

О. С. Скіп¹, А. А. Буцяк¹, В. В. Гавриляк², О. В. Швед^{1,2}, В. І. Буцяк¹

¹Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, кафедра біотехнології та радіології,

²Національний університет “Львівська політехніка”, кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології

АЛЬТЕРНАТИВНЕ ВИКОРИСТАННЯ СУБСТРАТІВ ОПАЛОГО ЛИСТЯ У ВЕРМИКУЛЬТИВУВАННІ

© Скіп О. С., Буцяк А. А., Гавриляк В. В., Швед О. В., Буцяк В. І., 2018

Проаналізовано можливості застосування вуглецевих субстратів опалого листя при вермикультивуванні *Eisenia foetida* для зрівноваження біологічного балансу ґрунтової екосистеми та створення біогумусу для підвищення врожайності ґрунту. Вивчено динаміку змін у біомасі олігохет за впливу мінерального фосфору, важких металів та цеолітового ентросорбенту для підвищення рівня деградації та нейтралізації органічних субстанцій цих відходів, що може бути використано для безпечної утилізації та компостування опалого листя.

Ключові слова: вермикультивування, опале листя, ґрунтова екосистема, важкі метали.

O. S. Skip, A. A. Butsyak, V. V. Havryliak, O. V. Shved, V. I. Butsyak

ALTERNATIVE USE OF FALLEN LEAVE SUBSTRATES IN VERMICULTURE

© Skip O. S., Butsyak A. A., Havryliak V. V., Shved O. V., Butsyak V. I., 2018

Possibilities of application of carbon substrates of fallen leaves during vermiculture of *Eisenia foetida* for balancing the biological balance of a soil ecosystem and creation of biohumus for increasing yield are analyzed. The dynamics of changes in biomass of oligochaetes under influence of mineral phosphorus, heavy metals and zeolite enterosorbent has been studied for increasing the level of degradation and neutralization of organic substances of these wastes, which can be used for safe disposal and composting of fallen leaves.

Key words: vermiculture, fallen leaves soil ecosystem, heavy metals, biomass of oligochaetes.

Постановка проблеми. Продукування різноманітних відходів є універсальною проблемою, з якою сьогодні стикаються практично усі країни. Більшість видів твердих побутових відходів, зокрема продукти харчування, папір, осад стічних вод, листя садів та парків здатні до біодеградації, оскільки містять великі кількості гетерогенних органічних субстратів, зокрема цукри, жири, білки, геміцелюлози, целюлози та лігніни [1]. Тому актуальним є пошук способів безпечної утилізації сміття, а також можливості практичного використання продуктів його трансформації.

Проблемною також є утилізація опалого листя, зокрема в урбанізованих населених пунктах та аграрних господарствах, оскільки воно також є потенційним забруднювачем і не підлягає спалюванню через можливе вивільнення у повітря шкідливих речовин. Переробку такого листя пропонують здійснювати пресуванням у паливні брикети (зокрема, заплановано побудову переробного комплексу біля Бортницької станції аерації Київських очисних споруд), або ж використовувати для компостування. З іншого боку, аграрії пропонують покращувати стан ґрунту біоконверсією листяного субстрату, збагаченого відповідними додатками, з отриманням біогумусу вермикультивуванням червоними каліфорнійськими черв'яками, найчастіше видів *Eisenia foetida*,

Lombriscus rubellus та червоний гібрид [2, 3]. Такий біогумус містить вищі рівні та доступніші форми азоту, фосфору, калію, кальцію та магнію, чим зумовлює значне підвищення родючості ґрунтів, їх пористість та вологість, окрім того, забезпечує живлення мікробної популяції, яка теж суттєво впливає на стан ґрунту.

Метою дослідження було вивчення властивостей *Eisenia foetida* при компостуванні комплексного субстрату із додаванням джерела вуглецю, зокрема опалого листа, з утворенням збагачувальних ґрунт копролітів, які є продуктами життєдіяльності досліджуваних організмів.

Матеріали і методи дослідження. Біоутилізацію відходів проводили методом компостування [4, 5]. Ефективна та безпечна переробка відходів з отриманням біогумусного екодобрива досягається вермикультивуванням і залежить від компонентів компостного субстрату та технології культивування [6, 7].

Біогумус виділяється у вигляді біологічного матеріалу – щільних чорно-коричневих копролітів, які не мають запаху, м'які на дотик. Склад і властивості біогумусу залежать від компонентів вихідного субстрату та технології компостування в процесі вермикультивування в шлунково-кишковому тракті олігохет. У копролітах, одержаних у процесі вермикультивування *Eisenia foetida*, міститься значна кількість біологічно активних речовин (біостимуляторів, ферментів), акумулюється значна кількість кальцію, магнію, фосфору та інших макро- і мікроелементів.

Склад субстрату: 20 % гною свійських тварин; 80 % компосту опалого листа.

Для культивування *Eisenia foetida* використовували базовий субстрат (група БС I), виготовлений з компосту опалого листа дерев різних екологічних зон: умовно екологічної чистої зони Брюховицького лісництва, умовно забрудненої зони в межах гранично допустимої концентрації (ГДК) – опале листя з дерев Стрийського парку м. Львова (група БС II); умовно забруднена зона автопроводу з перевищенням ГДК – опале листя з дерев вул. К. Левицького, м. Львова (група БС III). При формуванні вермиложа враховували площу, масу субстрату та кількість черв'яків.

Для визначення впливу важких металів, що можуть міститися у забрудненому вихлопами автомобільних газів листі, на метаболічні процеси в *Eisenia foetida*, вміст важких металів визначали методом атомно-абсорбційної спектроскопометрії, використовуючи режим адсорбції в повітряно-ацетиленовому полум'ї на спектроскопі AAS – 30 [8].

Для дослідження активності ензимів, що характеризують фізіологічний стан черв'яків при компостуванні, використовували біохімічний тест-скринінг активності амінотрансфераз [9]. Безпосередньо перед аналізом готували гомогенати на фізіологічному розчині: наважку черв'яків подрібнювали на холоді та гомогенізували впродовж 1–2 хв за допомогою скляного гомогенізатора Поттера із тефлоновим товчачиком в охолодженому середовищі виділення (співвідношення тканина/середовище становило 1: 3). Гомогенат центрифугували 5 хв при 8000g. У супернатанті досліджували ензиматичну активність аспартат- і аланінамінотрансферази методом С. Райтмана і С. Френкеля [10], а активність лужної фосфатази – за С. Кінгом (1954).

Додатковий вуглецевий субстрат для активації біоконверсії – мінеральну кормову добавку (цеолітове борошно дрібного дустового помолу Сокирянського родовища Закарпатської області) у кількості 6 % від загальної маси вносили рівномірним перемішуванням його із субстратом.

Для досліджень використовували копроліти олігохет із вологістю до 50 %, рН 6,5–7,5.

Екстракцію рухомих форм важких металів проводили 1 М розчином HNO_3 [9]: зразки біогумусу масою 5г поміщали в конічну колбу об'ємом 250 см^3 , доливали 50 см^3 1 М HNO_3 (1:10); колби із наважками збовтували на ротаторі протягом 1 год, настоювали одну добу та фільтрували через знезолений фільтр, попередньо змочений 1 М HNO_3 .

Визначали вміст рухомого фосфору за методом Чірикова (ДСТУ4115-2002), який ґрунтується на здатності аніонів фосфорної кислоти утворювати у кислому середовищі з молібдатоманію

фосфорномолібденову гетерополікислоту, яка за наявності відновника (аскорбінової кислоти) утворює сполуку синього кольору, інтенсивність забарвлення якої досліджують фотометрично.

Вміст рухомого калію визначали згідно з ГОСТ 27395-87, в основу вказаного методу покладено реакцію калію із тетрафенілборатом натрію з утворенням колоїдної забарвленої суспензії, інтенсивність забарвлення якої досліджували фотометрично.

Вміст кальцію та магнію у водній витяжці з копролітів визначали комплексометричним методом з використанням трилону Б.

Результати досліджень та обговорення. Оцінювання показників, які характеризують фізіологічні властивості та реакції біотичної системи на чинники зовнішнього середовища, має суттєве значення для розуміння механізмів підтримання гомеостазу екосистем на клітинному, органному рівнях та організму загалом. З цією метою досліджували отриману в результаті культивування на вибраних субстратах біомасу олігохет для подальшої оптимізації технології їх використання для біоутилізації листяних відходів та додаткового отримання екологічно безпечного добрива.

Одним із показників, що характеризує фізіологічний стан популяції олігохет залежно від умов існування, є біохімічний тест-скринінг активності ензимів, зокрема амінотрансфераз та лужної фосфатази в гомогенаті олігохет.

У результаті проведених досліджень виявлено зміни активності амінотрансаміназ АсАТ (КФ 2.6.1.1) та АлАТ (КФ 2.6.1.2) у біомасі олігохет, які зазнавали впливу важких металів, а також тих, яким на фоні важких металів додавали до базового субстрату цеолітове борошно.

Результати дослідження показали (табл. 1), що техногенне навантаження (вміст у базовому субстраті рухомих форм Кадмію, Плюмбуму, Цинку і Купруму, які перевищують ГДК) негативно впливає на метаболічні процеси, зокрема активність АсАТ та АлАТ, яка знижується відповідно на 20,4 та 23,6 %. Цілком імовірно, що в основі цієї закономірності властивості токсичних речовин утворювати стійкі сполуки із функціональними групами ферментів, оскільки відомо, що SH-групи АсАТ і АлАТ чутливі до йонів важких металів, зокрема Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , які належать до тіолових отрут.

Таблиця 1

Активність амінотрансфераз у біомасі олігохет за дії важких металів та цеолітового борошна, як ентеросорбента та джерела вуглецю, $M \pm m$, $n=50$, у мкмоль/год/г білка

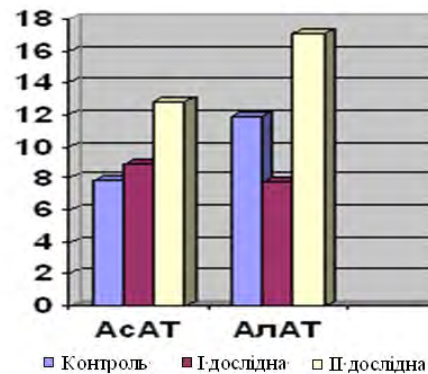
Групи – вермиложа	АсАТ	АлАТ
I БС (компост опалого листя дерев Брюховицького лісництва – екологічно умовно чиста зона)	$98,2 \pm 2,16$	$20,4 \pm 0,72$
I БС + 6 % цеолітового борошна	$106,6 \pm 1,18^*$	$26,1 \pm 0,53^*$
II БС (компост опалого листя з дерев Стрийського парку м. Львова – забруднення \leq ГДК)	$86,4 \pm 1,92$	$19,2 \pm 1,12$
II БС + 6 % цеолітового борошна	$94,8 \pm 1,12^*$	$20,8 \pm 0,46^*$
III БС (компост опалого листя з дерев вул. К. Левицького, м. Львова, забруднення $>$ ГДК).	$78,2 \pm 1,16$	$15,6 \pm 0,41$
III БС + 6 % цеолітового борошна	$89,6 \pm 1,21^*$	$18,8 \pm 0,32^*$

*Статистично вірогідна різниця між групами БС I - БС III та групами, яким до складу базових субстратів додавали цеолітове борошно у кількості 6 %, ($p \leq 0,05-0,001$).

Як видно з представлених результатів дослідження, додавання мінеральної кормової добавки до базових субстратів у кількості 6 % від загальної маси субстрату супроводжувалося підвищенням активності амінотрансаміназу гомогенатах *Eiseniafoetida* в середовищі вермикультивування в усіх закладених ложах. При додаванні цеолітового борошна до середовища вермикультивування, де як базовий субстрат використали компост з опалого листя дерев екологічно умовно чистої зони (Брюховицьке лісництво), активність АсАТ та АлАТ у гомогенаті черв'яків збільшилася на 7, 9 і 11,9 % відповідно порівняно з контролем.

Під впливом цеолітового борошна як ентеросорбента та мінеральної добавки спостерігалось суттєве зростання активності амінотрансаміназ у другій та третій дослідних групах. Так, у гомогенаті *Eiseniafoetida* другого дослідного вермиложа (базовий субстрат виготовляли з компосту опалого листя із вмістом важких металів, який не перевищував ГДК) активність амінотрансаміназ підвищувалася на 8,9 % (АсАт) та 7,7 % (АлАт), тоді як у третьому дослідному ложі (базовий субстрат виготовляли з опалого листя дерев, де забруднення важкими металами перевищувало ГДК) активність ферментів у біомасі зросла відповідно на 12,8 та 17,1 %. Цю динаміку змін активності трансаміназ у біомасі черв'яків зображено на рис. 1.

Рис. 1. Зміни активності АсАТ і АлАТ гомогенатів олігохет за дії важких металів та цеолітового борошна, % (групи вермилож I БС – К; II БС –I; III БС –II)



Відомо, що амінотрансферази каталізують зворотне перенесення функціональної групи – NH₂ з амінокислот на α-кетокислоти. Основними акцепторами аміногруп є оксалоацетат та α-кетоглутарова кислота – метаболіти циклу Кребса та метаболіт гліколізу – піруват. Своєю чергою, оксалоацетат може синтезуватися завдяки трансамінуванню з аскорбінової кислоти та глутамінової амінокислоти, а піруват – з аланіну. Процеси трансамінування відбуваються на межі протеїнового та вуглеводного обмінів, які забезпечують пластичні та енергетичні потреби організму.

Отже, одержані результати свідчать, що внесення цеолітового борошна до складу базового субстрату сприятливо позначилося на процесах переамінування амінокислот у біомасі черв'яків *Eiseniafoetida*, на що вказують вищі активності аспартат- і аланінамінотрансфераз.

У табл. 2 наведено результати, які опосередковано можуть свідчити про стан мінерального обміну в біомасі черв'яків. Так, виявлене зниження активності лужної фосфатази (табл. 2) за дії важких металів (третья дослідна група) на 32,4 % вказує на можливе порушення процесів енергетичного забезпечення, яке пов'язане з інгібуванням АТФ-ази. Однак, за таких умов, підвищення рівня неорганічного фосфату на 20 % може відбуватися за рахунок фосфоролізу глікогену, а також здатності окремих важких металів, зокрема Плюмбуму, активувати фосфатазу.

Таблиця 2

Вплив важких металів та цеоліту на динаміку активності лужної фосфатази та вмісту неорганічного фосфору, M ± m, n=50

Групи-вермиложа на базовому субстраті (БС)	Лужна фосфатаза мкмоль/с/кг білка	Неорганічний фосфат ммоль/л
I БС (компост опалого листя дерев Брюховицького лісництва – умовно чиста екологічна зона)	24,6 ± 0,58	1,68 ± 0,22
I БС + 6 % цеолітового борошна	22,1 ± 0,46*	1,71 ± 0,21
II БС (компост опалого листя з дерев Стрийського парку м. Львова – забруднення ≤ ГДК)	20,8 ± 0,51	1,78 ± 0,31
II БС + 6 % цеолітового борошна	21,6 ± 0,41	1,74 ± 0,32
III БС (компост опалого листя з дерев вул. К. Левицького м. Львова, забруднення >ГДК)	16,6 ± 0,42	2,01 ± 0,28
III БС + 6 % цеолітового борошна	18,8 ± 0,34*	1,77 ± 0,27

*Статистично вірогідна різниця між групами БС I - БС III та групами, яким до складу базових субстратів додавали цеолітове борошно у кількості 6 %, (p≤0,05-0,001).

Подібна ситуація щодо активності лужної фосфатази та приросту неорганічного фосфату спостерігалася також у другій дослідній групі, де як базовий субстрат використовували компост з опалого листя із вмістом важких металів у межах ГДК. Так, спостерігали динаміку активності ензиму до зменшення на 15,5 % порівняно з контролем, тоді як кількість неорганічного фосфору була практично однаковою.

Внесення цеоліту як мінеральної добавки та ентеросорбента до базового субстрату забезпечило підвищення активності лужної фосфатази на 3,8 та 13,2 % і не призвело до суттєвих змін у концентрації неорганічного фосфату відповідно у другій та третій групах.

Відомо, що зміни активності лужної фосфатази можуть свідчити про адаптацію ферментів до стійкого стресу. Зокрема, встановлено, що експозиція інсектицидів у ґрунт призводить до зниження розчинного білка у біомасі черв'яків і тісно пов'язана зі швидкістю їх росту, активністю трансаміназ і фосфатаз. Тому підвищення рівня лужної фосфатази у відповідь на введення до складу базових субстратів цеоліту може бути пов'язане з адаптивним синтезом цього ензиму [11].

Враховуючи негативний вплив важких металів на процеси акумуляції макроелементів у біогумусі, до базового субстрату додавали йонообмінний сорбент – цеолітове борошно в дозі 6 %, що сприяло підвищенню вмісту досліджуваних макроелементів в усіх трьох дослідних вермиложах. Як видно з наведених на рис. 2 результатів, концентрація кальцію, магнію, фосфору та калію у копролітах групи БС I при додаванні 6 % цеоліту збільшилася відповідно на 6,6; 16,1; 14,7; 11,7 %. Подібна динаміка змін виявлена для цих макроелементів у копролітах другої дослідної групи (БС II + 6 % цеоліту) – зафіксовано відповідне зростання на 5,3; 6,5; 9,6 та 7,5 %. У копролітах третьої дослідної групи (БС III + 6 % цеоліту) вміст макроелементів порівняно з контролем підвищився на 11,4; 17,1; 12,3 та 11,8 %. Характерно, що найсуттєвіші зміни спостерігали стосовно таких макроелементів, як фосфор та калій у групах з підвищеним вмістом важких металів на фоні добавок цеолітового борошна.

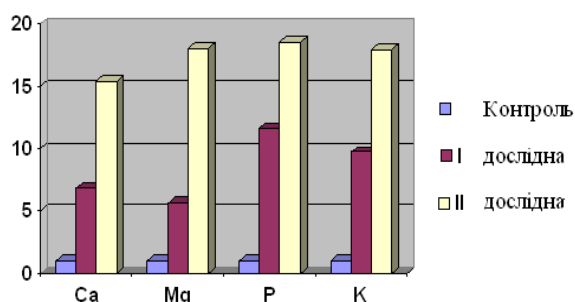


Рис. 3. Динаміка вмісту макроелементів у копролітах під впливом цеолітового борошна в дозі 6 % (групи вермилож I БС – К; II БС –I; III БС –II)

Наші попередні дослідження показали, що вміст гумусу в копролітах, одержаних від популяції *Eiseniafoetida*, коливається в межах від 9,9 до 11,5 % і значною мірою залежить від якості базового субстрату, а вміст загального азоту в копролітах за дії зазначених доз важких металів також має тенденцію до зниження, а саме у першому дослідному вермиложі на 10,3 % , а у другому дослідному ложі — на 21,0 %. Використання цеолітового борошна у дозі 6 % від маси базового субстрату вермикультури *Eiseniafoetida* сприяло суттєвому збільшенню в копролітах вмісту гумусу, залишкового азоту та сухої речовини.

Отже, отримані результати свідчать, що для покращення технології вермикультивування та підвищення продуктивності олігохет *Eiseniafoetida* до базового субстрату доцільно додавати природний мінералцеоліт у дозі 6 % від його загальної маси.

Висновки. Результати дослідження показали можливість застосування опалого листя як субстрату для культивування *Eiseniafoetida*, а додавання цеолітового борошна як йонообмінника та ентеросорбента позитивно впливає на активність ферментів популяції олігохет як деструкторів, які активно використовують органічні субстанції для компостування та утилізації.

Внесення цеолітового борошна до складу базового субстрату у кількості 6 % від загальної маси супроводжувалося збільшенням рівня таких макроелементів, як кальцій, магній, фосфор та калій у копролітах черв'яків *Eiseniafoetida*.

1. *Vermicomposting of Leaf Litters: Way to convert waste into Best*/ R. Nagar, A. Titov, P. Bhati // *Int. J. Curr. Sci.* – 2017, 20(4). – P 25–30. 2. S. Pattnaik, M. V. Reddy/*Nutrient Status of Vermicompost of Urban Green Waste Processed by Three Earthworm Species—Eiseniafetida, Eudriluseugeniae, and Perionyxexcavatus* // *Applied and Environmental Soil Science Volume 2010, Article ID 967526, 13 p.* doi:10.1155/2010/9675263. *Metabolic Responses of EiseniaFetida to Individual Pb and Cd Contamination in Two Types of Soils* // *Scientific Report. 7: 13110. DOI:10.1038/s41598-017-13503-z.* 4. Скин О. С., Швед О. В., Буцяк В. И. Перспективы альтернативности субстратов опавших листьев в вермикультуровании // *Technologica laspect of modern agricultural production and environmental protection/Proceedings XIII International scientific-applied conference. daRostim.* – Алматы Казах. ун-т, 2017. – С. 102–103. 5. Manczarski P. *Kompostowanie odpadów komunalnych* // *Referatna Forum Technologii Ochrony Środowiska. POLEKO.* – 2007, UP – 1–16 s. 6. Сендецький В. М. Переробка органічних відходів у біогумус методом вермикультування // *Збірник наукових праць ННЦ “Інститут землеробства УААН”.* – 2009. – Вип. 1–2. – С. 50–55. 7. Скин О. С., Буцяк В. И., Печар Н. П. Технологічні властивості та хімічний склад опалого листя як субстрату для вермикультування // *Науковий вісник ЛНУВМБТ ім. С. З. Гжицького.* – Львів, 2011. – Т. 13, № 2 (48), Ч. 1. – С. 466–470. 8. Скин О. С., Буцяк В. И., Печар Н. П. Активність ферментації субстратів за різного кількісного співвідношення компосту з опалого листя та гною ВРХ у процесі вермикультування *Eiseniafoetida* // *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького.* – Львів, 2011. – Т. 13, № 4 (50), Ч. 2. – С. 209–212. 9. *Методические указания по определению тяжёлых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства.* – М.: ЦИНАО, 1992 – 61 с. 9. Reitman S., Francel S. // *Amer. J Clin. Pathology.* – 1957. – Vol. 28. – P. 56. 10. Пересипкіна Т. Н., Дубова О. В., Приступа І. В. *Лабораторний практикум з ґрунтознавства* // Для студентів біологічного факультету. – Запоріжжя. – ЗНУ 2005. – 32 с. 11. *Relative Toxicity of two Selected Fungicides on Acid Phosphatase and Alkaline Phosphatase activity of Epigeic Earthworm EiseniaFetida (Oligochaeta)* / S. Mandal, P. P. Chakravorty, J. K. Kundu // *World Wide Journal of Multidisciplinary Research and Development.* 2017; 4(2): 14–17.