

УДК 579.64:504.53.054

*A. K. САДАНОВ, С. А. АЙТКЕЛЬДИЕВА, А. А. КУРМАНБАЕВ, Э. Р. ФАЙЗУЛИНА,
О. Н. АУЭЗОВА, Ж. А. БАЙГОНУСОВА, Л. Г. ТАТАРКИНА*

ВЛИЯНИЕ МИНЕРАЛЬНОЙ И ОРГАНИЧЕСКОЙ ФОРМ АЗОТА НА СТЕПЕНЬ УТИЛИЗАЦИИ НЕФТИ АКТИВНЫМИ АССОЦИАЦИЯМИ НЕФТЕОКИСЛЯЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК

Изучено влияние различных форм азотных удобрений, вносимых совместно с активными ассоциациями нефтеокисляющих микроорганизмов, на изменение численности основных групп микроорганизмов и степень деструкции нефти в почве в модельном эксперименте. Показано, что предпочтительной формой вносимых азотных удобрений является органическая, а именно карбамид (мочевина), и нитратная (натриевая селитра). При их использовании деструкция нефти через два месяца составляла 59,2-67,9%.

Загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами в результате хозяйственной деятельности становится одним из ведущих факторов воздействия на окружающую среду. Нефтепродукты вследствие высокой адсорбирующей способности почвы длительное время сохраняются в ней, изменения при этом ее физико-химические и биологические свойства. Нефтяное загрязнение подавляет микробиологические и биохимические процессы, вызывает изменение структуры биоценозов, активности направленности почвообразовательных процессов [1, 2].

Сложность биодеструкции нефтепродуктов заключается в многокомпонентности и разнородности веществ, входящих в состав нефти, поэтому так важно для очистки загрязненных нефтепродуктами почв создание ассоциаций, которые обладают разной способностью к утилизации отдельных фракций углеводородов нефти.

Известно, что резкий дефицит биогенных элементов, возникающий в почве в результате загрязнения ее нефтью, является одним из основных факторов, лимитирующих биологическую очистку от этого загрязнителя. Основными биогенными элементами в процессе биодеградации нефти являются азот и фосфор, поэтому все известные в настоящее время способы биоремедиации подразумевают обязательное применение тех или иных видов минеральных и органических удобрений. Стимулирующий эффект удобрений объясняется оптимизацией концентрации питательных элементов в почвенном растворе, что является важным фактором для обменных процессов микроорганизмов [3, 4].

Наиболее важным является применение азотных удобрений. Большое значение имеет также и форма используемых азотных удобрений (нитратная, аммонийная или органическая).

Целью данной работы было выяснение наиболее оптимальной формы азотных удобрений при биодеструкции нефти в почве под воздействием активных ассоциаций нефтеокисляющих микроорганизмов.

Материалы и методы исследований

В эксперименте использовали почву месторождения Косшагыл – солонец солончак пустынный под эбелеком, которую помещали в пластиковую посуду по 50 г, затем искусственно загрязняли ее нефтью того же месторождения, в количестве 10%. В соответствии со схемой опыта в каждый сосуд вносили соответствующую форму азотного удобрения в дозе из расчета 60 кг/га. Эта доза является минимальной. По литературным данным [5] известно, что применение высокой дозы азотных удобрений способствует созданию в нефтезагрязненной почве условий активного протекания диссимиляционной нитратредукции и, как следствие, интенсивному выбросу молекулярного азота в атмосферу. Это в свою очередь тормозит процессы очистки почвы от нефти. Основным фоном по фосфору и калию служил K_2HPO_4 из расчета 1 мг/кг почвы.

Далее в исследуемые образцы почв вносили две ассоциации активных нефтеокисляющих микроорганизмов, состоящая каждая из 4-х штаммов:

ассоциация 1 - *Acinetobacter calcoaceticus* 2A, *Microbacterium lacticum* 41-3, *Micrococcus roseus* 49, *Arthrobacter terregens* П-1;

ассоциация 2 - *Flavobacterium* sp. 4тол, *Bacillus firmus* 72, *Flavobacterium* sp. P5 и *Bacillus* sp. P24.

Титр внесенных ассоциаций составлял 10^9 кл/г.

Эксперимент включал следующие варианты:

1. чистая почва (контроль 1);

2. почва + нефть (контроль 2);

3. почва + нефть + ассоциация 1 (контроль 3);

4. почва + нефть + ассоциация 1 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (аммонийная форма);

5. почва + нефть + ассоциация 1 + NaNO_3 (нитратная форма);

6. почва + нефть + ассоциация 1 + $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$ (мочевина – органическая форма);

7 почва + нефть + ассоциация 2 (контроль 4);

8. почва + нефть + ассоциация 2 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

9. почва + нефть + ассоциация 2 + NaNO_3 ;

10. почва + нефть + ассоциация 2 + $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$.

Периодически проводили увлажнение и рыхление почвы. Продолжительность опыта составила два месяца.

Остаточное содержание нефти в почве определяли гравиметрическим методом [6]. Количественное определение основных групп микроорганизмов проводили общепринятыми микробиологическими методами [7].

Результаты и обсуждение

Был поставлен модельный эксперимент с целью выяснения наиболее оптимальной формы азотных удобрений при биодеструкции нефти в почве.

Во время опыта проводился микробиологический анализ, включающий определение основных групп микроорганизмов: гетеротрофных бактерий, актиномицетов, мицелиальных грибов и углеводородокисляющих микроорганизмов (УОМ). Из чистой почвы и после загрязнения через семь суток были отобраны почвенные образцы для определения исходного содержания указанных групп микроорганизмов (табл. 1), затем их численность отмечали после 2-х месяцев. По истечении этого срока также определяли степень утилизации нефти в почве.

Таблица 1. Численность основных групп микроорганизмов в начале модельного эксперимента
(без внесения активных ассоциаций)

Варианты	Гетеротрофные бактерии, КОЕ/г	Актиномицеты, КОЕ/г	Мицелиальные грибы, КОЕ/г	УОМ, НВЧ кл/г
Контроль 1	$(2,2 \pm 0,6) \times 10^5$	$(7,6 \pm 0,6) \times 10^3$	единичные	10^2
Контроль 2 через 7 суток	$(7,2 \pm 0,2) \times 10^5$	$(1,2 \pm 0,2) \times 10^3$	$(4,0 \pm 0,3) \times 10^2$	10^3
Контроль 1 через 2 месяца	$(2,8 \pm 0,3) \times 10^5$	$(6,8 \pm 0,5) \times 10^3$	$(8,0 \pm 0,4) \times 10^2$	10^2
Контроль 2 через 2 месяца	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^6$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$	$(3,0 \pm 0,5) \times 10^3$	10^4

Как видно из табл. 1, в контрольных вариантах после внесения нефти через 7 суток наблюдалось увеличение количества гетеротрофных бактерий, мицелиальных грибов и углеводородокисляющих микроорганизмов. Число актиномицетов снижалось. Через 2 месяца в чистой незагрязненной нефтью почве число гетеротрофов, актиномицетов и УОМ практически не изменилось, но увеличилось количество мицелиальных грибов. В варианте с нефтью через 2 месяца произошло увеличение бактерий, мицелиальных грибов и УОМ на 1, 1 и 3 порядка соответственно, при этом отмечалось самое низкое содержание актиномицетов.

Степень утилизации нефти в почве через два месяца без внесения ассоциаций микроорганизмов составила 16,2%.

После двух месяцев инкубирования активных ассоциаций с разными формами азотных удобрений установлено, что во всех вариантах опыта количество гетеротрофных бактерий по отношению к контролю 2 увеличилось на один порядок и составило десятки миллионов клеток в

Таблица 2. Численность основных групп микроорганизмов и степень утилизации нефти с применением азотных удобрений и активных ассоциаций микроорганизмов через 2 месяца

Варианты	Гетеротрофные бактерии, КОЕ/г	Актиномицеты, КОЕ/г	Мицелиальные грибы, КОЕ/г	УОМ, НВЧ кл/г	Степень утилизации нефти, %
Контроль 2	$(5,0 \pm 0,3) \times 10^6$	$(1,5 \pm 0,2) \times 10^2$	$(3,0 \pm 0,5) \times 10^3$	10^4	16,2
Контроль 3	$(6,0 \pm 0,8) \times 10^7$	$(3,6 \pm 0,5) \times 10^4$	$(6,5 \pm 0,4) \times 10^3$	10^6	54,2
почва + нефть + ассоциация 1 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(6,0 \pm 0,8) \times 10^7$	$(3,0 \pm 0,7) \times 10^3$	$(5,9 \pm 0,6) \times 10^4$	10^6	53,7
почва + нефть + ассоциация 1 + NaNO_3	$(6,8 \pm 0,9) \times 10^7$	$(1,3 \pm 0,5) \times 10^4$	$(4,9 \pm 0,3) \times 10^2$	10^7	63,1
почва + нефть + ассоциация 1 + мочевина	$(7,6 \pm 0,5) \times 10^7$	$(4,4 \pm 0,5) \times 10^4$	$(3,8 \pm 0,4) \times 10^2$	10^7	67,9
Контроль 4	$(4,7 \pm 0,2) \times 10^7$	$(3,6 \pm 0,8) \times 10^4$	$(3,0 \pm 0,5) \times 10^2$	10^6	51,8
почва + нефть + ассоциация 2 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$(2,2 \pm 0,8) \times 10^7$	$(3,1 \pm 0,7) \times 10^4$	$(3,0 \pm 0,4) \times 10^4$	10^6	52,5
почва + нефть + ассоциация 2 + NaNO_3	$(4,9 \pm 0,7) \times 10^7$	$(3,2 \pm 0,6) \times 10^4$	$(1,0 \pm 0,2) \times 10^3$	10^6	59,2
почва + нефть + ассоциация 2 + мочевина	$(6,2 \pm 0,4) \times 10^7$	$(5,6 \pm 0,5) \times 10^4$	$(1,0 \pm 0,1) \times 10^2$	10^7	64,9

1 г почвы (табл. 2). При этом самое значительное их увеличение произошло с использованием ассоциации 1 и органического удобрения (мочевины) и составило 76 млн. клеток в 1 г почвы.

Число актиномицетов также стало выше на 1-2 порядка. Количество мицелиальных грибов по отношению к контролю 2 изменилось не однозначно. Если в контрольном варианте их численность исчислялась в тысячах клеток (3000 кл/г), то использование органической и нитратной форм азота снизило их число до сотен клеток на 1 г почвы. В вариантах опыта с внесением аммиачной формы азотных удобрений, напротив, количество микроскопических грибов увеличилось на порядок. Высокая численность грибов в вариантах с сульфатом аммония обусловлена поступлением в почву больших количеств легкодоступного для грибов аммонийного азота, в результате чего они начинают активно размножаться, при этом продуцируя токсины. Об этом свидетельствуют данные приведенные Киреевой с соавторами [8].

Вполне закономерно явилось то, что во всех вариантах эксперимента после 2-х месяцев резко возросло количество УОМ. Самые высокие их значения отмечены в вариантах с использованием мочевины и натриевой селитры (до 10^7 кл/г).

Анализ утилизации нефти в опыте показал, что по отношению к контролю во всех вариантах потребление нефти под воздействием активных нефтеокисляющих ассоциаций было значительным – от 51,8 до 67,9%. Добавление в нефтезагрязненную почву аммиачного удобрения практически не влияло на утилизацию нефти. Использование нитратного и, особенно, органического азота существенно повышало деструкцию нефти в почве.

Таким образом, микробиологический анализ нефтезагрязненной почвы м. Косшагыл, а также изучение степени утилизации нефти показали, что наибольший эффект очистки от нефти достигается при совместном применении активных ассоциаций УОМ и азотных удобрений. Предпочтительной формой вносимых азотных удобрений является органическая, а именно карбамид (мочевина), и нитратная (натриевая селитра).

ЛИТЕРАТУРА

1 Киреева Н.А. Использование биогумуса для ускорения деструкции нефти в почве // Биотехнология. – 1995. – № 5-6. – С. 32-35.

2 Орлов Д.С., Бочарникова Е.А., Амосова Я.М. Изменение физико-химических свойств почв, загрязненных нефтью и нефтепродуктами // Тез. докл. республиканского семинара «Экотоксикология и охрана природы», – Юрмала, Рига, 1988. – С. 128-130.

3 Терещенко Н.Н., Лушников С.В. К вопросу о рациональном применении минеральных удобрений для ускорения микробиологической деструкции нефтяных углеводородов в почве // Материалы 4 междунар. симпозиума «Контроль и реабилитация окружающей среды». – Томск, 2004. – С. 117-118.

4 Терещенко Н.Н., Лушников С.В. Актуальность рационального применения минеральных удобрений для стимулирования процессов самовосстановления нефтезагрязненных почв // Материалы Межрегион. научн.-практ. конф.

«Повышение плодородия почв и продуктивности сельскохозяйственных культур в зонах рискованного земледелия». – Барнаул, 2004. – С. 18-27.

5 Терещенко Н.Н., Лупников С.В., Митрофанова Н.А., Пилипенко С.В. Особенности биологической рекультивации нефтезагрязненных и техногенно засоленных почв // Экология и промышленность России. – 2005. – № 6. – С. 33-36.

6 Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. – М.: Химия, 1984. – 448 с.

7 Практикум по микробиологии / Под. ред. А. Н. Нетрусова. – М.: Academia, 2005. – 597 с.

8 Киреева Н.А., Бакаева М.Д., Галимзянова Н.Ф. Влияние различных способов биоремедиации нефтезагрязненных почв на характеристику комплекса микромицетов // Прикл. биохимия и микробиология. – 2008. – Т. 44, № 1. – С. 63-68.

*A. K. Sadanov, S. A. Aitkel'dieva, A. A. Kurmanbayev, Iy. R. Faizulina,
O. N. Auezova, Zh. A. Baigonusova, L. G. Tatarkina*

**МИНЕРАЛДЫ ЖӘНЕ ОРГАНИКАЛЫҚ КҮЙДЕГІ АЗОТТЫҢ МҰНАЙТОТЫҚТЫРҒЫШ
МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ АССОЦИАЦИЯСЫМЕН МҰНАЙДЫ ҮДҮРАТУ ДӘРЕЖЕСІНЕ ӨСЕРІ**

Белсенді мұнайтотықтырғыш микроорганизмдердің ассоциациясымен бірге әртүрлі азотты тыңайтқыштардың топырақтағы мұнайды үдүрату дәрежесіне және негізгі микроорганизмдер тобының санына өсепті модельді экспериментте зерттелген. Минералды тыңайтқышка карағанда, органикалық азотты тыңайтқыштың тиімділігі көрсетілген. Өсіреле ен тиімдісі карбамид (мочевина), нитратты (натрийлі селитра) екендігі анықталды. Осы тыңайтқыштарды екі айданың көлемінде пайдаланғаннан соң мұнайдың 59,2-67,9 % үдүрауы байқалған.

*A. K. Sadanov, S. A. Aitkel'dieva, A. A. Kurmanbayev, Iy. R. Faizulina,
O. N. Auezova, Zh. A. Baigonusova, L. G. Tatarkina*

**INFLUENCE OF MINERAL AND ORGANIC FORMS OF NITROGEN ON DEGREE OF UTILIZATION
OF OIL BY ACTIVE ASSOCIATIONS OF OIL-OXIDIZING MICROORGANISMS**

Influence of various forms of the nitric fertilizers brought together with active associations of oil-oxidizing microorganisms, on change of number of the basic groups of microorganisms and degree of oil destruction in soil in modelling experiment is studied. It is shown, that the preferable form of brought nitric fertilizers is organic, namely the carbamide (urea), and nitrate (nitrate saltpeter). At their use the destruction of oil in two months made 59,2-67,9 %.