в забруднених нафтою та нафтопродуктами ґрунтах.

З метою зменшення розрахункового масового співвідношення (1:50), ми оцінювали ефективність біоремедіації під час використання агентів-аналогів самостійно та в комплексі із внесенням структуроутворювачів, сидерацією та фітомеліорацією, а також при зміні маси основного агента впливу. Результати досліджень показують, що під час використання структуроутворювачів наприклад таких, як соснова, березова стружка, торф та мох сфагнум [23] в кількості до 10% від маси ґрунту, ефективність очищення може збільшуватися до 45% порівняно з варіантами без їх застосування. За результатами аналізу наукових даних було знижено до оптимального рівня дозу внесення рекомендованої суміші у ґрунт, яка становить 3,4 кг на 1 м² при товщині шару ґрунту $h = 0,2\text{ м}$. (34 т/га). Відповідно на 1 см товщини ця величина становить 0,17 кг/м². При цьому враховували збільшення ефективності ремедіації при одночасному використанні суміші і структуроутворювальних агентів.

Серед результатів екологічних досліджень, ми вперше пропонуємо використовувати відношення фонового показника ферментативної активності ґрунту до середнього на забрудненій ділянці. Фоновий показник буде визначатись шляхом відбору проб ґрунту на ділянках за межами контуру забруднення в місцях, де за результатами попереднього польового обстеження не виявлено вуглеводневих забруднювачів. Паралельно потрібно проводити визначення показника ферментативної активності на забрудненій ділянці. Для цього відбирають об'єм ґрунту з площі забрудненої ділянки. Враховують неоднорідність забруднення, різний ступінь механічного порушення верхнього шару, що залежить від характеру надходження забруднення. Під час відбору зазначеного об'єму забрудненого ґрунту важливо врахувати розміри та вміст глинистих частинок і різних органічних включень.

Виявлені та проаналізовані закономірності визначають можливість використання показника активності ферменту каталази під час розрахунку та уточнення маси внесення біогумусового субстрату на конкретній ділянці за таким алгоритмом. Відношення фонового показника активності ферменту каталази (K_{Φ}) до середнього показника активності ферменту (K_3) на забрудненій ділянці характеризує ступінь впливу забруднення на ґрунт (N_3), а також дозволяє врахувати процеси самовідновлення. Наближення показника N_3 до одиниці вказує, що вплив забруднення на мікробіологічні процеси в ґрунті та його самовідновлювальну здатність незначний, що зумовлено

комплексом факторів, серед яких основні – це концентрація забруднювача та властивості ґрунту, а також відповідає тому чи іншому етапу біологічної сукцесії мікробної біомаси. Так, якщо відношення K_ϕ до K_3 менше від одиниці при низьких концентраціях забруднювача, то можна говорити про стимулюючу дію на окремі групи мікроорганізмів за умови, що забруднення свіже. Цей показник може свідчити також про заключний етап самовідновлення, якщо з моменту забруднення минув необхідний для біодеструкції термін.

Якщо показник $N_3 > 1$, то при розрахунках маси внесення біогумусового субстрату, що розглядається, буде використовуватись таке відношення:

$$N = \frac{N_3}{N_c}, \quad (1)$$

де: N – ступінь відхилення умов ділянки, яка підлягає відновленню, від експериментальних;

N_3 – коефіцієнт, що характеризує ступінь впливу на ґрунт на забрудненій ділянці, яка підлягає відновленню.

N_c – сталий коефіцієнт отриманий у процесі проведення модельних експериментів з визначення оптимальної кількості внесення дослідного субстрату в ґрунт; в розширеному варіанті формула набуває вигляду:

$$N = \frac{K_\phi}{K_3} \times \frac{K'_3}{K'_\phi}, \quad (2)$$

де K_ϕ та K'_ϕ – відповідно фоновий показник активності ферменту каталази на ділянці, яка підлягає відновленню, та під час проведення модельних експериментів;

K_3 та K'_3 – відповідно показники активності ферменту каталази в забрудненому ґрунті на ділянці, яка підлягає відновленню, та під час проведення модельних експериментів.

Уточнення маси внесення рекомендованого біогумусового субстрату в забруднений ґрунт залежно від середньої глибини забрудненого шару, площі забрудненої ділянки та ступеня відхилення умов ділянки, яка підлягає відновленню, від експериментальних, що виражається через показник активності ферменту каталази, який безпосередньо залежить від типу ґрунтів, різної буферності, вмісту мінеральних речовин, фізико-механічних властивостей, еродованості, температурного режиму, зволоження і рівня забруднення можна розрахувати за узагальненою формулою:

$$m = Q \times S \times \left(\frac{K_\phi}{K_3} \times \frac{K'_3}{K'_\phi} \right) \times h_c, \quad (3)$$

де m – маса біогумусового субстрату, кг;

де Q – стандартна оптимальна норма внесення, кг на 1 м², що відповідає товщині шару 1 см, встановлена в процесі модельних експериментів і дорівнює 0,17;

S – площа ділянки, м²;

K_ϕ та K'_ϕ – відповідно фоновий показник активності ферменту каталази на ділянці, яка підлягає відновленню, та під час проведення модельних експериментів;

K_3 та K'_3 – відповідно показники активності ферменту каталази в забрудненому ґрунті на ділянці, яка підлягає відновленню, та під час проведення модельних експериментів;

h_c – середня товщина забрудненого шару, см.

У скороченому вигляді формула виглядає таким чином:

$$m = 0.067 \times S \times \frac{K_\phi}{K_3} \times h_c, \quad (4)$$

де: 0,067 – коефіцієнт оптимальної маси досліджуваного субстрату, що відповідає експериментальним умовам, при $N_c = 2,54$;

Враховуючи те, що невисокі концентрації нафтопродуктів чинять стимулюючу дію і часто складно встановити скільки часу минуло з моменту забруднення то при $N_3 \leq 1$ при відомій підвищеній концентрації забруднювача, стандартна доза внесення субстрату, яка визначена в процесі модельних експериментів, не уточнюється за наведеною формулою, оскільки ґрунт володіє високою самовідновлювальною здатністю і достатньо просто прискорити природний процес.

Цей розрахунок може використовуватись для інших субстратів-прототипів за умови проведення серії модельних експериментальних досліджень з визначення оптимальної дози внесення, за якої при збереженні найвищої ефективності стадія стабілізації біомаси мікроорганізмів за показником активності ферменту каталази відбувається найшвидше.

Розроблена технологія передбачає виконання такої програми, яка являє собою детальний опис та організацію процесу відновлення територій, земельних ділянок, сільськогосподарських угідь, які зазнали забруднення нафтою на нафтопродуктами.

Для забезпечення необхідного рівня ефективності процесу біоремедіації з використанням рекомендованого біогумусового субстрату в природних умовах неможливо обійтись без використання структуроутворювачів-аераторів – субстратів, які здатні стабілізувати температурно-вологісний режим на належному рівні, а також можуть бути додатковим джерелом азоту для рослин на заключному етапі біоремедіації (фіторемедіації). Їх використання дозволяє суттєво зменшити витрату основного інгредієнта – біодеструктора, що визначає раціональний розподіл ресурсів у технології.

З цією метою запропоновано спосіб «часткового вилучення» з непорушеного біогеоценозу. Його суть зводиться до того, що частина живої рослинної біомаси, сухоостою, опад чи відпад маси залежно від типу місцевості вилучається з незабруднених ділянок у кількості, яка не спричинить негативні зміни на ділянках вилучення. Переваги такого способу використання очевидні:

- збільшується швидкість організації процесу біоремедіації;
- ці ресурси можна отримати безпосередньо біля забруднених ділянок;
- не порушується природний баланс через відсутність чужорідних для певної місцевості компонентів (виключається можливість вторинних забруднень, рослинних інвазій, неспрямованої інтродукції тощо).
- ці ресурси володіють достатніми потенційними властивостями, що дозволяє їхнє використання в технології.

Використання рослин фітомеліорантів на етапі доочистки проводиться за відомими технологічними схемами залежно від мети подальшого використання ділянки. Якщо відсутня потреба у користуванні відновленими ділянками, наприклад, коли вони розташовані не нерозораних територіях тоді доочистку способом фіторемедіації рекомендуємо проводити шляхом посіву та висадкою типових для цієї місцевості багаторічних рослинних комплексів, що згодом приведе екосистему до початкового стану. У загальному правильний вибір рослин фітомеліорантів на етапі доочистки можна зробити лише після завершення основного етапу ремедіації ґрунтів та зіставлення факторів, що визначатимуть вегетацію тієї чи іншої культури із вимогами щодо подальшого використання території.

Методика, яка запропонована, створена для відновлення ділянок з випадковим технологічним чи аварійним надходженням нафтопродуктів у ґрунти, на сільськогосподарських ділянках, що прилягають до зон нафтовидобутку, ділянок зберігання та ремонту лісоочисної і лісозаготівельної техніки, колишніх складів паливно-мастильних матеріалів, або як біологічний етап рекультивативної складних територій, де вимагається застосування декількох методів.

Спосіб реалізується таким чином. В другій половині весни, коли ґрунт достатньо прогрітий, проводять первинну культивування (підрізування бур'янів, розпушування та перемішування забрудненого шару, боронування та дренажування ділянки за необхідності). Паралельно з визначенням концентрації нафтопродуктів встановлюють відхилення активності каталази від фону по території за розробленою методикою. Далі вносять рекомендований біогумусовий субстрат у розрахованій кількості з наступним перемішуванням до глибини проникнення забруднення. Якщо ґрунт сильно пересушений його зволожують за декілька днів до обробки. Внесення структуроутворювальних субстратів у кількості не більше 10% від маси ґрунту проводиться через 3 тижні після обробки (у вигляді подрібненого сухоостою, трави, соломи, деревної стружки тощо), які отримані шляхом часткового вилучення з прилеглих ділянок. У процесі ремедіації вологість ґрунту особливо у перший місяць повинна підтримуватись на рівні 60–65%. Рихлення ґрунту за допомогою механізованої техніки на глибину забруднення проводять не менше 1 разу на 2 тижні впродовж 70 діб.

Висновки. У результаті серії проведених експериментальних досліджень виведено формулу для розрахунку оптимальної дози внесення рекомендованого біогумусового субстрату, який є сумішшю біогумусових субстратів різних за генетичним складом та способом утворення. В основі розрахунку лежить відношення фонових показників активності ферменту каталази до середнього

показника активності ферменту на забрудненій ділянці, що характеризує ступінь впливу забруднення на ґрунт, а також дозволяє врахувати одночасно велике коло чинників, що впливають на біоремедіацію нафтозабруднених ґрунтів.

Наукова розробка відноситься до біотехнологічних методів охорони навколишнього середовища, зокрема до ремедіації ґрунтів, забруднених нафтою і нафтопродуктами, з використанням природних інгредієнтів, і може знайти застосування у сфері охорони природи в нафтогазовому комплексі під час ліквідації аварійних, технологічних чи випадкових розливів нафтопродуктів на ґрунти; в агроекології для ліквідації можливих розливів нафтопродуктів під час ремонту, обслуговування сільськогосподарської механізованої техніки; екологічному менеджменті ґрунтів за екологічного контролю техногенно забруднених ґрунтів земельних ділянок різного призначення та їх використання; у науково-дослідній практиці – для вивчення впливу природних інгредієнтів на деструкцію нафти і нафтопродуктів у ґрунтах, динаміки та спрямованості мікробіологічних, ферментативних реакцій за дії цих інгредієнтів; розробки та удосконалення науково-методичних основ моніторингу забруднених ґрунтів (діагностика, оцінювання, прогнозування екологічного стану); регламентації використання та процесів ремедіації ґрунтів для поліпшення їх стану.

У результаті досліджень підтверджено, що застосування заявленої суміші біогумусових субстратів за розробленою технологією є більш раціональним за свої аналоги та простішим, а також сприяє вирішенню суміжних екологічних питань щодо утилізації органічних відходів домогосподарств, птахокомплексів та придатної для біоремедіації частини рослинної біомаси урбанізованих територій.

Література

- 1 Esmaeil, A.S.; Akbar, A. Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in Kuwait soil. *Chemosphere* 2015, 120, 100–107.
- 2 Abdulsalam, S.; Omale, A.B. Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2009, 52, 747–754.
- 3 Perelo, L.W. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard Mater.* 2010, 177, 81–89.
- 4 Silva-Castro, G.A.; Uad, I.; Rodríguez-Calvo, A.; González-López, J.; Calvo, C. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environ. Res.* 2015, 137, 49–58.
- 5 Nwogu, T.P.; Azubuike, C.C.; Ogugbue, C.J. Enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with petroleum hydrocarbons after amendment with *Capra aegagrus hircus* (Goat) Manure. *Biotechnol. Res. Int.* 2015, 2015, 1–7.
- 6 Baptista, S.J.; Cammarota, M.C.; Freire, D.D.D.C. Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2005, 48, 249–255.
- 7 Andreolli, M.; Lampis, S.; Brignoli, P.; Vallini, G. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: A comparative study. *J. Environ. Manag.* 2015, 153, 121–131.
- 8 Киреева, Н. А. Биологическая активность нефтезагрязненных почв [Текст] / Н. А. Киреева, В. В. Водопьянов, А. М. Мифтахова. – Уфа: Гилем, 2001. – 376 с.
- 9 Салангинас, Л. А. Изменение свойств почв под воздействием нефти и разработка системы мер по их реабилитации [Текст] / Л. А. Салангинас. – Екатеринбург: Элита-Комплекс, 2003. – 412 с.
- 10 Сухонослова, А. Н. Очистка почв от нефтяного загрязнения и оценка ее эффективности [Текст] / А. Н. Сухонослова, В. А. Бурлака, Д. Е. Быков, И. В. Бурлака, Н. В. Бурлака // Экология и промышленность России. – 2009. – С. 18–20.
- 11 Бухгалтер, Э. Б. Рекультивация почвы, загрязненной газовым конденсатом [Текст] / Э. Б. Бухгалтер, Р. В. Галиулин, В. Н. Башкин, И. Е. Сидорова, А. В. Грунвальд, А. Ю. Семенцов, Р. А. Галиулина // Защита окружающей среды в нефтегазовом комплексе. – 2008. – № 2. – С. 16–18.
- 12 Шевчик, Л. З.; Романюк, О. І. Аналіз біологічних способів відновлення нафтозабруднених ґрунтів. *ScienceRise. Biological science*, 2017, 1: 31-39.
- 13 Науково-методичні рекомендації з оптимізації мінерального живлення сільськогосподарських культур та стратегії удобрення / ред. акад. М. М. Городнього. – К.: -239с.
- 14 Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. Издательство: Наука, 2005 г. ISBN: 5020339407. УДК: 631.4:577. 252 с.

15 Mekich, M., N. Gjura, and O. Terek. "Ферментативна активність нафтозабруднених ґрунтів у процесі фіторекультивациї рослинами кукурудзи (*Zea mays* L.)." Вісник Львівського університету. Серія біологічна 69 (2015).

16 Achuba, F. та Okoh, P. (2014) Вплив нафтопродуктів на активність ґрунтової каталази та дегідрогенази. *Open Journal of Soil Science*, 4, 399-406. doi: 10.4236 / ojss.2014.412040 .

17 Trasar-Cepeda C, Leiro's M., Seoane S, Gil-Sotres F. Limitation of soil enzymes as indicators of soil pollution // *Soil Biol Biochem*. 2000. Vol. 32. P. 455–499

18 van Beelen P. V., Doelman P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment // *Chemosphere*. 1997. Vol. 34. P. 455–499.

19 Казиев Ф. К., Тишкина Е. И., Киреева Н. А. Влияние нефтепродуктов на биологическую активность почвы // *Биологические науки*. Т. 10. 1988. С. 93–99.

20 ДСТУ ISO 11266 – 2001. Державний стандарт України. Якість ґрунту. Настанови щодо лабораторного випробовування біодеградації органічних хімічних речовин у ґрунті в аеробних умовах. (ISO11266:1994, IDT).

21 Fierer N. and Schimel J.P. Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogen transformations. *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 2002, pp. 777–787

22 Lund V. and Goksoer J. Effects of Water Fluctuations on Microbial Mass and Activity in Soil. *Microbial Ecol.*, 6, 1980, pp. 115–123.

23 Шигапов А. М. «Биоремедиация нефтезагрязненных почв органическими компонентами отходов лесозаготовительной промышленности (на примере дерново-подзолистых почв Уральского федерального округа)»: . дис.... канд. биол. наук / Шигапов Айрат Минимарсильевич - Екатеринбург, 2016 – 228 с.

M. Mykytsei, T. Kundelska

*Ivano-Frankivsk National
Technical University of Oil and Gas*

IMPLEMENTING THE ACTIVITY INDEXES OF SOIL ENZYMES IN CALCULATING THE OPTIMUM DOSES OF AGENTS-SUBSTRATES TO DEVELOP NEW WAYS OF BIOREMEDIATION OF THE SOIL CONTAMINATED BY OIL AND PETROLEUM PRODUCTS

The correlation between the biological activity of soils has been proved, which should be expressed both by the activity index of catalase enzyme and state of the enzymological soil complex as a whole under the conditions of natural background and in soils contaminated by petroleum products. It has been discovered that the application of any nutritious substrate in the contaminated soil affects the increase in the enzyme activity index, which proves the growth of the microbial population, and intoxication processes of the polluted environment due to the biological degradation of the pollutant. Based on the results of laboratory studies, it has been found reasonable to use a test substrate for bioremediation, which is obtained by mixing the equal weight parts of separate biohumus substrates. In this case, not only the greatest convergence of the final activity index of catalase enzyme with the background and the highest degree of biodegradation are observed, but also the decrease in time before the catalase activity index stabilizes, which corresponds to the final stage of the microbial biomass succession in the soil. Based on the results of scientific literature analysis and long-term experiments, the optimum application dose has been selected for the recommended substrate type. The authors have developed a new approach to applying and adjusting the doses of active agents-substrates in the bioremediation process of oil-contaminated lands which uses the biological activity indexes in the soil. This helps to take into account the self-recovering capacity of soil, its orientation and natural provision of the recovering area with necessary conditions for the effective biodegradation of hydrocarbon compounds. The technological process of recovery has been simplified, which allows using active components more rationally and accelerating the practical implementation in specific contaminated areas.

Key words: contaminated soil, catalase activity, petroleum products, test substrate, bioremediation, background index.

References

1 Esmail, A.S.; Akbar, A. Occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* in Kuwait soil. *Chemosphere* 2015, 120, 100–107.

2 Abdulsalam, S.; Omale, A.B. Comparison of biostimulation and bioaugmentation techniques for the remediation of used motor oil contaminated soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2009, 52, 747–754.

- 3 Perelo, L.W. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *J. Hazard Mater.* 2010, 177, 81–89.
- 4 Silva-Castro, G.A.; Uad, I.; Rodríguez-Calvo, A.; González-López, J.; Calvo, C. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments. *Environ. Res.* 2015, 137, 49–58.
- 5 Nwogu, T.P.; Azubuike, C.C.; Ogugbue, C.J. Enhanced bioremediation of soil artificially contaminated with petroleum hydrocarbons after amendment with *Capra aegagrus hircus* (Goat) Manure. *Biotechnol. Res. Int.* 2015, 2015, 1–7.
- 6 Baptista, S.J.; Cammarota, M.C.; Freire, D.D.D.C. Production of CO₂ in crude oil bioremediation in clay soil. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2005, 48, 249–255.
- 7 Andreolli, M.; Lampis, S.; Brignoli, P.; Vallini, G. Bioaugmentation and biostimulation as strategies for the bioremediation of a burned woodland soil contaminated by toxic hydrocarbons: A comparative study. *J. Environ. Manag.* 2015, 153, 121–131.
- 8 Kireeva, N. A. *Biologicheskaya aktivnost neftezagryaznennykh pochv* [Tekst] / N. A. Kireeva, V. V. Vodopyanov, A. M. Miftahova. – Ufa: Gilem, 2001. – 376 s.
- 9 Salanginas, L. A. *Izmenenie svoystv pochv pod vozdeystviem nefi i razrabotka sistemy mer po ih reabilitatsii* [Tekst] / L. A. Salanginas. – Ekaterinburg: Elita-Kompleks, 2003. – 412 s.
- 10 Suhonosova, A. N. *Ochistka pochv ot neftyanogo zagryazneniya i otsenka ee effektivnosti* [Tekst] / A. N. Suhonosova, V. A. Burlaka, D. E. Byikov, I. V. Burlaka, N. V. Burlaka // *Ekologiya i promyshlennost Rossii.* – 2009. – S. 18–20.
- 11 Buhgalter, E. B. *Rekultivatsiya pochvy, zagryaznennoy gazovym kondensatom* [Tekst] / E. B. Buhgalter, R. V. Galiulin, V. N. Bashkin, I. E. Sidorova, A. V. Grunvald, A. Yu. Sementsov, R. A. Galiulina // *Zaschita okruzhayushey sredy v neftegazovom komplekse.* – 2008. – # 2. – S. 16–18.
- 12 Shevchyk, L. Z.; Romaniuk, O. I. *Analiz biologichnykh sposobiv vidnovlennia naftozabrudnennykh gruntiv.* *ScienceRise. Biological science*, 2017, 1: 31-39.
- 13 *Naukovo-metodychni rekomendatsii z optymizatsii mineralnogo zhyvlennia silskohospodarskykh kultur ta stratehii udobrennia./red.akad.M.M. Horodnoho – K.:*-239s.
- 14 Haziev F.H. *Metodyi pochvennoy enzimologii.* Izdatelstvo: Nauka, 2005 g. ISBN: 5020339407. UDK: 631.4:577. 252 str.
- 15 Mekich, M., N. Gjura, and O. Terek. "Fermentatyvna aktyvnist naftozabrudnennykh gruntiv u protsesi fitorekultyvatsii roslynamy kukurudzy (*Zea mays* L.)." *Visnyk Lvivskoho universytetu. Seriya biologichna* 69 (2015).
- 16 Achuba, F. ta Okoh, P. (2014) *Vplyv naftoproduktiv na aktyvnist hruntovoi katalazy ta dehidrogenazy.* *Open Journal of Soil Science* , 4 , 399-406. doi: 10.4236 / ojss.2014.412040 .
- 17 Trasar-Cepeda C, Leiro's M., Seoane S, Gil-Sotres F. *Limitation of soil enzymes as indicators of soil pollution* // *Soil Biol Biochem.* 2000. Vol. 32. P. 455–499
- 18 van Beelen P. V., Doelman P. *Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment* // *Chemosphere.* 1997. Vol. 34. P. 455–499.
- 19 Kaziev F. K., Tishkina E. I., Kireeva N. A. *Vliyanie nefteproduktov na biologiches kuyu aktivnost pochvy* // *Biologicheskie nauki.* T. 10. 1988. S. 93–99.
- 20 DSTU ISO 11266 – 2001. *Derzhavnyi standart Ukrainy. Yakist hruntu. Nastanovy shchodo laboratornogo vyprovovuvannia biodehradatsii orhanichnykh khimichnykh rehovyn u hrunti v aerobnykh umovakh. (ISO11266:1994, IDT).*
- 21 Fierer N. and Schimel J.P. *Effects of drying-rewetting frequency on soil carbon and nitrogentransformations.* *Soil Biology & Biochemistry*, 34, 2002, pp. 777–787
- 22 Lund V. and Goksor J. *Effects of Water Fluctuations on Microbial Mass and Activity in Soil.* *Microbial Ecol.*, 6, 1980, pp. 115–123.
- 23 Shigapov A. M. «*Bioremediatsiya neftezagryaznennykh pochv organicheskimi komponentami othodov lesozagotovitelnoy promyshlennosti (na primere dernovo-podzolistykh pochv Uralskogo federalnogo okruga)*»: . dis.... kand. biol. Nauk / Shigapov Ayrat Minimarsilevich - Ekaterinburg, 2016 – 228 s.

Надійшла до редакції 9 жовтня 2019 р.