

УДК 631.46:628.3

**ЛАБОРАТОРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ
РЕКУЛЬТИВАЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ
ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОПУСТИМОГО ОСТАТОЧНОГО
СОДЕРЖАНИЯ НЕФТЕПРОДУКТОВ**

Л.Г. Ахметзянова, С.Ю. Селивановская, В.З. Латыпова

Аннотация

Проведено лабораторное моделирование процессов рекультивации серой лесной почвы, загрязненной товарной нефтью в дозе 3%. Установлено, что различные способы рекультивации не только влияют на скорость деструкции углеводородов, но и приводят к образованию различных интермедиатов, которые, в свою очередь, вызывают различные эффекты в отношении микробного сообщества и фитотоксичности почв. Полученная совокупность данных, позволяющая соотнести содержание нефтепродуктов в почве, ее биологическую активность и фитотоксичность, использована для определения допустимого остаточного содержания нефтепродуктов.

Ключевые слова: нефтяное загрязнение, биологическая активность почв, фитотоксичность.

Введение

Углеводороды нефти являются широко распространенными промышленными поллютантами, поступающими в окружающую среду вследствие нефтяных разливов при добыче, транспортировке и хранении нефти. Ответная реакция экосистем на нефтяное загрязнение обусловлена совокупностью множества факторов: поликомпонентностью состава нефти, наличием в её составе токсичных веществ, гетерогенностью состава и структуры самой экосистемы, многообразием и изменчивостью внешних факторов [1–3].

В технологиях очистки почвы от нефтяного загрязнения (рекультивации) активно развиваются направления, использующие биологические методы. При этом основным условием биодegradации углеводородов является развитие почвенных микроорганизмов [4, 5]. Увеличение аборигенной микробной биомассы и ее активности путем внесения дополнительных питательных веществ, удобрений, аэрации и увлажнения, а также интродукция углеводородокисляющих микроорганизмов стимулирует процессы деструкции нефти [6, 7].

Индикатором эффективности рекультивации нефтезагрязненной почвы служит изменение ее биологической активности. В качестве индикаторов часто используют респираторную, ферментативную активность почвы, а также численность микроорганизмов [8–12]. Некоторыми исследователями рассматривается возможность использования фитотоксичности, оцениваемой на основании

реакции тестовых растений, в качестве показателя восстановления почвы после загрязнения углеводородами нефти [9, 13, 14].

Процесс рекультивации почвы считается завершенным, когда почвенное микробное сообщество восстанавливает свой исходный статус, а уровень фитотоксичности почвы снижается. Однако при проведении практических работ такие обширные исследования не представляются возможными, поэтому основным показателем, регистрирующим эффективность рекультивации, является содержание нефтепродуктов. В то же время необходимо отметить, что в настоящее время остаточное содержание нефтепродуктов, достижение которого считалось бы достаточным для завершения процесса рекультивации, не определено. Проблему осложняет и тот факт, что в процессе рекультивации нефтезагрязненной почвы образуются различные интермедиаты, токсичность и концентрация которых зависит от времени загрязнения почвы и способа выбранной рекультивации. Таким образом, целью настоящей работы явилось определение допустимого остаточного содержания нефтепродуктов в серой лесной почве, подвергнутой разным видам рекультивации, на основе анализа ее биологических параметров.

1. Методика

Объектом исследования служили микробные сообщества серой лесной почвы на желто-бурых карбонатных делювиальных суглинках и тестовые растения пшеницы (*Triticum sativum*). Моделирование загрязнения почвы осуществляли с использованием товарной нефти, добываемой на территории Республики Татарстан (УПС «Бастрык» НГДУ «Прикамнефть» ОАО «Татнефть») в дозе 3% от массы почвы. Характеристика нефти: плотность – 0.88 г/см³, содержание серы – 2.3%, парафинов – 3.3%, воды – 10%, механических примесей – 0.07%. Контрольным вариантом служила незагрязненная почва. Загрязненную почву делили на 4 части массой 5 кг и осуществляли ее рекультивацию. В работе использовали четыре способа рекультивации: внесение азотного удобрения (мочевину) с опилками в качестве структурообразователя (вариант М), внесение органического удобрения в виде перегноя (зрелый 1-годовалый навоз) (вариант П), внесение промышленного биопрепарата «Деворойл» (вариант Д) и рыхление почвы (вариант Р). Дозы внесения минеральных и органических удобрений рассчитывали согласно [15], количество биопрепарата «Деворойл» рассчитывали на основании [16]. Измерение содержания нефтепродуктов, фитотоксичности и активности почвенного микробного сообщества производили на 1-е, 14-е, 28-е, 42-е, 56-е, 70-е, 112-е и 196-е сутки от момента загрязнения.

Измерение массовой доли нефтепродуктов в исследуемых образцах почвы проводили методом ИК-спектроскопии [17].

Определение фитотоксичности почвы проводили методом контактного биотестирования [18]. Тест-объектом являлись семена пшеницы сорта Безенчукская-328. В качестве определяемых параметров использовали высоту надземной части и фитомассу растения.

Респираторную активность почвенного микробного сообщества и суммарную микробную биомассу определяли по [19]. Уреазную активность почвенного микробного сообщества оценивали фотокolorиметрически по количеству ионов

аммония, образовавшегося в результате восстановления мочевины в почвенных образцах [20]. Дегидрогеназную активность почвенного микробного сообщества оценивали по количеству формазана, образующегося в почве в результате восстановления 2,3,5-трифенилтетразолийхлорида (ТТХ) [20].

Определение всех параметров проводили не менее чем в пятикратной повторности. Достоверность различий полученных результатов оценивали с использованием коэффициента Стьюдента ($P < 0.05$).

2. Результаты и их обсуждение

На первом этапе исследования были подготовлены модельные почвенные образцы, искусственно загрязненные товарной нефтью в количестве 30 г/кг. Такой уровень загрязнения наиболее часто встречается при аварийных разливах нефти [21, 22]. На загрязненной почве моделировали различные способы рекультивации: рыхление (Р), внесение перегноя (1-годовалый навоз крупного рогатого скота) (П), внесение опилок с мочевиной (М), внесение препарата «Деворойл» (Д). Три первых относятся к методам биостимуляции, последний представляет метод биоаугментации. Предполагали, что результатом применения разных способов рекультивации будет являться не только разная скорость деструкции нефтяных углеводородов, но и образование разных интермедиатов в процессе трансформации. Такой подход позволит моделировать почвенные образцы, с нефтяным загрязнением разного возраста, с различными компонентами и, как следствие, различными эффектами в отношении почвенной биоты.

На первом этапе было определено изменение содержания углеводов. Анализ почвенных образцов показал, что через сутки после загрязнения содержание нефтепродуктов составило 15.5, 12.7, 12.5 и 13.4 г/кг почвы для вариантов Р, М, П и Д соответственно (рис. 1). К концу исследования произошло заметное снижение их содержания до 2.5 г/кг в варианте П. В остальных вариантах также произошло снижение нефтепродуктов на 79.8%, 75.2% и 73.9% (в вариантах Р, М и Д), однако конечное содержание оказалось в 2.4, 3.0 и 3.1 раза выше по сравнению с вариантом П.

При оценке изменения биологических параметров почвы выявлено стимулирующее действие нефтепродуктов в отношении общей микробной биомассы, которое проявляется практически на протяжении всего периода эксперимента (рис. 2, а). В контрольном варианте уровень микробной биомассы изменялся в интервале от 0.1 до 0.86 мг C_{mic} /г. Сразу после внесения нефти в почву опытных образцов обнаружен уровень биомассы, превышающий контрольный в 1.4, 1.2, 1.4 и 1.3 раза для вариантов Р, М, П и Д соответственно. В течение следующего месяца исследования уровень биомассы в опытных вариантах оставался выше уровня контроля (в 1.3, 2.5, 2.6, 1.6 раз – варианты Р, М, П, Д). В последующий период уровень микробной биомассы был либо выше, либо достоверно не отличался от контроля. К концу эксперимента, за исключением варианта с внесением «Деворойла», микробная биомасса опытных образцов оказалась на уровне контрольного варианта.

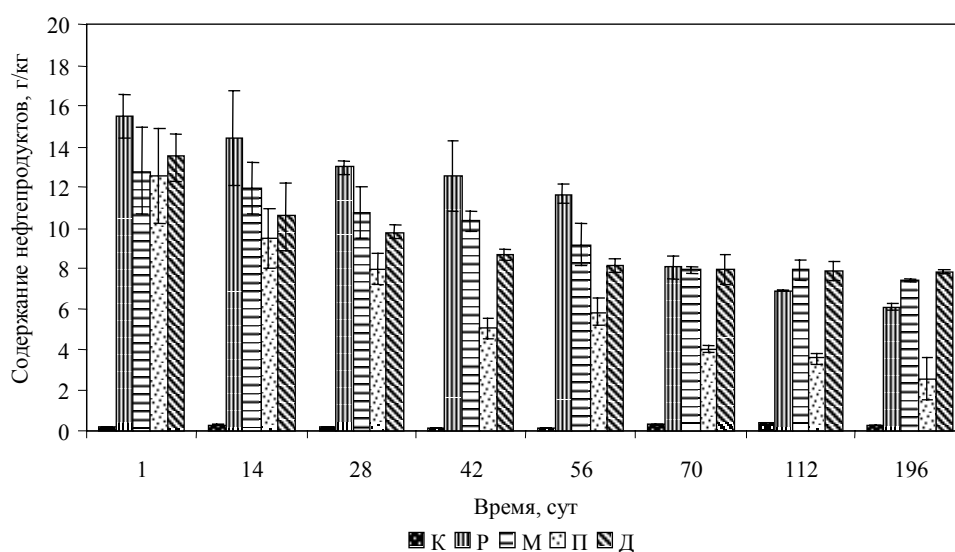


Рис. 1. Изменение содержания нефтепродуктов в почвенных образцах при разных способах рекультивации

Внесение нефти в количестве 3% от массы почвы приводило к увеличению респираторной активности во всех опытных вариантах (рис. 2, б). При этом наибольшее количество выделяемого CO_2 отмечалось через две недели от начала эксперимента и имело значения 0.67, 1.20, 1.12, 0.95 мг $\text{CO}_2/\text{г}\cdot 24 \text{ ч}$ для опытных вариантов Р, М, П и Д соответственно, в то время как в незагрязненной почве значения варьировались в интервале 0.10–0.46 мг $\text{CO}_2/\text{г}\cdot 24 \text{ ч}$. В опытных вариантах Р, М, П респираторная активность была выше контрольного уровня вплоть до 70-х суток эксперимента. К концу эксперимента респираторная активность опытных вариантов имела значения, достоверно не отличающиеся от контрольных.

Полученные нами закономерности, касающиеся возможного стимулирующего эффекта нефти и немонотонного изменения биологических параметров, согласуются с данными литературы. Так, известно, что при внесении в почву сырой нефти эффект определяется в первую очередь ее концентрацией. Наиболее активно процесс минерализации нефти протекает при ее содержании 5–6%, а при концентрации 1–2% выявлен слабый стимулирующий эффект [21, 23, 24]. Отмечается, что в этом случае углеводороды являются субстратом для микроорганизмов [14, 25, 26]. Ингибирующий эффект на биологические параметры почвы, согласно данным литературы, обнаружен при содержании нефти 10–30% [21, 24, 25]. Ответный отклик микробного сообщества зависит и от времени, прошедшего с момента поступления нефти в почву [25, 27]. Это связано как с различной токсичностью, доступностью и скоростью биodeградации исходных нефтяных компонентов, так и с различием метаболитов, образующихся в процессе деструкции нефти. Так, наиболее токсичными считаются полициклические, ароматические углеводороды, поэтому улетучивание легкой фракции нефти, содержащей наиболее токсичные соединения, способствует снижению токсического эффекта и улучшению биологических показателей почвы [15].

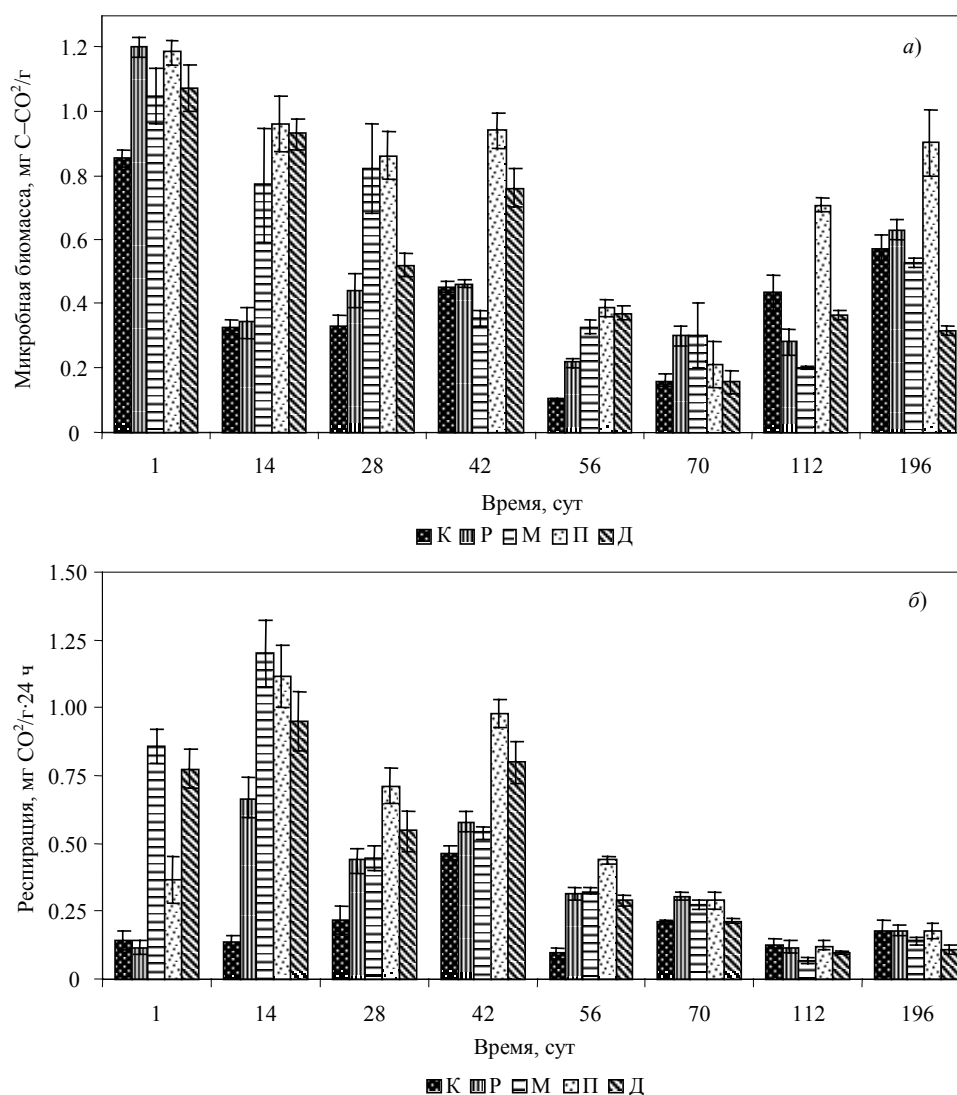


Рис. 2. Изменение микробной биомассы (а) и респираторной активности (б) серой лесной почвы при различных способах рекультивации

Почвенные ферменты, в частности дегидрогеназа и уреазы, широко применяются для оценки состояния почвы, в том числе и загрязненной нефтью [25]. Результаты определения динамики дегидрогеназной и уреазной активностей почвы представлены на рис. 3. В течение первых шести недель в вариантах М, П, Д фиксировали высокие значения дегидрогеназной активности, достигающие 319%, 409%, 353% от контрольных значений. В дальнейшем происходило снижение дегидрогеназной активности до уровня соответствующего контролю или ниже. В случае варианта Р уровень активности оказался в среднем на 43% выше контрольных значений на протяжении всего эксперимента.

Через день после загрязнения серой лесной почвы нефтью уровень уреазной активности в вариантах Р и М был в 1.7 и 2.5 раза ниже, чем в незагрязненной почве (рис. 3, б). Стимулирующее действие в отношении уреазной активности

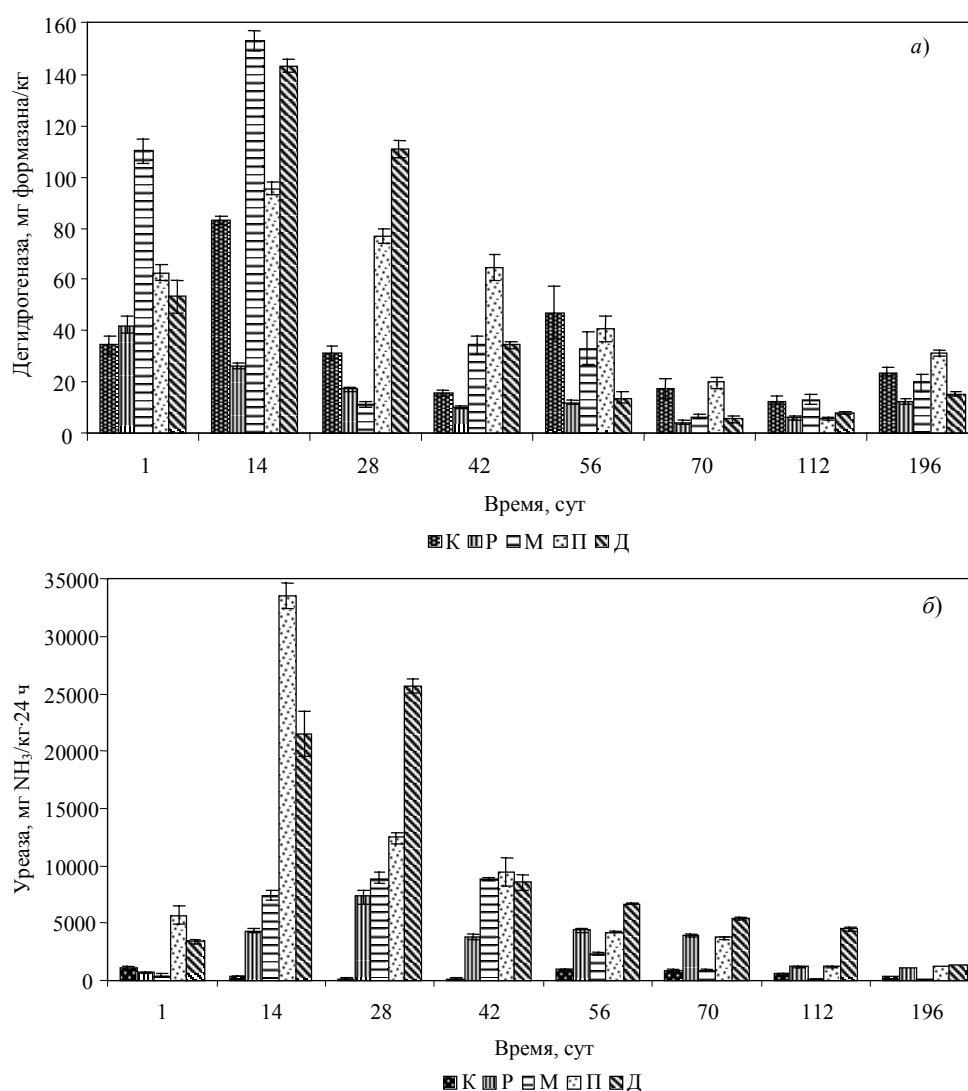


Рис. 3. Изменение дегидрогеназной (а) и уреазной активностей (б) серой лесной почвы при различных способах рекультивации

сразу после загрязнения отмечали для вариантов с применением перегноя (П) и «Деворойла» (Д), уровень активности был соответственно в 2.9 и 4.9 раза выше контрольного. Наибольший уровень уреазной активности для варианта П наблюдался на 14-е сутки эксперимента и составил 33571.8 мг NH₃/кг·24 ч, для вариантов Д, М, Р – на 28-е сутки (25657.2, 8923.3 и 7331.1 NH₃/кг·24 ч). Ранее снижение уровня уреазной активности на фоне высоких значений в других вариантах рекультивации отмечалось в варианте с применением мочевины и опилок (М). По истечении 7 месяцев эксперимента в опытных вариантах Р, П и Д значение уреазной активности было выше контрольных в 2.6, 2.9, 3.5 раза, а в варианте М – ниже в 5.3 раза.

Изменение уреазной активности в нефтезагрязненных почвах обсуждается в литературе. Так, ингибирующий эффект нефти и дизельного топлива на уреазную

активность почвы наблюдается при их содержании, равном 5% и 10% [14]. Однако рядом авторов отмечается и стимулирующий эффект нефти при указанных концентрациях. В частности, Курочкиной с соавторами [28] обнаружена интенсификация уреазной и аспаргиназной активности при загрязнении серой лесной почвы нефтью в дозе 50 и 150 г/кг.

В последнее время фитотоксичность активно используется в качестве показателя восстановления почвы после загрязнения углеводородами нефти [4, 9, 13, 29]. Для расчета фитотоксичности серой лесной почвы, загрязненной товарной нефтью, использовали результаты определения высоты наземной части и фитомассы растений пшеницы.

Данные о высоте растений представлены на рис. 4, а. В целом необходимо отметить, что во всех вариантах опыта на протяжении первого месяца после поступления нефти в почву угнетается развитие растений. Для опытных вариантов Р и М наибольшее угнетение развития растений отмечали на 1-е сутки, фитотоксичность почвы данных вариантов составила соответственно 86.9 и 76.5%. Для варианта с применением препарата «Деворойл» наибольшая фитотоксичность почвы отмечена на 14-е сутки (86.1%). Наименьшая фитотоксичность (20.3%) была характерна для варианта с применением перегноя (П). Именно в этом варианте высота наземной части растения оказалась наибольшей среди всех опытных вариантов на протяжении всего эксперимента. Кроме того, именно в этом варианте опыта фитотоксичность почвы снижалась наиболее быстро; высота растений раньше всех достигает значений, равных контролю, а к концу эксперимента она является даже достоверно выше контроля.

Фитомасса является показателем, отражающим развитие в совокупности как корневой системы, так и зеленых побегов тест-растений. Средние значения фитомассы тест-растений, выращенных на незагрязненной почве, в течение эксперимента имели значения 16–27 мг (рис. 4, б). Как и в случае с длиной побегов, негативное влияние нефтяного загрязнения наблюдалось по истечении 4 месяцев эксперимента, за исключением варианта П. Максимальная фитотоксичность, определенная на основании оценки фитомассы растений, зафиксирована для варианта Д на 14-е сутки исследования. В том же варианте и на 112-е сутки фитотоксичность составляла 25.3%. К концу эксперимента значения фитомассы во всех остальных опытных вариантах достоверно не отличались от контроля, а в случае внесения перегноя (вариант Р) ее уровень оказался выше контрольного варианта.

В результате проведенных исследований нами получена совокупность данных, позволяющая соотнести содержание нефтепродуктов в почве, ее биологическую активность и фитотоксичность. При определении содержания нефтепродуктов, при котором почвенные микробные сообщества и растения, выращиваемые на данной почве, не испытывают негативного воздействия, рассматривали одновременно все пробы, отобранные в динамике эксперимента при всех способах рекультивации. При этом исходили из принципов, принятых при установлении предельно допустимых концентраций (ПДК) химических веществ в почве [30]. Согласно этим принципам предельной концентрацией является концентрация, которая не вызывает 50%-ного снижения биологических параметров почвы по сравнению с незагрязненной почвой. В то же время, принимая во внимание тот факт, что нефть при определенных концентрациях является стимулятором

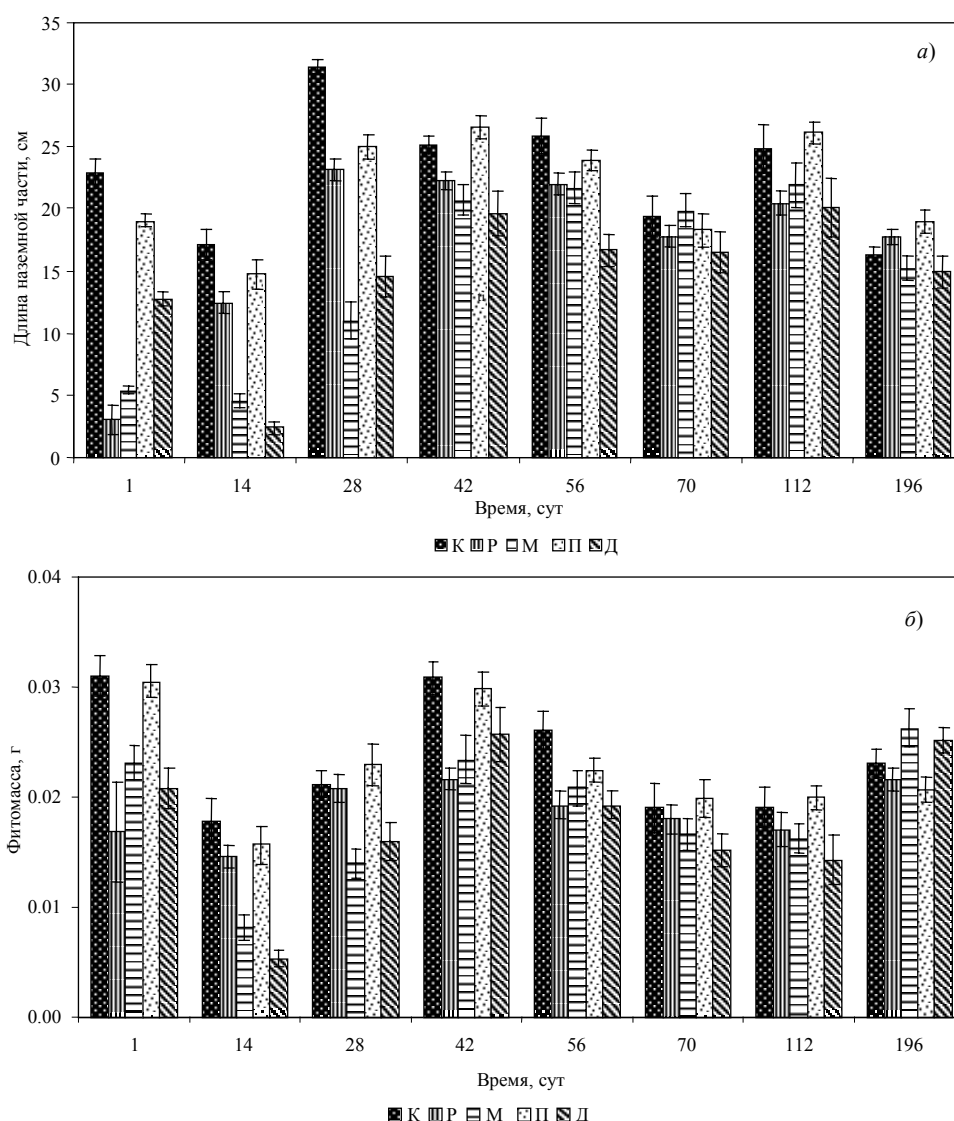


Рис. 4. Изменение высоты побега (а) и фитомассы (б) пшеницы, выращенного на серой лесной почве при различных способах рекультивации

микробиологических процессов в почве [14, 25, 26], в качестве определяющего признака нами принято отсутствие превышения значений биологических показателей в загрязненных пробах выше контроля на 50% по сравнению с таковыми в незагрязненных пробах. Таким образом, анализ полученных результатов позволяет заключить, что такой концентрацией является 3.6–4.4 г/кг.

Summary

L.G. Akhmetzyanova, S.Yu. Selivanovskaya, V.Z. Latypova. Laboratory Modeling of Oil Polluted Soil Remediation for Determination of Permissible Residual Content of Oil Products.

Laboratory modeling of recultivation of the gray forest soil polluted by crude oil in a dose of 3% was carried out. It was established that different ways of recultivation not only influence hydrocarbon destruction rate, but also lead to the formation of various intermediates,

which in their turn effect microbial community and phytotoxicity of soils. The obtained data made it possible to correlate the content of oil products in soil with its biological activity and phytotoxicity and were used for the determination of permissible residual content of oil products.

Key words: oil pollution, biological activity of soils, phytotoxicity.

Литература

1. *Марфенина О.Е.* Микробиологические аспекты охраны почв. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1991. – 118 с.
2. *Caravaca F., Roldan A.* Assessing changes in physical and biological properties in a soil contaminated by oil sludges under semiarid Mediterranean conditions // *Geoderma*. – 2003. – V. 117. – P. 53–61.
3. *Яковлев А.С., Гендугов В.М., Глазунов Г.П., Евдокимова М.В., Шулакова Е.А.* Методика экологической оценки состояния почвы и нормирования ее качества // *Почвоведение*. – 2009. – № 8. – С. 984–995.
4. *Margesin R., Schinner F.* Manual of Soil Analysis: Monitoring and Assessing Soil Bioremediation. – Heidelberg: Springer, 2005. – 366 p.
5. *Lee S.-H., Oh B.-I., Kim J.-G.* Effect of various amendments on heavy mineral oil bioremediation and soil microbial activity // *Biores. Technol.* – 2008. – V. 99, No 7. – P. 2578–2587.
6. *Margesin R., Schinner F.* Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – V. 67. – P. 3127–3133.
7. *Maki H., Hirayama N., Hiwatari T., Kohata K., Uchiyama H., Watanabe M., Yamasaki F., Furuki M.* Crude oil bioremediation field experiment in the Sea of Japan // *Mar. Pollut. Bull.* – 2003. – V. 47. – P. 74–77.
8. *Song H.G., Bartha R.* Effects of jet fuel on the microbial community of soil // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – V. 56. – P. 646–651.
9. *Phillips T.M., Liu D., Seech A.G., Lee H., Trevors J.T.* Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests // *J. Industr. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – V. 24. – P. 132–139.
10. *Dawson J.J.C., Godsiffe E.J., Thompson I.P., Ralebitso-Senior T.K., Killham K.S., Paton G.I.* Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils // *Soil Biol. Biochem.* – 2007. – V. 39. – P. 164–177.
11. *Киреева Н.А., Новоселова Е.И., Григориади А.С.* Оценка нарушенности лесных почв, загрязненных нефтепродуктами по показателям ферментативной активности // *Аграрная Россия*. – 2009. – № 6. – С. 183–184.
12. *Новосёлова Е.И.* Ферментативная активность почв в условиях нефтяного загрязнения и её биодиагностическое значение // *Теорет. и прикл. экол.* – 2009. – № 2. – С. 4–12.
13. *Labud V., Garcia C., Hernandez T.* Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil // *Chemosphere*. – 2007. – V. 66. – P. 1863–1871.
14. *Serrano A., Tejada M., Gallego M., Gonzalez J.L.* Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill // *Sci. Total Environ.* – 2009. – V. 407. – P. 4056–4061.
15. ВРД 39-1.13-056-2002. Технология очистки различных сред и поверхностей, загрязненных углеводородами Введ. приказом ОАО «Газпром» от 5 марта 2002 г. № 27 с 11 марта 2002 г. – М., 2002. – 23 с.
16. Биологический препарат «Деворойл». Биологическая очистка нефтяных загрязнений ООО «Сити Строй». – 2008. – URL: <http://www.sitistroi.ru>.

17. Методика выполнения измерений массовой доли нефтепродуктов в почвах и донных отложениях методом ИК-спектроскопии. ПНД Ф 16.1:2.2.22-98. – М., 1998. – 35 с.
18. ГОСТ Р ИСО 22030-2009. Качество почвы. Биологические методы. Хроническая фитотоксичность в отношении высших растений. – М.: Стандартинформ, 2010. – 16 с.
19. Microbiological methods for assessing soil quality / Ed. by J. Bloem, D.W. Hopkins, A. Benedetti. – Cambridge, MA: CABI Publ., 2006. – 320 p.
20. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 252с.
21. Пиковский Ю.И., Геннадиев А.Н., Чернявский С.С., Сахаров Г.Н. Проблема диагностики и нормирования загрязнения почв нефтью и нефтепродуктами // Почвоведение. – 2003. – № 9. – С. 1132–1140.
22. Солнцева Н.М. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1998. – 376 с.
23. Голодяев Г.П., Костенков Н.М., Ознобихин В.И. Биоремедиация нефтезагрязненных почв методом компостирования // Почвоведение. – 2009. – № 8. – С. 996–1006.
24. Звягинцев Д.Г., Гузев В.С., Левин С.В., Селецкий Г.И., Оборин А.А. Диагностические признаки различных уровней загрязнения почвы нефтью // Почвоведение. – 1988. – № 1. – С. 72–78.
25. Киреева Н.А., Водопьянов В.В., Мифтахова А.М. Биологическая активность нефтезагрязненных почв. – Уфа: Гилем, 2001. – 376 с.
26. Кураков А.В., Ильинский В.В., Котелевцев С.В., Садчиков А.П. Биоиндикация и реабилитация экосистем при нефтяных загрязнениях. – М.: Графикон, 2006. – 336 с.
27. Marin J.A., Hernandez T., Garcia C. Bioremediation of oil refinery sludge by land-farming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity // Environ. Res. – 2005. – V. 98. – P. 185–195.
28. Курочкина Г.Н., Шкидченко Г.Н., Амелин А.А. Влияние нового биопрепарата на ремедиацию нефтезагрязненной серой лесной почвы // Почвоведение. – 2004. – № 10. – С. 1241–1249.
29. Maila M.P., Cloete T.E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review // Int. Biodeterior. Biodegrad. – 2005. – V. 55. – P. 1–8.
30. Гончарук Е.И., Сидоренко Г.И. Гигиеническое нормирование химических веществ в почве: Руководство. – М.: Медицина, 1986. – 319 с.

Поступила в редакцию
24.09.10

Ахметзянова Лейсан Габбасовна – аспирант кафедры прикладной экологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: leisan-ksu@mail.ru

Селивановская Светлана Юрьевна – доктор биологических наук, профессор кафедры прикладной экологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: svetlana.selivanovskaya@ksu.ru

Латыпова Венера Зиннатовна – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой прикладной экологии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: ecoanrt@yandex.ru