

Экспериментальная характеристика ремедиационных свойств гуминовых препаратов разного генезиса по фону загрязнения почв медью

© 2015. К. А. Кыдралиева¹, д.х.н., г.н.с., Ш. Ж. Жоробекова¹, д.х.н., директор, О. М. Топильская², студент, М. И. Акулова², аспирант, В. А. Терехова^{2,3}, д.б.н., зав. лабораторией,

¹Институт химии и химической технологии НАН Кыргызской Республики,

²Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,

³Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН,

e-mail: kamila kydralieva@gmail.com, jorobekova@mail.ru, vterekhova@gmail.com

Проведено сравнение эффектов гуминовых препаратов (ГП) разного генезиса в искусственной стандартной почве, загрязнённой медью, по биотическим показателям. Оценка биоактивности промышленных гуминовых препаратов «Флексом» (из торфа) и «Киргизский» (из угля) проводилась с использованием батареи биотест-систем на основе стандартизованных организмов. Биотестирование проб, содержащих 2 и 4 ОДК Cu^{2+} в сочетании с различными дозами ГП, показало, что протекторные свойства ГП лимитируются как дозой внесения, так и концентрацией загрязняющего вещества. Сравнение протекторных свойств двух гуминовых препаратов показало преимущества ГП «Флексом» для всех испытанных тест-культур, связанное с наличием в его составе питательных элементов.

A comparison of the effects of different humic preparations was performed by biotic indices in an artificial standard soil contaminated with copper. Bioactivity of both Flexom (from peat) and Kyrgyz (from coal) industrial preparations was tested using battery of biotest-systems based on standardized organisms. The bioassay of samples containing 2 and 4 AAC of Cu^{2+} in combination with various doses of humics showed that protective properties are limited by both humics dose application, and pollutant concentration. Comparison of protective potential of two preparations showed benefits of Flexom for all tested cultures due to the nutrient-rich composition.

Ключевые слова: гуминовые препараты, биоактивность, медь, ремедиация.

Keywords: humic preparations, bioactivity, copper, remediation.

В экологических исследованиях загрязнённых почв особое внимание уделяется восстановлению их экологических функций с использованием продуктов «зелёной химии», к числу которых относятся – гуминовые препараты (ГП).

Разнообразие промышленных гуматов велико, их состав и свойства меняются в зависимости не только от источника гуминового сырья (торфа, угля, сапропели), особенностей местоположения сырьевых источников, но и технологии получения. Проблема сертификации гуминовых продуктов до сих пор не решена. Гуминовые препараты производятся многими предприятиями. Мировой рынок насыщен этими продуктами, но механизмы их действия, составляющие компоненты и свойства недостаточно изучены. Зачастую об эффективности ГП приходится судить уже только после их приобретения и применения в тех или иных условиях. Исследовательские лаборатории России и стран бывшего СНГ,

в частности Киргизии, объединяют усилия в работе по изучению биоактивности ГП и выработке рекомендаций по совершенствованию производства гуминовых удобрений.

В разных почвах и при разных типах загрязнения эффект ГП проявляется по-разному. Оценить качество ГП на большом разнообразии почв представляется непростым делом. Для сопоставления ремедиационных свойств ГП предлагается стандартная почвенная смесь с воспроизводимыми свойствами, так называемая искусственная почва, или модельный почвогрунт.

Цель данной работы состояла в сравнении эффектов гуминовых препаратов разного генезиса в искусственной стандартной почве, загрязнённой медью, по биотическим показателям. Для оценки биоактивности промышленных гуминовых препаратов Флексом (из торфа) и Киргизский (из угля) применяли широкий набор стандартизованных тест-культур.

Материалы и методы

Гуминовые препараты.

Испытывали действие гуминовых продуктов двух типов:

ГП «Флексом» – гумат калия, коммерческий продукт, производимый из торфа (производитель ООО «ФЛЕКСОМ»). Исходный продукт – водный концентрат коричневого цвета, 57–64 г/л, гумат калия составляет 80% от массы органического вещества.

ГП «Киргизский» – гумат натрия, коммерческий продукт, произведённый из окисленного угля месторождения Кара-Кече (Киргизия). Исходный продукт – сухой порошок серовато-коричневого цвета, зольность 23%.

Испытания ГП проводили при добавлении в почвенные образцы в расчёте на достижение массовых долей 0,1 г/кг и 1 г/кг воздушно-сухой почвы.

Условные обозначения вариантов почвенных образцов с ГП:

0,1F и 0,1K – добавлены препараты «Флексом» (F) или «Киргизский» (K) из расчёта 0,1 г сухого веса ГП на кг почвы;

1F и 1K – добавлены препараты «Флексом» (F) или «Киргизский» (K) из расчёта 1 г сухого веса ГП на кг почвы.

Почвенные образцы.

Модельный почвогрунт (МПГ) приготовлен промышленным способом в соответствии с международным стандартом ИСО 11268-1 на специализированном оборудовании ООО «Биогрунт», как описано ранее [1].

Состав МПГ: каолин – 20%; переходный торф – 10%, строительный песок с размером частиц 0,2-0,4 мм – 70%.

Почвогрунт такого состава применяется для разработки предельно допустимых уровней воздействия пестицидов, а также для анализа или сравнения почв под влиянием различных видов механической обработки [2]. Рецепт МПГ разрабатывалась с учётом особенностей технологии смешивания ис-

ходных компонентов с поправкой на потери при сепарации. Для удобства технического выполнения делали пересчёт массовых долей компонентов в объёмные с учётом плотности. МПГ имеет супесчаный гранулометрический состав по Н.А. Качинскому (20 % физической глины), пепельно-серый цвет, на вид – однородная рассыпчатая масса с комками органического вещества до 5 мм, насыпная плотность 1,1 г/см³.

МПГ по основным свойствам значительно однороднее любой природной почвенной разности, что позволяет решить ряд важных проблем, возникающих обычно при проведении агрохимического опыта: минимизировать влияние неоднородности почвенного покрова; значительно повысить репрезентативность получаемых результатов; минимизировать зависимость результатов от истории участка. Некоторые свойства МПГ приведены в таблице 1.

Почвенные образцы массой 400 г в пластиковых сосудах выравнивали по влажности (60% п.в.) и выдерживали при комнатной температуре в течение 5 сут. для достижения равновесия между всеми компонентами смеси. После чего через определённые промежутки времени к опытным образцам добавляли поллютант (медь) и/или ГП.

Загрязняющее вещество

В качестве модельного поллютанта применяли соль меди – $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Испытуемые концентрации (264 и 528 мг Cu^{2+} / кг) соответствовали 2 и 4 ОДК меди. При этих расчётах исходили из того, что согласно дополнению №1 к перечню ПДК и ОДК №6229-91 концентрация 132 мг/кг соответствует 1 ОДК, установленной для меди в суглинистых и глинистых почвах, близких к нейтральным.

Условные обозначения вариантов с медью:

Cu2 – добавлена соль меди до достижения 2 ОДК=264 мг Cu / кг почвы;

Cu4 – добавлена соль меди до достижения 4 ОДК=528 мг Cu / кг почвы.

Таблица 1

Некоторые свойства модельного почвогрунта

Наименование показателя	НД на методы испытаний	Единицы изм.	Значение показателя на абсолютно сухое веществ
Влажность	ГОСТ 26713-85	%	15,67 ± 0,91
pH _{солев.}	ГОСТ 26484-85	ед. pH	4,95 ± 0,06
pH _{водн.}	ГОСТ 26423-85	ед. pH	5,61 ± 0,06
Орг. вещество	ГОСТ 26213-91	%	10,9 ± 7,39
P ₂ O ₅ подв.	ГОСТ 26207-91	мг/кг	133,2 ± 37,8
K ₂ O подв.	ГОСТ 26207-91	мг/кг	37,6 ± 7,9

Таблица 2

Биотест-системы для оценки экотоксичности

Тест-организм	Тест-функция	Экспозиция, часы	Методика
Микроводоросли <i>Scenedesmus quadricauda</i>	изменение прироста численности клеток	72	ФР.1.39.2007.03223
Ракообразные <i>Ceriodaphnia affinis</i>	смертность	48	ФР.1.39.2007.03223
Простейшие <i>Paramecium caudatum</i>	смертность	24	ФР.1.39.2006.02506;

Дизайн эксперимента

Почвенные образцы загрязняли медью сернокислой, добавляя водный раствор соли $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ до достижения количества катионов меди, соответствующего 2 ОДК или 4 ОДК. Смесь тщательно перемешивали, раскладывали по сосудам (по 3 повторности на каждый вариант) и выдерживали 14 суток при комнатной температуре.

Затем загрязнённые образцы обрабатывали растворами гуминовых препаратов (ГП) в количествах 0,1 г/кг и 1 г/кг (в пересчёте на сухой вес ГП) и выдерживали в тех же условиях.

В качестве контроля (фона) при оценке воздействия меди исследовали незагрязнённые медью образцы. Кроме того, для оценки действия ГП на почвы закладывали варианты с обработкой незагрязнённых образцов почв гуминовыми продуктами.

Через 30 суток после обработки ГП образцы анализировали с применением стандартных химических и токсикологических методов.

Биотестирование

Подготовку образцов почв для биотестирования проводили стандартными способами, как описано [3].

Для экотоксикологической оценки загрязнённых почв и стимулирующего действия гуминовых ремедиантов применяли батарею биотест-систем на основе стандартизованных организмов. Исследования проводили в аттестованной лаборатории экотоксикологического анализа почв (ЛЭТАП) факультета почвоведения МГУ по стандартным методикам [4–7].

Используемые методы биотестирования, виды тест-организмов и тест-функций отражены в таблице 2.

Результаты и обсуждение

До начала биологических испытаний в почвенных образцах была проведена оценка динамики содержания подвижных форм меди при экспериментальном воздействии экзогенных гуминовых продуктов.

Таблица 3

Содержание свободной меди в модельном почвогрунте

Образец	Cu, мг/кг	Ст. откл. (\pm)
Фон	0	
Cu2	327	24
Cu4	470	73
Cu2 + 0,1F	393	70
Cu2 + 1F	193	56
Cu4 + 0,1F	353	115
Cu4 + 1F	467	17

Таблица 4

рН и солёность образцов

Образец	рН	Солёность
Фон	7,6	0,10
Cu2 + 0,1К	5,8	0,17
Cu2 + 1К	6,88	0,17
Cu4 + 0,1К	7,53	0,12
Cu4 + 1К	6,35	0,13
0,1 К	7,14	0,07
1 К	7,24	0,06

Результаты исследования содержания подвижных (растворимых ацетатно-аммонийным буфером) форм Cu^{2+} показали, что внесение 1 г/кг гуминового препарата «Флексом» снижает подвижность Cu^{2+} на 30% в варианте с 2 ОДК и на 11% – в варианте с 4 ОДК по сравнению с образцами почв, не обработанных препаратом (табл. 3).

Данные по солёности и рН образцов МПГ с ГП «Киргизский» представлены в таблице 4.

В образцах МПГ с киргизским гуматом рН находится в диапазоне от 5,8 до 7,5, а солёность от 0,06 до 0,17 мСм.

Для сравнения приведём оценку значений рН и солёности образцов дерново-подзолистой почвы с ГП «Киргизским» и ГП «Флексом» (табл. 5).

В образцах дерново-подзолистой почвы (УО ПЭЦ «Чашниково», Московская область) рН 6-7, солёность от 0,05 до 0,53 мСм. Несколько повышенная солёность (0,51) отмечена в образцах с высоким содержанием киргизского гумата – (1К), и в сочетании

высокого содержания меди и киргизского гумата (Cu4+1К). Таким образом, гумат из угля повышает солёность среды при высокой концентрации.

Медь и её соединения являются одним из наиболее распространённых тяжёлых металлов, попадающих в агроэкосистемы преимущественно из техногенных источников. Отличительной особенностью меди является то, что в следовых количествах её соединения необходимы для метаболизма, роста и развития растений, тогда как в высоких концентрациях могут проявлять сильное токсическое действие. В связи с этим для контроля и предотвращения накопления меди как загрязняющего вещества предпринимаются оценки её воздействия на живые организмы. В частности, путём подбора эффективных ремедиантов, безопасных для компонентов окружающей среды – гуминовых препаратов, можно снижать токсические эффекты на почвы и растения.

Результаты биотестирования почвенных образцов, загрязнённых медью, с обработкой и без обработки ГП, приведены на рисунках 1–3.

Влияние ГП на изменение прироста численности клеток зелёных протококковых микроводорослей *Scenedesmus quadricauda* приведено на рисунке 1.

Из полученных данных видно, что медь и в варианте эксперимента Cu2, и в варианте Cu4 оказывает токсический эффект на развитие микроводорослей. Гуминовые продукты заметно снимают токсичность, при этом большее смягчающее действие характерно для

Таблица 5

Значения рН и солёность образцов дерново-подзолистой почвы с гуминовыми препаратами

Образец	рН	Солёность, мСм
Фон (дерново-подзолистая почва)	6	0,15
Cu 2+ 0,1F	6,4	0,15
Cu 2+1F	6,7	0,15
Cu 4+0,1F	6,2	0,26
Cu 4+1F	6,3	0,16
0,1 F	6,7	0,05
1 F	6,8	0,05
Cu 2+ 0,1К	6,7	0,11
Cu 2+1К	6,4	0,51
Cu 4+0,1К	6,4	0,17
Cu 4+1К	5,9	0,53
0,1 К	7	0,16
1 К	6	0,46
Cu 2	6,3	0,11
Cu 4	6,4	0,17

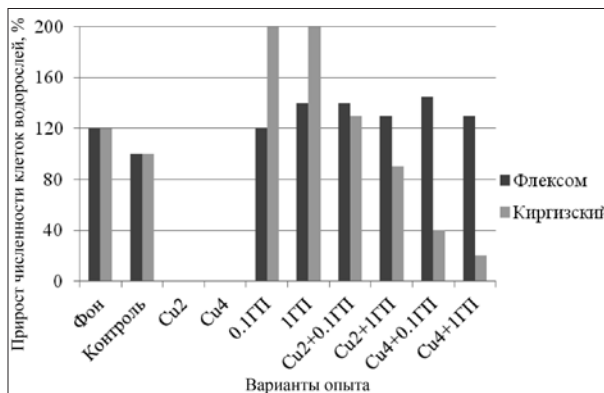


Рис. 1. Оценка воздействия меди и гуминовых препаратов по развитию тест-культуры микроводоросли *S. quadricauda* в водных вытяжках из почвенных образцов (МПП) в модельном эксперименте. Фон – незагрязнённый образец МПП.

ГП препарата «Флексом», по сравнению с ГП «Киргизский». Интересно, что сам ГП «Киргизский» обладает высоким стимулирующим эффектом на водоросли (до 90% при дозе 1 г/кг), однако в присутствии меди его действие выявить не удаётся.

Прирост численности клеток сценедесмуса в образцах с добавлением ГП «Флексом» относительно фона (образца без добавок) можно объяснить присутствием органических добавок (около 60%) в этом препарате, которые выступают в роли питательных компонентов для микроводорослей.

Анализ протекторной функции показал, что «Флексом», добавленный по фону меди, способствует увеличению прироста клеток в суспензии водорослей (до 40% относительно контроля). При этом доза гумата 0,1 г/кг оказывала больший эффект по сравнению с дозой 1 г/кг.

Сравнивая эффекты ГП «Киргизский» и «Флексом» при разных дозах внесения, следует отметить большую активность ГП «Флексом». ГП «Киргизский» лишь в варианте Cu2+0,1К заметно (на 10%) снимал токсический эффект меди на развитие водорослей в загрязнённых образцах. В варианте Cu2+1К наблюдалось, наоборот, отставание от контроля на 10%. При большем содержании меди – Cu4+0,1К ингибирующий эффект по задержке развития водорослей фиксировался на уровне 60%, в максимальных из испытанных концентрациях меди и ГП «Киргизский» – Cu4+ 1К на уровне 80% (рис. 1).

Как правило, наиболее чувствительным к действию тяжёлых металлов является стандартный тест с применением низших ракообразных.

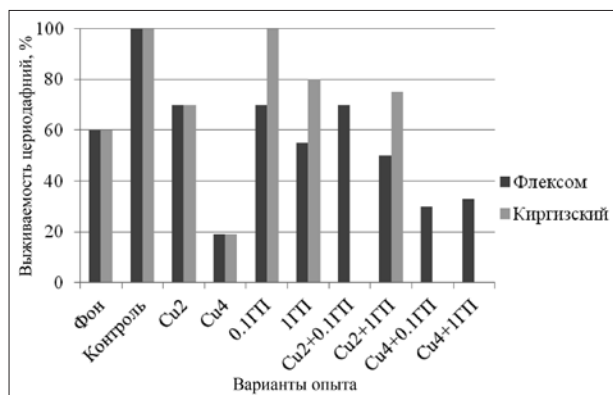


Рис. 2. Оценка воздействия меди и гуминовых препаратов по выживаемости цериодафний в водных вытяжках из почвенных образцов (МПП) модельного эксперимента (пояснения в тексте). Фон – незагрязнённый образец МПП.

В наших экспериментах сравнение эффектов ГП по выживаемости мальков цериодафний в водных вытяжках из почвенных образцов модельного эксперимента также показало большую эффективность по протекторным свойствам у ГП «Флексом» (рис. 2).

Анализ полученных данных показал, что вещества, содержащиеся в водном экстракте из МПП, влияют на жизнеспособность мальков цериодафний. Снижение выживаемости рачков в вытяжке из незагрязнённой почвы (фон) может достигать 40% относительно чистой культивационной воды (контроль) (рис. 2). Добавление относительно небольшой дозы меди к почве поддерживает жизнеспособность, увеличивая выживаемость на 10% (вариант Cu2), при Cu4 – выживаемость существенно падает.

Как и в биотестах с микроводорослями, добавление к незагрязнённым почвам ГП заметно поддерживало жизнеспособность тест-культуры. При этом биоактивность ГП «Киргизский» проявилась существенно в более выраженной форме.

В обоих случаях ГП в большей дозе (1К и 1F) оказывались менее эффективными, чем при дозе 0,1 г/кг.

При применении ГП по фону меди были замечены положительные эффекты лишь в некоторых вариантах. Так, ГП «Флексом» оказался эффективным в варианте опыта 2Cu+0,1F, а ГП «Киргизский» – в варианте опыта 2Cu+1К. Причём ГП «Киргизский» в трёх других вариантах – с дозой Cu4 и даже при обработке почвы в варианте Cu2 с добавкой 0,1 г/кг (4Cu+0,1К) абсолютно не проявил протекторных свойств. В то время как часть (30-50%) испытуемой выборки тест-культуры ракообразных при добавках ГП выживала (рис. 2).

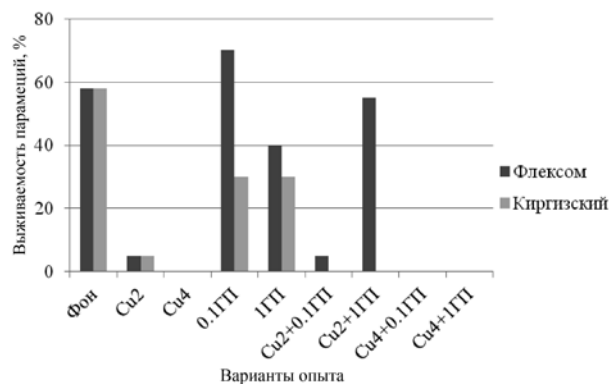


Рис. 3. Оценка воздействия меди и гуминовых препаратов по выживаемости парамеций в водных вытяжках из почвенных образцов (МПП) модельного эксперимента (пояснения в тексте). Фон – незагрязнённый образец МПП.

Тест-культура инфузорий оказалась наиболее чувствительной к воздействию водных вытяжек из исследуемых вариантов почв (рис. 3). Гибель организмов наблюдалась как в пробах с медью, так и при добавлении гуматов по фону меди. Выживаемость на уровне 30-70% наблюдалась у инфузорий лишь в образцах с «чистыми» гуматами. Очевидно эти препараты гуматов также используются организмами как питательный субстрат. О протекторных свойствах гуматов можно говорить лишь в одном случае, а именно – при добавлении ГП «Флексом» к образцу с медью Cu2+1F. В этом случае выживаемость составила более 50%.

Заключение

Биотестирование проб, содержащих 2 и 4 ОДК Cu²⁺ в сочетании с различными дозами ГП, показало, что протекторные свойства ГП лимитируются как дозой внесения, так и концентрацией загрязняющего вещества.

Нивелирование токсического действия меди (2 ОДК Cu²⁺) ГП «Флексом» проявлялось на всех испытанных тест-культурах разной таксономической принадлежности и ракообразных – *Ceriodaphnia affinis*, микроводорослей – *Scenedesmus quadricauda*, простейших *Paramecium caudatum*.

Сравнение протекторных свойств двух гуминовых препаратов (ГП «Киргизский» и ГП «Флексом») показало преимущества ГП «Флексом». Можно заключить, что ГП «Киргизский» обладал менее выраженными протекторными свойствами по сравнению с «Флексомом». Объяснением этому могут быть явные различия в способе получения и составе гуматов.

Жидкий торфяной ГП «Флексом» обогащён существенным количеством питательных

Литература

элементов. Являясь относительно молодым геологическим образованием, низинный торф, в отличие от бурого угля, сохраняет в своём составе большое количество биологически активных веществ – продуктов жизнедеятельности микроорганизмов. Биологически активные вещества торфа включают в себя аминокислоты, углеводы, ферменты, антибиотики и природные стимуляторы роста. Технология производства препарата «Флексом» обеспечивает наиболее полный перевод всех биологически активных веществ (в особенности гуминовых веществ) в доступное для биоты состояние. При этом гуминовые кислоты превращаются в физиологически активные водорастворимые соли – гуматы калия.

ГП «Киргизский», полученный выщелачиванием из углей, является недостаточно очищенным от балластных веществ (песок), солей NaCl, вызывающих высокое осмотическое давление и токсический эффект по отношению к исследуемым тест-культурам. Низкое связывание ионов меди гуматом «Киргизский» вызвано высокой ионной силой, создаваемой высокой концентрацией ионов Na⁺ (23%), экранирующих заряд на поверхности гуминовых кислот для связывания с ионами Cu²⁺.

Авторы благодарят М. А. Пукальчик и О. С. Якименко за помощь в проведении экспериментов.

Работа выполнена при поддержке МНТЦ (KR-2092).

1. Терехова В.А., Домашнев Д.Б., Каниськин М.А., Степачев А.В. Экотоксикологическая оценка повышенного содержания фосфора в почвогрунте по тест-реакциям растений на разных стадиях развития // Проблемы агрохимии и экологии. 2009. 3. С. 24–26.
2. Фомин Г.С., Фомин А.Г. Почва. Контроль качества и экологической безопасности по международным стандартам. М.: Протектор, 2001. 226 с.
3. Вавилова В.М., Терехова В.А. Условия отбора и подготовки проб для некоторых методов биотестирования вод, почв и отходов / Учебно-методическое пособие. М.: Макс Пресс МГУ, 2009. 40 с.
4. Терехова В.А., Воронина Л.П., Гершкович Д.М., Ипатова В.И., Исакова Е.Ф., Котелевцев С.В., Попутникова Т.О., Рахлеева А.А., Самойлова Т.А., Филенко О.Ф. Биотест-системы для задач экологического контроля: Методические рекомендации по практическому использованию стандартизованных тест-культур. М.: Доброе слово, 2014. 48 с.
5. Методика определения токсичности вод, водных вытяжек из почв, осадков сточных вод и отходов по измерению уровня флуоресценции хлорофилла и численности клеток водорослей, ФР.1.39.2007.03223.
6. Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных вод, сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg, ФР.1.39.2006.02506.
7. Методика определения токсичности воды и водных вытяжек из почв, осадков сточных вод, отходов по смертности и изменению плодовитости цериодафний, ФР.1.39.2007.03221.