

## БИОТЕХНОЛОГИЯ

УДК 579.873.6.017.7

Т.П. Алексеева<sup>1</sup>, Т.И. Бурмистрова<sup>1</sup>, Л.Д. Стахина<sup>2</sup>, Н.Н. Терещенко<sup>3</sup>

<sup>1</sup>СибНИИСХиТ СО Россельхозакадемии (г. Томск)

<sup>2</sup>Институт химии нефти СО РАН (г. Томск)

<sup>3</sup>Биологический институт Томского государственного университета (г. Томск)

E-mail: burmistrova@sibniit.tomsknet.ru

### МЕЛИОРАНТЫ НА ОСНОВЕ ТОРФА ДЛЯ ОЧИСТКИ ПОЧВЫ ОТ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

**Аннотация.** В лабораторном опыте показано, что мелиоранты, в составе которых используется торф и азотно-фосфорные удобрения, благодаря активной стимуляции почвенной микрофлоры способны увеличивать скорость разложения нефти в почве в 1,5–2 раза. Изучено влияние разных доз и форм азотных удобрений в составе торфяного мелиоранта на интенсивность деструкции нефтяных углеводородов.

**Ключевые слова:** нефть; почва; торф; мелиорант; ферменты; микроорганизмы.

Загрязнение почв нефтью и нефтепродуктами в районах нефте- и газодобычи является серьезной экологической проблемой.

Почва обладает мощной самоочищающей способностью. Вместе с тем способность к самоочищению имеет свои границы. Период самовосстановления растительного покрова после загрязнения его нефтью и нефтепродуктами длителен и для северных регионов составляет 15–20 лет [1, 2].

В последнее время большое внимание уделяется разработке способов биологической рекультивации, в основу которых положена активация процессов микробиологической деструкции нефти загрязненных почв [3–6]. Для интенсификации микробиологической деструкции нефти возможно использовать экологически чистый мелиорант на основе торфа, обладающего хорошими сорбционными свойствами и обогащенного активной углеводородоокисляющей микрофлорой. Сорбционная емкость верхового и низинного торфа по отношению к нефти составляет соответственно 7,5 и 5,8 г нефти на 1 г воздушно-сухого (в.с.) торфа [7]. Численность углеводородоокисляющих микроорганизмов (УОМ) в нативном торфе в 5 раз превышает аналогичный показатель для почвы. После активации торфа путем внесения азотно-фосфорных удобрений количество разнообразной углеводородоокисляющей микрофлоры возрастает приблизительно в 100 раз и составляет в среднем  $5 \cdot 10^{10}$  клеток в 1 г в.с. торфа, что обеспечивает высокую степень деструкции нефти в короткие сроки [7].

Следует предположить, что на скорость биodeградации нефтяных углеводородов могут оказывать существенное влияние дозы и формы азотных удобрений, используемых в составе торфяного мелиоранта.

С целью определения влияния разных доз и форм азотных удобрений в составе торфяного мелиоранта на интенсивность деструкции нефтяных углеводородов проведен лабораторный модельный опыт.

### **Объекты и методы исследования**

Для моделирования процессов микробиологической деструкции использовалась дерново-подзолистая почва, искусственно загрязненная сборной товарной западно-сибирской нефтью.

Торфяной мелиорант приготовлен на основе низинного торфа месторождения Темное Томской области (степень разложения 25–30%, зольность 15% мас.) и минеральных удобрений – карбамида или аммиачной селитры, суперфосфата. В лабораторном опыте испытывали 4 состава торфяных мелиорантов (ТМ). Рассматриваемые мелиоранты в своем составе содержат разные виды азотных удобрений и разное количество азотно-фосфорных удобрений. Мелиоранты ТМ1 и ТМ2 в качестве азотного удобрения содержат карбамид, ТМ3 и ТМ4 – аммиачную селитру. Мелиоранты ТМ1 и ТМ3 содержат такое количество азотно-фосфорных удобрений, внесение которых в нефтезагрязненную почву обеспечит соотношение С:N:P, равное 20:1:0,15, необходимое, по мнению ряда авторов [12], для нормального роста и развития нефтеокисляющих микроорганизмов. Мелиоранты ТМ2 и ТМ4 приготовлены из расчета внесения с ними в нефтезагрязненную почву 60 кг/га N и P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> количества, необходимого для произрастания сельскохозяйственных культур, используемых при фитомелиорации – в условиях данного эксперимента соотношение С:N:P равнялось 863:1:1. Доза внесения рассматриваемых торфяных мелиорантов в нефтезагрязненную почву одинакова и составила 50 т/га. Исходя из этого стартовая доза минеральных удобрений, вносимая с составами ТМ1 и ТМ3, выше, чем с составами ТМ2 и ТМ4.

При проведении лабораторного опыта сухую почву с глубины 0–20 см просеивали через сито 3 мм, увлажняли до 30% от полной влагоемкости, вносили определенное количество нефти и торфяного мелиоранта, тщательно перемешивали до однородного состояния и помещали в лабораторные сосуды. Для поддержания оптимальной влажности проводили периодический полив до конца эксперимента. Образцы почвы для анализа отбирали через 3 дня, 1 мес., 6 мес.

Нефть из загрязненных образцов почвы экстрагировали горячим способом в аппарате «Сокслет» с использованием смеси хлороформ:метанол (93:7), который затем удаляли на вакуумном ротормом испарителе. Извлеченную нефть взвешивали на аналитических весах, определяли ее массовое содержание в почве.

Анализ группового состава нефтяных образцов осуществляли методом жидкостно-адсорбционной хроматографии на силикагеле [8]. Определение карбоксильных групп карбоновых кислот проводили методом потенциомет-

рического титрования нефтяного образца спиртовым раствором щелочи по ГОСТ 5985-79.

Общую численность микроорганизмов определяли на мясопептонном агаре (МПА), а численность уробактерий – на среде Федорова [9], количество углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) учитывали на среде следующего состава (г/л):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1,45;  $\text{KNO}_3$  – 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  – 2,4;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,6;  $\text{NaCl}$  – 1;  $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$  – 0,004;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,009;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,014;  $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,008; агар-агар – 20; сырая нефть – 10. Численность грибов определяли на картофельно-глюкозном агаре с рН, равном 4,5–5,0 [9].

Активность фермента каталазы определяли газометрическим методом, основанном на разложении перекиси водорода, дегидрогеназную активность – фотоколориметрическим методом [10].

Варианты опыта (повторность 3-кратная):

1. Почва (П) + TM1.
2. П + нефть (Н) + TM1 (C:N:P = 20:1:0,15).
3. П + Н+ TM2 (C:N:P = 863:1:1).
4. П + Н+ TM3 (C:N:P = 20:1:0,15).
5. П + Н+ TM4 (C:N:P = 863:1:1).

### Результаты и их обсуждение

На основании экспериментальных данных установлено, что самая высокая степень деструкции нефтяных углеводородов за 6 мес. эксперимента (42,5 и 54,3%) достигнута в вариантах с использованием торфяных мелиорантов, внесение которых в нефтезагрязненную почву обеспечивало широкое соотношение C:N:P, в данном случае равное 863:1:1, что характерно для составов мелиорантов, содержащих как карбамид, так и аммиачную селитру (вар. 3 и 5) (табл. 1). При более узком соотношении C:N:P, равном 20:1:0,15, степень деструкции за этот период оказалась ниже (21,6 и 32,4%) (вар. 2 и 4), что можно объяснить токсическим воздействием на почвенную биоту высоких стартовых доз минеральных удобрений, содержащихся в составах торфяных мелиорантов, вносимых в нефтезагрязненную почву. Отмечено также, что при любом соотношении C:N:P степень деструкции нефтяных углеводородов в вариантах с использованием мелиорантов с карбамидом выше, чем в случае с аммиачной селитрой – 32,4 и 54,3% против 21,6 и 42,5%.

Таблица 1

Результаты биodeградации нефтяных образцов за 6 мес.

| Вариант опыта  | Содержание нефти в почве, % мас. |              | Степень деструкции (за 6 мес.), % |
|----------------|----------------------------------|--------------|-----------------------------------|
|                | исходное состояние               | через 6 мес. |                                   |
| 2. П + Н + TM1 | 3,7±0,5                          | 2,5±0,2      | 32,4±0,3                          |
| 3. П + Н + TM2 | 3,5±0,3                          | 1,6±0,1      | 54,3±0,6                          |
| 4. П + Н + TM3 | 3,7±0,4                          | 2,9±0,3      | 21,6±0,4                          |
| 5. П + Н + TM4 | 4,0±0,6                          | 2,3±0,2      | 42,5±0,4                          |

О более значимых окислительных процессах, происходящих в нефтяных образцах в вариантах с использованием торфяных мелиорантов с карбамидом (вар. 2 и 3), свидетельствуют также изменения в содержании карбоксильных групп и групповом составе нефти, произошедшие за 6 мес. эксперимента (табл. 2).

Т а б л и ц а 2

**Изменения группового состава нефти и содержания СООН-групп за 6 мес.**

| Вариант опыта | Время отбора | Содержание СООН-гр., % мас. | Содержание, % отн. |      |       |            |
|---------------|--------------|-----------------------------|--------------------|------|-------|------------|
|               |              |                             | ПНУ                | АУ   | смолы | асфальтены |
| 2. П+Н+ТМ1    | исходное     | 0,85                        | 55,0               | 16,0 | 10,0  | 12,0       |
|               | 6 мес.       | 1,63                        | 21,0               | 16,2 | 16,9  | 8,1        |
| 3. П+Н+ТМ2    | исходное     | 0,85                        | 55,0               | 16,0 | 10,0  | 12,0       |
|               | 6 мес.       | 1,41                        | —                  | —    | —     | —          |
| 4. П+Н+ТМ3    | исходное     | 0,85                        | 58,0               | 15,0 | 12,0  | 12,0       |
|               | 6 мес.       | 2,28                        | 32,0               | 18,0 | 15,7  | 11,0       |
| 5. П+Н+ТМ4    | исходное     | 0,85                        | 55,0               | 16,0 | 10,0  | 12,0       |
|               | 6 мес.       | 1,53                        | —                  | —    | —     | —          |

*Примечание:* ПНУ – парафино-нафтеновые углеводороды; АУ – ароматические углеводороды.

В нефтяных образцах рассматриваемых вариантов с течением времени образуется дополнительное количество карбоксильных групп (СООН-), характерное для процессов биодegradации (табл. 2). Спустя 6 мес. от начала эксперимента самое высокое содержание СООН-групп зафиксировано в нефтяных образцах вариантов с использованием торфяных мелиорантов с аммиачной селитрой (вар. 4 и 5). Более низкое содержание СООН-групп в нефтяных образцах при использовании торфяного мелиоранта с карбамидом связано, по всей вероятности, с тем, что в этом случае достигнута более высокая степень деструкции нефтяных углеводородов (32,4 и 54,3% против 21,6 и 42,5%) и к этому сроку карбоновые кислоты преобразовались в другие кислородсодержащие соединения (сложные эфиры, продукты уплотнения, окислы углерода и др.).

Как показали исследования группового состава нефти, во всех вариантах опыта с присутствием в мелиоранте как карбамида, так и аммиачной селитры, произошло значительное снижение содержания парафино-нафтеновых углеводородов (ПНУ) по сравнению с исходным состоянием. Наибольшая степень деструкции ПНУ была достигнута в варианте использования мелиоранта с карбамидом (вар. 2) – в 2,6 раза. Содержание ароматических углеводородов (АУ) за этот период времени практически не изменилось, а асфальтенов – уменьшилось незначительно. Некоторое увеличение содержания смол в биодegradированных нефтяных образцах связано с их остаточным накоплением, а также дополнительным образованием в виде продуктов биодegradации ПНУ (см. табл. 2).

О преимуществе использования в составе торфяного мелиоранта карбамида свидетельствуют также результаты микробиологического и ферментативного анализа почвы (табл. 3, 4).

Сопоставление вариантов с внесением в нефтезагрязненную почву мелиорантов с карбамидом и аммиачной селитрой показало, что использование в составе торфяного мелиоранта карбамида способствует более активному течению микробиологических процессов в почве, что подтверждается более чем двухкратным превышением численности углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ) в этом случае уже на 3-и сутки наблюдения (табл. 3).

Таблица 3

**Влияние торфяных мелиорантов различного состава на численность микроорганизмов в нефтезагрязненной почве,  $N \cdot 10^5$  КОЕ / 1 г а.с.в. почвы**

| Микроорганизмы    | Время отбора, сут | Варианты опыта |              |              |              |              |
|-------------------|-------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                   |                   | 1<br>П+ТМ1     | 2<br>П+Н+ТМ1 | 3<br>П+Н+ТМ2 | 4<br>П+Н+ТМ3 | 5<br>П+Н+ТМ4 |
| Общая численность | 3                 | 31,7           | 35,0         | 16,7         | 6,6          | 62,5         |
|                   | 8                 | 48,3           | 1303,3       | 1660,0       | 7,5          | 458,3        |
|                   | 30                | 63,3           | 4108,3       | 224,2        | 16,9         | 86,7         |
| УОМ               | 3                 | 1,1            | 14,9         | 8,7          | 6,7          | 4,0          |
|                   | 8                 | 0,3            | 100,0        | 435,0        | 1,4          | 88,3         |
|                   | 30                | 64,5           | 413,3        | 151,7        | 121,7        | 76,7         |
| Грибы             | 3                 | $<10^4$        | $<10^4$      | $<10^4$      | 1,1          | 0,8          |
|                   | 8                 | $<10^4$        | $<10^4$      | $<10^4$      | 4,2          | $<10^4$      |
|                   | 30                | $<10^4$        | $<10^4$      | $<10^4$      | 33,0         | 17,0         |

Начиная с 8-х сут опыта, различия в численности УОМ в этих вариантах становятся еще более значительными, что, вероятнее всего, связано с высокой токсичностью почвы в случае использования мелиоранта с аммиачной селитрой. Данное предположение подтверждается и более высокой численностью в почве в этом случае микроскопических грибов, продукты метаболизма которых в условиях нефтяного загрязнения токсичны как для микробного сообщества почвы, так и для растений [11].

Примечательно, что спустя 30 сут численность грибов (микромикетов) в вариантах с использованием мелиоранта с аммиачной селитрой продолжала оставаться высокой, тогда как общая численность микроорганизмов обнаружила тенденцию к снижению (табл. 3).

Высокую численность грибов в вариантах с использованием мелиоранта с аммиачной селитрой можно объяснить поступлением в почву больших количеств легкодоступного для почвенных микромикетов аммонийного азота. При этом азот карбамида грибам почти недоступен, а процесс его минерализации до аммонийного азота в нефтезагрязненной почве протекает крайне медленно. Об этом свидетельствует почти 3-кратное снижение численности уробактерий, участвующих в разложении карбамида до аммиака в нефтезагрязненной почве по сравнению с незагрязненной (рис. 1).

Динамика почвенных ферментов каталазы и дегидрогеназы, являющихся основными деструкторами нефтяных углеводов, приведена в табл. 4.

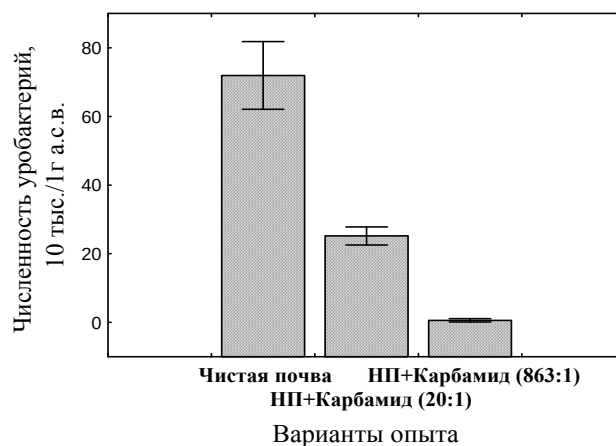


Рис. 1. Влияние нефти на численность уробактерий в почве

Т а б л и ц а 4

**Влияние торфяных мелиорантов различного состава на динамику ферментативной активности нефтезагрязненной почвы**

| Фермент                                           | Время отбора, сут | Варианты опыта |              |              |              |              |
|---------------------------------------------------|-------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|                                                   |                   | 1<br>П+ТМ1     | 2<br>П+Н+ТМ1 | 3<br>П+Н+ТМ2 | 4<br>П+Н+ТМ3 | 5<br>П+Н+ТМ4 |
| Каталаза,<br>мл O <sub>2</sub> /1<br>мин          | исходное          | 2,1            | 1,6          | 1,8          | 1,4          | 1,5          |
|                                                   | 8                 | 2,8            | 17,2         | 3,7          | 1,3          | 2,7          |
|                                                   | 30                | 1,7            | 19,6         | 2,6          | 0,3          | 1,6          |
|                                                   | 60                | 1,4            | 11,0         | 1,4          | 0,5          | 1,1          |
|                                                   | 90                | 1,8            | 9,7          | 2,0          | 0,8          | 1,6          |
| Дегидро-<br>геназа,<br>мг<br>ТТХ/10 г<br>за 1 сут | исходное          | 28,6           | 36,4         | 27,3         | 30,5         | 22,1         |
|                                                   | 8                 | 22,5           | 35,5         | 10,2         | 18,1         | 16,8         |
|                                                   | 30                | 17,5           | 16,3         | 8,3          | 19,0         | 2,2          |
|                                                   | 60                | 24,4           | 26,2         | 2,7          | 14,6         | 2,4          |
|                                                   | 90                | 25,5           | 31,0         | 0,8          | 18,7         | 2,4          |

Определение каталазной активности через 3 сут после внесения нефти показало ее снижение во всех вариантах в сравнении с активностью незагрязненного варианта почвы. Повышение каталазной активности, отмеченное спустя 8 сут после нефтяного загрязнения, находилось в соответствии с увеличением к этому сроку численности УОМ. Наилучшие условия для проявления каталазной активности на протяжении всего срока эксперимента были созданы при внесении в нефтезагрязненную почву торфяного мелиоранта с карбамидом, обеспечивающим соотношение С:N:P, равное 20:1:0,15 (вар. 2). Каталазная активность в этом случае значительно превышает активность контрольного варианта и вариантов с использованием торфяных мелиорантов с аммиачной селитрой (вар. 4 и 5).

Дегидрогеназную активность на протяжении всего срока эксперимента стимулировало внесение в нефтезагрязненную почву мелиоранта, содержа-

щего в своем составе как карбамид, так и аммиачную селитру (вар. 2 и 4), обеспечивающего соотношение C:N:P, равное 20:1:0,15. Значения дегидрогеназной активности в этом случае оказались сравнимы с контрольным вариантом без внесения нефти. Отмечено влияние на активность дегидрогеназы, как и в случае с каталазой, вида азотного удобрения в составе торфяного мелиоранта – на протяжении всего срока эксперимента самая высокая дегидрогеназная активность отмечена в варианте с использованием мелиоранта с карбамидом (вар. 2), обеспечивающим соотношение C:N:P, равное 20:1:0,15.

Экспериментально установлена высокая эффективность использования экологически чистого торфяного мелиоранта для рекультивации нефтезагрязненных почв. Применение торфяных мелиорантов ТМ1 и ТМ2 с карбамидом обеспечивает более высокую степень деструкции нефтяных углеводородов (32,4 и 54,3%) по сравнению с мелиорантами ТМ3 и ТМ4, содержащими аммиачную селитру, – 21,6 и 42,5%. Кроме того, использование в составе торфяного мелиоранта карбамида способствует более активному течению микробиологических и ферментативных процессов, что подтверждается максимальными показателями в вариантах с карбамидсодержащими мелиорантами численности углеводородокисляющей микрофлоры каталазной и дегидрогеназной активности.

Высокая стартовая доза в составах торфяного мелиоранта азотного удобрения (как карбамида, так и аммиачной селитры) не обеспечивает максимальной степени деструкции нефтяных углеводородов. За 6 мес. эксперимента мелиоранты с более широким соотношением C:N:P (863:1:1) обеспечили 42,5 и 54,3%-ную степень биodeградации нефти, тогда как мелиоранты с соотношением C:N:P, равным 20:1:0,15, – всего 21,6 и 32,4%-ную степень очистки почвы.

### Литература

1. Андерсон Р.К., Хазиев Р.Х. Охрана окружающей среды от загрязнения нефтью и промышленными сточными водами: обзорная информация. Сер. Коррозия и защита в нефтегазовой промышленности. М.: ВНИИОЭНГ, 1979. 54 с.
2. Кесельман Г.С., Брановский В.Д., Попов А.А. Защита окружающей среды при интенсификации добычи нефти: обзорная информация. Сер. Коррозия и защита в нефтегазовой промышленности. М.: ВНИИОЭНГ, 1983. Вып. 10. 58 с.
3. Хазиев Ф.Х., Фатхиев Ф.Ф. Изменение биохимических процессов в почвах при нефтяном загрязнении и активация разложения нефти // Агрохимия. 1981. № 10. С. 102–111.
4. Терещенко Н.Н., Лушиников С.В., Пышьева Е.В. Рекультивация нефтезагрязненных почв // Экология и промышленность России. 2002. С. 17–20.
5. Киреева Н.А., Тишкина Е.И. Ускорение биодеструкции нефтяных загрязнений при рекультивации почв // Актуальные вопросы биотехнологии. Уфа: Изд-во БГУ, 1990. С. 36–44.
6. Киреева Н.А. Использование биогумуса для ускорения деструкции нефти в почве // Биотехнология. 1995. № 5–6. С. 32–34.
7. Алексеева Т.П., Бурмистрова Т.И., Терещенко Н.Н. и др. Перспективы использования торфа для очистки нефтезагрязненных почв // Биотехнология. 2000. № 1. С. 58–65.
8. Соколова В.И., Колбин М.А. Жидкостная хроматография нефтепродуктов. М.: Колос, 1984. С. 26–30.

9. *Методы почвенной микробиологии и биохимии* / Под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. С. 304–308.
10. *Хазиев Р.Х.* Ферментативная активность почв. М.: Наука, 1976. С. 177–180.
11. *Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Галилеянова Н.Ф.* Влияние нефтепродуктов на комплекс почвенных микромицетов // *Микология и фитопатология*. 2004. Т. 38, вып. 1. С. 27–31.
12. *Пиковский Ю.И.* Трансформация техногенных потоков нефти в почвенных экосистемах // *Восстановление нефтезагрязненных почвенных экосистем*. М.: Наука, 1988. С. 7–22.

*Поступила в редакцию 13.02.2010 г.*

**Tatiana P. Alekseeva<sup>1</sup>, Tatiana I. Burmistrova<sup>1</sup>, Larisa D. Stakhina<sup>2</sup>,  
Natalia N. Tereschenko<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Siberian Scientific Research Institute of Agriculture and Peat of SB RAS, Tomsk, Russia*

<sup>2</sup>*Institute of Petroleum Chemistry SB RAS, Tomsk, Russia*

<sup>3</sup>*Biological Institute of Tomsk State University, Tomsk, Russia*

*E-mail: burmistrova@sibniit.tomsknet.ru*

#### **PEAT-BASED AMELIORANTS FOR PURIFICATION OF SOIL FROM OIL POLLUTANTS**

**Summary.** *Laboratory trials revealed that the ameliorants which contain the peat and nitrogen and phosphorus fertilizers are able due to active stimulation of microflora to increase the rate of decomposition of oil in soil by 1,5–2 times. The influence of carbamide and ammonia nitrate contents and their ratios to others components on the rate of destruction of oil pollutants in soil have been studied.*

**Key words:** *crude oil; soil; peat; ameliorant; ferments; microorganisms.*

*Received February 13, 2010*